

Pilar M^a Lanuza Morte

Inmunoterapia de células NK para el tratamiento de cáncer colorrectal con mutaciones de resistencia a drogas

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Pardo Jimeno, Julián
Arias Cabrero, Maykel Alberto

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

INMUNOTERAPIA DE CÉLULAS NK PARA EL
TRATAMIENTO DE CÁNCER COLORRECTAL CON
MUTACIONES DE RESISTENCIA A DROGAS

Autor

Pilar M^a Lanuza Morte

Director/es

Pardo Jimeno, Julián
Arias Cabrero, Maykel Alberto

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2020

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias



**Universidad
Zaragoza**



Tesis doctoral

**Inmunoterapia de células NK para el tratamiento de
cáncer colorrectal con mutaciones de resistencia a
drogas**

Memoria presentada por

Pilar M^a Lanuza Morte

Graduada en Farmacia

Para optar al grado de Doctor por la

Universidad de Zaragoza

Octubre de 2019

Dr. **Julián Pardo Jimeno**, Doctor en Ciencias e Investigador ARAID en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA) de la Universidad de Zaragoza; y Dr. **Maykel Alberto Arias Cabrero**, Doctor en Ciencias e Investigador CSIC en el Instituto de Carboquímica (ICB)

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Inmunoterapia de células NK para el tratamiento de cáncer colorrectal con mutaciones de resistencia a drogas”**, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Zaragoza y en el Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón, y que reúne las condiciones requeridas para que su autora **Pilar M^a Lanuza Morte** pueda optar al Grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, a 21 de octubre de 2019

Fdo. Julián Pardo Jimeno

Fdo. Maykel Arias Cabreo

Este trabajo ha sido realizado gracias a una Beca de Formación de Personal Docente Investigador del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (FPU14/05432)

ABREVIATURAS

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

5-FU: 5-Fluorouracilo

7-AAD: 7-Amino-Actinomicina D

ABB: Tampón de unión de Anexina-V (del inglés, *Annexin-V Binding Buffer*)

APC: Aloficocianina (del inglés, *Allophycocyanine*)

CCR: Cáncer Colorectal

CEACAM: Molécula de Adhesión Celular relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario (del inglés, *Carcinoembryonic Antigen related Cell Adhesion Molecule*)

CTLA-4: Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico (del inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*)

CXCR3: Receptor de Quimioquina C-X-C tipo 3 (del inglés, *C-X-C chemokine receptor type 3*)

DC: Células dendríticas (del inglés, *Dendritic Cell*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

EBV: Virus Epstein-Barr

EDTA: Ácido Etilendiaminetetraacético (del inglés, *Ethylendiaminetetraacetic Acid*)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína (del inglés, *Fluorescein Isotiocyanate*)

FC: Citometría de Flujo (del inglés, *Flow Cytometry*)

Fc: Fracción constante del anticuerpo

FMO: Fluorescencia menos uno (del inglés, *Fluorescence Minus One*)

GFP: Proteína Fluorescente Verde (del inglés, *Green Fluorescent Protein*)

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (del inglés, *Human Leucoyte Antigen*)

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*)

IL: Interleuquina

I.P: Intraperitoneal

KIR: Receptores de tipo Inmunoglobulina de células NK (del inglés, *Killer Immunoglobuline-like Receptors*)

LAG-3: Gen 3 de Activación de Linfocitos (del inglés, *Lymphocyte-Activation Gen 3*)

LCL: Línea Celular Linfoblastoide (del inglés, *Lymphoblastoid Cell Line*)

Lamp-1: Proteína de Membrana Asociada a Lisosoma 1 (del inglés, *Lysosomal-Associated Membrane Protein 1*)

mAb: Anticuerpo monoclonal

ABREVIATURAS

MC: Monoclonal

MICA/B: Proteína relacionada con la cadena A y B de MHC (del inglés, *MHC class I chain-related protein A and B*)

Nec-1: Necrostatina-1

NK (célula): Célula Asesina Natural (del inglés, *Natural Killer*)

NSG™ : NOD Scid Gamma

PBMC: Célula Mononuclear de Sangre Periférica (del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBS: Tampón Fosfato Salino (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*)

PerCP: Proteína de Peridina-Clorofila (del inglés, *Peridinin-Chlorophyll-protein*)

PD-1: Molécula de Muerte Celular Programada-1 (del inglés, *Programmed Dead-1*)

PE: Ficoeritrina (del inglés, *Phycoerythrin*)

PFA: Paraformaldehído

PVR: Receptor de poliovirus (del inglés, *Poliovirus Receptor*)

RT: Temperatura ambiente

SFB: Suero Fetal Bovino

TIM-3: Receptor de células T con dominio de Inmunoglobulina y Mucina 3 (del inglés, *T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*)

ULBP: Proteína de unión UL16 (del inglés, *UL16 Binding Protein*)



ÍNDICE

1. Introducción.....	3
1.1 Sistema inmune y cáncer.....	3
1.1.1 Conceptos generales del sistema inmune	3
1.1.2 Concepto de tumor: células transformadas y microentorno tumoral	4
1.1.3 Teoría de la inmunovigilancia	9
1.1.3.1 <i>El ciclo de la inmunidad antitumoral</i>	10
1.1.4 Inmunoedición y evasión del sistema inmune	12
1.1.4.1 <i>Mecanismos de evasión del sistema inmune</i>	14
1.2 Células NK.....	16
1.2.1 Desarrollo de las células NK humanas.....	16
1.2.1.1 <i>Células NK: un tipo de célula linfoide innata (ILC)</i>	18
1.2.2 Subgrupos de células NK	19
1.2.3 Receptores de las células NK.....	21
1.2.3.1 <i>Receptores de adhesión</i>	21
1.2.3.2 <i>Receptores de Inhibición</i>	22
1.2.3.3 <i>Receptores de activación</i>	23
1.2.3.4 <i>Receptores de citoquinas y quimiocinas</i>	26
1.2.4 Educación, tolerancia y homeostasis de células NK.....	26
1.2.5 Activación de células NK.....	28
1.2.6 Mecanismos efectores de las células NK.....	30
1.2.6.1 <i>Liberación de citoquinas</i>	30
1.2.6.2 <i>Vía de los ligandos de muerte</i>	30
1.2.6.3 <i>Vía de la exocitosis granular</i>	31
1.2.7 Células NK en el microentorno tumoral	36
1.3. Inmunoterapia	37
1.3.1 Inmunoterapia activa	37
1.3.1.1 <i>No específica. Moduladores del sistema inmune</i>	37
1.3.1.2 <i>Específica</i>	39
1.3.1.2 a <i>Vacunas</i>	39
1.3.1.2 b <i>Anticuerpos reguladores de puntos de control del sistema inmune</i>	40
1.3.2 Inmunoterapia pasiva.....	41
1.3.2.1 <i>Específica. Anticuerpos antitumorales</i>	41
1.3.2.2 <i>Virus oncolíticos</i>	43
1.3.2.3 <i>Inmunoterapia celular adoptiva</i>	43
1.3.2.3 a <i>Inmunoterapia celular adoptiva no específica</i>	43
1.3.2.3.b <i>Inmunoterapia celular adoptiva específica</i>	44

1.3.3	Inmunoterapia basada en células NK.....	47
1.3.3.1	<i>Inmunoterapia celular adoptiva con células NK.....</i>	47
1.3.3.1 a	<i>Fuentes de células NK.....</i>	48
1.3.3.1 b	<i>Protocolos de activación y expansión de células NK.....</i>	50
1.3.4	Retos de la inmunoterapia.....	52
1.4	Cáncer colorrectal.....	53
1.4.1	Patogenia del CCR: carcinogénesis y metástasis.....	53
1.4.2	Clasificación del CCR.....	56
1.4.2.1	<i>Principales alteraciones moleculares.....</i>	57
1.4.3	Interacción tumor-microentorno.....	59
1.4.4	Tratamientos del cáncer colorrectal.....	61
1.5	Modelos tridimensionales para el estudio de tumores sólidos.....	65
1.5.1	Propiedades biológicas y físico-químicas de los cultivos 3D.....	65
1.5.2	Clasificación de los modelos 3D.....	67
1.5.3	Métodos de generación de esferoides.....	68
1.5.3.1	<i>Métodos sin scaffolds.....</i>	69
1.5.3.2	<i>Métodos basados en scaffolds.....</i>	70
2.	Antecedentes y objetivos.....	73
3.	Materiales y métodos.....	79
3.1	Cultivos celulares.....	79
3.1.1	Líneas celulares.....	79
3.1.1.1	<i>Detección y eliminación de micoplasmas.....</i>	79
3.1.1.2	<i>Establecimiento y mantenimiento de cultivos convencionales.....</i>	80
3.1.1.3	<i>Establecimiento y mantenimiento de cultivos tridimensionales.....</i>	81
3.1.2	Células NK primarias.....	83
3.1.2.1	<i>Aislamiento de PBMCs.....</i>	84
3.1.2.2	<i>Generación de células NK activadas a partir de PBMCs.....</i>	84
3.1.2.2.a	<i>Activación a corto plazo de PBMCs de donantes sanos.....</i>	84
3.1.2.2.b	<i>Activación y expansión de PBMCs de donantes sanos.....</i>	85
3.1.2.2.c	<i>Activación a corto plazo de PBMCs de donantes sanos con mAbs inmunomoduladores.....</i>	87
3.1.2.2.d	<i>Activación de PBMCs de pacientes con cáncer.....</i>	87
3.1.2.3	<i>Obtención de células NK.....</i>	87
3.1.3	Recuento y viabilidad celular.....	88
3.2	Análisis de viabilidad celular mediante PrestoBlue®.....	88
3.3	Análisis por citometría de flujo.....	89

3.3.1	Citotoxicidad mediada por células NK.....	89
3.3.1.1	<i>Marcaje de células NK con sonda fluorescente</i>	89
3.3.1.2	<i>Co-cultivo de células NK y células diana</i>	89
3.3.1.3	<i>Evaluación de las vías de muerte celular implicadas en la citotoxicidad mediada por células NK</i>	90
3.3.1.4	<i>Citotoxicidad mediada por células NK en combinación con anticuerpos inhibidores de checkpoints</i>	90
3.3.1.5	<i>Análisis de los parámetros de muerte celular</i>	91
3.3.2	Ensayo de degranulación de células NK: movilización de CD107a.....	91
3.3.2.1	<i>Determinación de la degranulación de las células NK en combinación con anticuerpos inhibidores de checkpoints</i>	93
3.3.3	Determinación de la expresión de proteínas	93
3.3.3.1	<i>Análisis de proteínas de superficie celular</i>	93
3.3.3.2	<i>Análisis de proteínas intracelulares</i>	94
3.3.4	Tratamiento de datos.....	94
3.4	Ensayos de microscopía de fluorescencia	97
3.4.1	Análisis de la eliminación del esferoide por microscopía convencional de fluorescencia. 97	
3.4.2	Análisis de la penetración de células NK en el esferoide por microscopia confocal.....	97
3.4.3	Tratamiento de datos.....	98
3.5	Modelo de xenotrasplante tumoral en ratón y análisis de la actividad antitumoral de células NK expandidas	99
3.5.1	Modelo animal	99
3.5.2	Terapia adoptiva de células NK alogénicas activadas	99
3.5.2.1	<i>Evaluación del desarrollo tumoral en modelo ectópico</i>	99
3.5.2.2	<i>Evaluación del tratamiento con células NK alogénicas</i>	99
3.6	Análisis estadístico	100
4.	Resultados y discusión	105
4.1	Caracterización de los cultivos celulares de CCR	105
4.1.1	Establecimiento de los cultivos de las líneas celulares de CCR	106
4.1.2	Análisis de los ligandos de células NK en cultivos 2D y 3D.....	109
4.1.3	Análisis de la sensibilidad a tratamientos de quimioterapia.....	116
4.1.4	Discusión.....	117
4.2	Evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares de CCR ataque de las células NK alogénicas	124
4.2.1	Estudio de citotoxicidad frente a cultivos 2D.....	124
4.2.2	Estudio de citotoxicidad frente a cultivos 3D.....	128
4.2.3	Co-relación entre la sensibilidad de las líneas de CCR y la expresión de ligandos...	135

4.2.4	Estudio de la degranulación de las células NK	139
4.2.5	Estudio de los mecanismos de muerte celular activados por las células NK	140
4.2.6	Discusión.....	142
4.3	Evaluación de protocolos de activación y expansión de las células NK alogénicas	148
4.3.1	Identificación del mejor protocolo de expansión	148
4.3.2	Caracterización de las células NK expandidas.....	150
4.3.2.1	<i>Análisis del fenotipo de las células NK expandidas</i>	<i>150</i>
4.3.2.2	<i>Análisis de la citotoxicidad de las células NK expandidas</i>	<i>152</i>
4.3.3	Evaluación de la expansión de células NK en ausencia de linfocitos T	153
4.3.4	Evaluación de la expresión de receptores en las células NK expandidas	156
4.3.5	Efecto del bloqueo de <i>checkpoints</i> con mAbs sobre la actividad de células NK de donantes sanos	160
4.3.5.1	<i>Evaluación de la citotoxicidad de las células NK alogénicas activadas en combinación con bloqueantes de checkpoints</i>	<i>160</i>
4.3.5.2	<i>Evaluación de la citotoxicidad de las células NK alogénicas activadas en presencia de un mAb bloqueante del eje PD-1/PD-L1 (Pembrolizumab).....</i>	<i>163</i>
4.3.6	Bloqueo del eje PD-1/PD-L1 en células NK de pacientes con CCR.....	165
4.3.7	Discusión	167
4.4	Evaluación de la capacidad anti-tumoral de las células NK alogénicas expandidas sobre CCR en un modelo de xenotrasplante en ratón.....	177
4.4.1	Tratamiento de tumores subcutáneos de líneas celulares de CCR con células NK expandidas	177
4.4.2	Discusión.....	180
5.	Conclusiones.....	185
6.	Bibliografía.....	191
ANEXOS.....	227	
<i>ANEXO 1 - Reactivos</i>	<i>227</i>	
<i>ANEXO 2- Paneles para el análisis multiparamétrico de los marcadores de las células NK mediante citometría de flujo</i>	<i>228</i>	
<i>ANEXO 3- Expresión de ligandos de las células NK</i>	<i>230</i>	

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Sistema inmune y cáncer

1.1.1 Conceptos generales del sistema inmune

El sistema inmune es el encargado de proteger la **integridad** del organismo en infecciones y enfermedades. Tradicionalmente, la organización del sistema inmune se ha dividido en **dos partes**: inmunidad innata e inmunidad adaptativa. Sin embargo, a nivel fisiológico, las dos partes se encuentran interrelacionados de forma dinámica, lo que permite combinar las características de cada uno de ellos, para una defensa más eficaz. (1)

El **sistema inmune innato** parte de barreras fisiológicas como la piel y las mucosas y, a través de sus componentes celulares y mediadores solubles, genera una primera respuesta rápida y poco específica. En esta respuesta se reconocen estructuras compartidas por los agentes patógenos (PAMPs; del inglés *Pathogen Associated Molecular Patterns*) a través de receptores (PRR; del inglés, *Pattern Recognition Receptor*) del organismo. A él pertenecen células citotóxicas como las células asesinas naturales (NK; del inglés, *Natural Killer*), o fagocíticas como los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas (DC; del inglés, *Dendritic Cell*). Además, debido a esta respuesta innata se desencadenan mecanismos de defensa como la inflamación, que ayuda a activar y modular el **sistema inmune adaptativo**. Así se entiende que la inmunidad adaptativa se genere de forma retardada. Sin embargo, presenta una amplia diversidad de reconocimiento antigénico, debido a un proceso de reorganización somática en los genes de los receptores de sus tipos celulares. A ella pertenecen los linfocitos T, que median la respuesta inmunitaria celular; y los linfocitos B, que desencadenan la respuesta inmunitaria humoral basada en anticuerpos. Su activación específica da lugar a una expansión clonal de los linfocitos que reconocen el antígeno (epítipo), los cuales adquieren memoria inmunológica, permitiendo una respuesta más eficiente tras un segundo encuentro con el antígeno. (2)

En definitiva, el conjunto de mecanismos implicados en la respuesta inmune proporcionan una defensa del organismo al reconocer y eliminar agentes patógenos, ya sean exógenos o endógenos.

1.1.2 Concepto de tumor: células transformadas y microentorno tumoral

Los tumores son agentes endógenos que suponen un peligro para el organismo. Para entender por qué suponen un riesgo y qué papel adopta el sistema inmune frente a ellos, surge primero la pregunta: ¿qué es una célula tumoral, y en qué se diferencia de una célula normal?

Las células tumorales son **células transformadas**, que presentan moléculas de estrés o un perfil antigénico distinto al de las células normales. La aparición de estas células se debe a la acumulación de mutaciones y otras alteraciones del material génico, por ejemplo, a nivel del epigenoma (3). Tal y como describieron Hanahan y Weinberg en 2011 (Figura 1.1), se han identificado dos principales factores que contribuyen a la consolidación de estas alteraciones: la inestabilidad genómica y la inflamación crónica (4). Normalmente, las células cuentan con la maquinaria apropiada para la reparación del DNA, así como otros sistemas de vigilancia de la integridad genómica que conducen a las células dañadas a un estado de senescencia o a apoptosis (5). Sin embargo, hay ocasiones en que la célula consigue superar estos mecanismos y desarrolla unas características biológicas que le confieren ventajas para sobrevivir, multiplicarse y diseminarse a otros órganos y tejidos. Estas características se conocen como los *hallmarks* del cáncer (Figura 1.1), descritos por primera vez en 2000 (6).

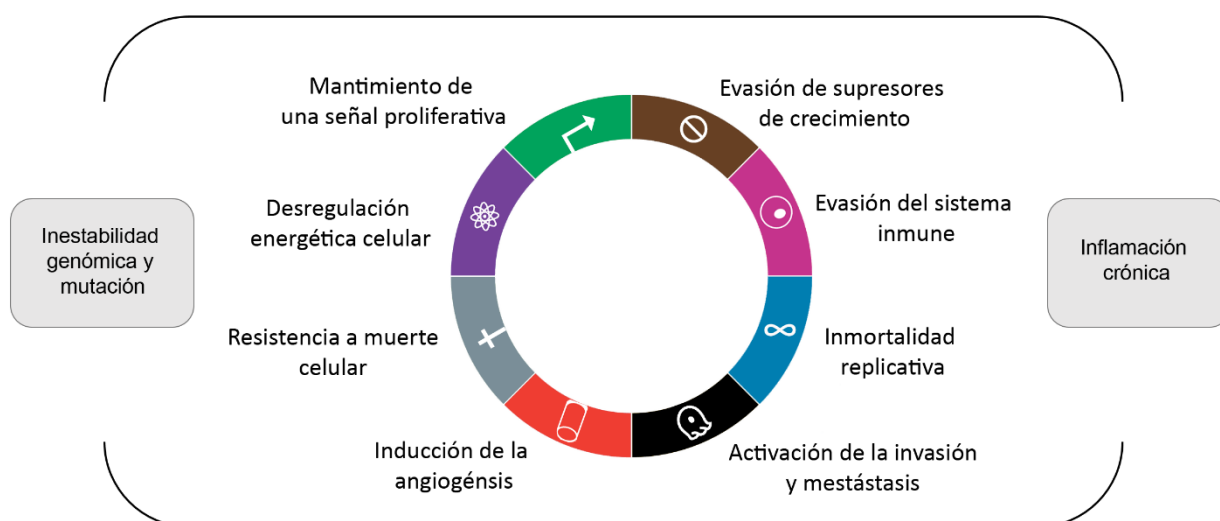


Figura 1.1 Características del cáncer. La inestabilidad genómica y la inflamación crónica son dos factores promotores del cáncer que ayudan a adquirir las ocho características o *hallmarks*, que confieren ventajas a las células tumorales. Elaboración propia, basada en la figura de Hanahan y Weinberg, 2011 (4).

Por otro lado, y con un enfoque más particular en los tumores sólidos, es necesario considerar que éstos son órganos complejos que van más allá de las células transformadas. (4) A su alrededor existen diversos componentes, que conforman el denominado **estroma tumoral**, con los que se encuentran en una continua interacción (Figura 1.2) (7). Estos componentes generan un “**microentorno tumoral**” (TME, del inglés; *Tumor Microenvironment*), que favorece el desarrollo y la progresión del tumor y consolidan los *hallmarks* del cáncer; entre ellos, la capacidad de evadir el ataque del sistema inmune. (7)

- Matriz extracelular (ECM, del inglés, *Extracellular Matrix*):

Es una **matriz alterada**, que se caracteriza por ser más densa. Se debe a una fibrosis del estroma por el depósito de fibras de colágeno que, además, modifican su entrecruzamiento. Este fenómeno se ha asociado a una disminución de la infiltración linfocitaria y a un mal pronóstico (8).

- Componente celular

El TME presenta un conjunto de **linfocitos infiltrantes** de carácter antitumoral o inmunoregulador. Dentro del primer grupo, se encuentran los linfocitos T CD8⁺ activados y específicos de antígenos tumorales, **linfocitos Tc** (linfocitos T citotóxicos) y **Tc de memoria** (CD8⁺CD45^{RO}); así como los linfocitos CD4⁺ tipo T_{H1} (del inglés, *T helper 1*) que liberan IL-2 (Interleuquina 2) e IFN-γ (Interferón γ). También puede haber un infiltrado de **células NK y NKT** (del inglés, *Natural Killer T*), aunque su efecto se ha visto más implicado en las primeras fases del desarrollo tumoral. La presencia de todas estas poblaciones se asocia a un buen pronóstico (9). Dentro del grupo de linfocitos inmunoregulares se encuentran otras poblaciones de linfocitos T CD4⁺ como T_{H2}, T_{H17} y **Treg** (T reguladoras), que impiden la acción antitumoral y se asocian a mal pronóstico (7, 9). Finalmente, los **linfocitos B** suelen encontrarse en ganglios linfáticos y estructuras linfoides próximas al tumor. Su papel cuando infiltran el tumor no está claro, aunque se han asociado a buen pronóstico en humanos (10). Entre ellos, se han identificado distintas poblaciones como por ejemplo los linfocitos inmunosupresores **Breg** (11).

También existe un compartimento de células **mieloides**. Asociada al tumor se encuentra una población de DCs, alterada debido a la hipoxia y el ambiente inflamatorio. Estas DCs, denominadas **DCs tolerogénicas**, no pueden presentar correctamente los antígenos y liberan moléculas inmunomoduladoras comoIDO (indoleamina 2,3-dioxigenasa) o TGF-β (del inglés,

INTRODUCCIÓN

Transforming Growth Factor-β). Es por ello que pueden inhibir la respuesta de linfocitos efectores (apartado 1.1.4.1) (12, 13). Por otro lado, las **MDSC** (del inglés, *Myeloid-derived supresor cells*) son células mieloides inmaduras que inhiben la activación de los linfocitos T, a través de las enzimas óxido nítrico sintasa y arginasa, (14) e inducen el desarrollo de los linfocitos Treg y la polarización de los macrófagos a su fenotipo M2 (15). Los **TAMs** (del inglés, *Tumor Associated Macrophages*) son una población abundante que evolucionan de un fenotipo M1, asociado al rechazo tumoral, a un fenotipo protumoral M2 que favorece la angiogénesis, (16) la migración, la invasión y la metástasis (17). Así, están asociados con un mal pronóstico (7).

Del mismo modo que ocurre con los macrófagos, existe una población de **neutrófilos**, denominada TAN (del inglés, *Tumor Associated Neutrophils*), que polarizan a su fenotipo protumoral N2 mediando angiogénesis (18), metástasis por degradación de la ECM (19) e inmunosupresión (20).

Dentro de las células **estromales**, las **MSC** (del inglés, *Mesenchymal Stem Cells*) son células derivadas de la médula ósea que contribuyen a la inmunosupresión (8). Los **CAFs** (del inglés, *Cancer Associated Fibroblasts*), son miofibroblastos que pueden derivar de las MSC, células endoteliales, mioepiteliales etc. (7) Segregan factores de crecimiento que estimulan a las células tumorales, TGF-β, componentes de la ECM y enzimas remodeladoras (21). Además, se relacionan con un ambiente inflamatorio que favorece la progresión tumoral (22).

Las condiciones de hipoxia y las señales angiogénicas del tumor, o de las células inflamatorias, inducen a las **células de la vasculatura** a crear nuevos vasos. (23) Éstos se caracterizan por su porosidad, su estructura irregular (24) y cambios en la expresión de moléculas de adhesión que dificultan la llegada de linfocitos circulantes, por ejemplo disminuyendo ICAM (del inglés, *Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM (del inglés, *Vascular Cell Adhesion Molecule*) y E-selectina (25). Además, los **pericitos** son células estromales perivasculares cuya disminución en el recubrimiento vascular se asocia a metástasis y EMT (del inglés, *Epithelial to Mesenchymal Transition*) (23). Por otro lado, el tumor y los macrófagos dirigen la creación de nuevos **vasos linfáticos** a través de factores de crecimiento, lo que favorece la diseminación tumoral (26).

Finalmente, otros tipos celulares, como lo **adipocitos**, liberan adipoquinas que reclutan células malignas, y proporcionan ácidos grasos que promueven su crecimiento (7).

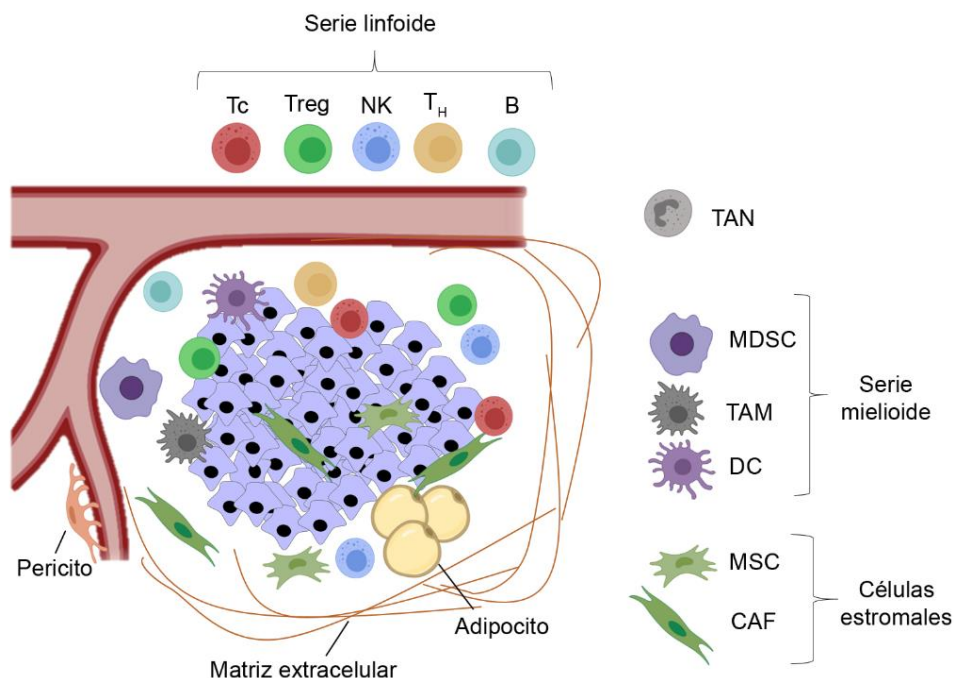


Figura 1.2 Microentorno tumoral. El estroma asociado al tumor está formado por componentes celulares, así como por factores solubles y una matriz extracelular alterada.

- Factores solubles:

Los **factores de crecimiento** pueden estar asociados a proliferación tumoral, como el EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*) o el FGF (del inglés, *Fibroblast Growth Factor*) (27); a la vascularización, como el VEGF (del inglés, *Vascular endothelial Growth Factor*) y a otras funciones (28). Entre ellos, destaca el **TGF- β** . Actúa como supresor tumoral antes de la consolidación del mismo. Pero una vez ya está establecido, favorece la metástasis promoviendo la transición EMT (29) y endotelial-mesenquimal (30). También induce la reorganización de la matriz extracelular (31, 32), la angiogénesis (33) y la inmunosupresión de células inmunes como linfocitos Tc y células NK (34).

Las **citoquinas** están asociadas a los distintos perfiles inmunitarios: inflamatorio, antitumoral o T_{H1} (IFN- γ , TNF- α [del inglés *Tumor Necrosis Factor α*], IL-2, IL-12, IL-18, IL-6); e

inmunosupresor, protumoral o T_{H2} (COX2 [Ciclooxigenasa 2], PGE2 [Prostaglandina E2], IL-4, IL-6, IL-8, IL-10) (35).

Las **quimiocinas** están implicadas en la regulación de los tipos celulares que son atraídos al TME (9, 36). Por ejemplo, la expresión de CX3CL1 y CXCL9/10 atrae al conjunto de linfocitos asociado a un perfil antitumoral, como se ha definido anteriormente (37, 38). Sin embargo, muchos tumores inducen un cambio desde el perfil T_{H1} al perfil T_{H2} (28). La expresión de CCL2/4/5 atrae a células mieloides como MDSC (39); y la de CCL22 a linfocitos Treg (40). Además, la expresión de CXCL12 impide la llegada de los linfocitos T (41), y la de CXCL13 atrae a los linfocitos B y células plasmáticas inmunosupresoras (42).

Finalmente, las células del estroma también son responsables de liberar **enzimas remodeladoras** de la matriz como MMPs (metaloproteasas), catepsinas y otras serín proteasas (8).

Estas características del EMT han hecho que se convierta en una diana hacia la que se están dirigiendo nuevas estrategias terapéuticas. Así, actualmente se están buscando tratamientos dirigidos específicamente a los distintos componentes y moléculas. Por ejemplo, inhibidores de la angiogénesis (frente a VEGF; del inglés, *Vascular Endothelial Growth Factor*), agonistas de receptores de citoquinas y quimiocinas (7), o anticuerpos monoclonales frente a receptores y ligandos involucrados en la inmunosupresión (frente a CTLA-4 o PD-1; tal y como se explica en el apartado 1.3.1.2b) (9).

1.1.3 Teoría de la inmunovigilancia

La primera idea de que el sistema inmune ejerce un control sobre la aparición de los tumores fue propuesta por Ehrlich a principios del siglo XX (43). Pero fue 50 años más tarde cuando Burnet y Thomas expusieron la **hipótesis de la inmunovigilancia** (44-46). Todavía sin evidencias experimentales propusieron que, de manera natural, los linfocitos eran capaces de detectar y eliminar las células transformadas de manera espontánea. Posteriormente, esta hipótesis se mantuvo en debate por la falta de pruebas concluyentes (47, 48) y la concepción de los tumores espontáneos como algo “propio”, a lo que el sistema inmune presentaba tolerancia (1).

Las pruebas experimentales que llevaron a confirmar la teoría de la inmunovigilancia llegaron en los años 90 gracias a los avances en la tecnología de anticuerpos monoclonales y genética de ratones (49). En primer lugar se observó que, ratones deficientes en perforina, un componente fundamental de los gránulos citotóxicos de linfocitos Tc y células NK, presentaban una mayor incidencia de tumores espontáneos que los controles de su misma estirpe (50). El mismo resultado se obtuvo para tumores inducidos con el carcinógeno MCA (metilcolantreno) (51). Además, esta observación resultó tanto para tumores que expresaban MHC-I (del inglés, *Major Histocompatibility Complex-I*) y que debían ser reconocidos por linfocitos Tc; como para tumores carentes de MHC-I y que debían ser eliminados sólo por células NK, según ya habían mostrado trabajos anteriores (52). Pero los experimentos determinantes fueron los desarrollados por Shankranan (53) y Smyth (54) utilizando ratones RAG1^{-/-} o RAG2^{-/-} (del inglés, *Recombination-Activating Gene-1/2*), que no pueden llevar a cabo la recombinación somática de los receptores de linfocitos T y B pero sin afectación de la maquinaria de reparación del DNA (55). Así, demostraron que los ratones deficientes eran más susceptibles a la aparición de tumores espontáneos (53) o inducidos con MCA que los controles de su estirpe (53, 54). Estudios adicionales, acerca las poblaciones celulares implicadas en el control tumoral, determinaron un papel relevante para los linfocitos T $\alpha\beta$ y T $\gamma\delta$, (56, 57) y las células NK y NKT (54, 58). Finalmente, se demostró la contribución tanto del IFN- γ como de los gránulos citotóxicos como mecanismos de acción antitumoral de estas células efectoras. (50, 53, 58, 59).

1.1.3.1 *El ciclo de la inmunidad antitumoral*

A partir de los datos obtenidos, que apoyaban la vigilancia antitumoral del sistema inmune, se fue desarrollando un modelo que integrara todo el proceso. (43) Finalmente, este modelo pasó a denominarse como “**el ciclo de la inmunidad antitumoral**” (Figura 1.3) (60).

Cuando empieza a formarse un tumor, los daños que se producen en los tejidos circundantes generan “**señales de peligro**” que desencadenan la respuesta inmune (61). Por ejemplo, la remodelación del estroma induce la liberación de citoquinas proinflamatorias. Aunque también puede ocurrir que durante las primeras etapas del tumor, éste no genere ningún daño y, por lo tanto, crezca de manera silenciosa para el sistema inmune. Las señales de peligro, así como quimiocinas liberadas por el propio tumor, atraen principalmente a células de la inmunidad innata como macrófagos y células NK y NKT, además de a linfocitos $T\gamma\delta$ (1, 43) Por otro lado, las DCs inmaduras y los macrófagos residentes del tejido pueden detectar señales de peligro que promueven su diferenciación y maduración.

El entorno de “estrés”, debido a la inflamación y al fenotipo alterado de las células tumorales, desencadena la actividad de las células inmunes. Cuando las células NK reconocen ligandos de estrés, y cuando las células NKT y los linfocitos $T\gamma\delta$ reconocen antígenos tumorales, liberan IFN- γ . Esta citoquina actúa induciendo un **ambiente pro-inflamatorio** local, con la liberación de nuevas quimiocinas (62); la sobreexpresión de HLA-I (63) y de Fas en el tumor (64); la inhibición del crecimiento celular (65) y la muerte por apoptosis de las células tumorales (64, 66, 67); un efecto angiostático (68); y la activación de macrófagos y células NK. Estas células activadas son capaces de destruir algunas células tumorales, liberando cuerpos apoptóticos y material celular tumoral que es fagocitado por DCs inmaduras y macrófagos (Figura 1.3, etapa 1)

La fagocitosis permite la captación de **antígenos tumorales**, su procesamiento y su presentación en moléculas de MHC-II o de MHC-I, a través del fenómeno de presentación cruzada. Las células presentadoras de antígeno (APC; del inglés, *Antigen Presenting Cell*) activadas secretan citoquinas como la IL-12, IL-15 (69) e IFN- α (70) que contribuyen a la activación y quimiotaxis de las células NK. Se produce entonces un bucle de retroalimentación positiva entre los macrófagos y las células NK, mediante la producción de IL-12 e IFN- γ respectivamente (71).

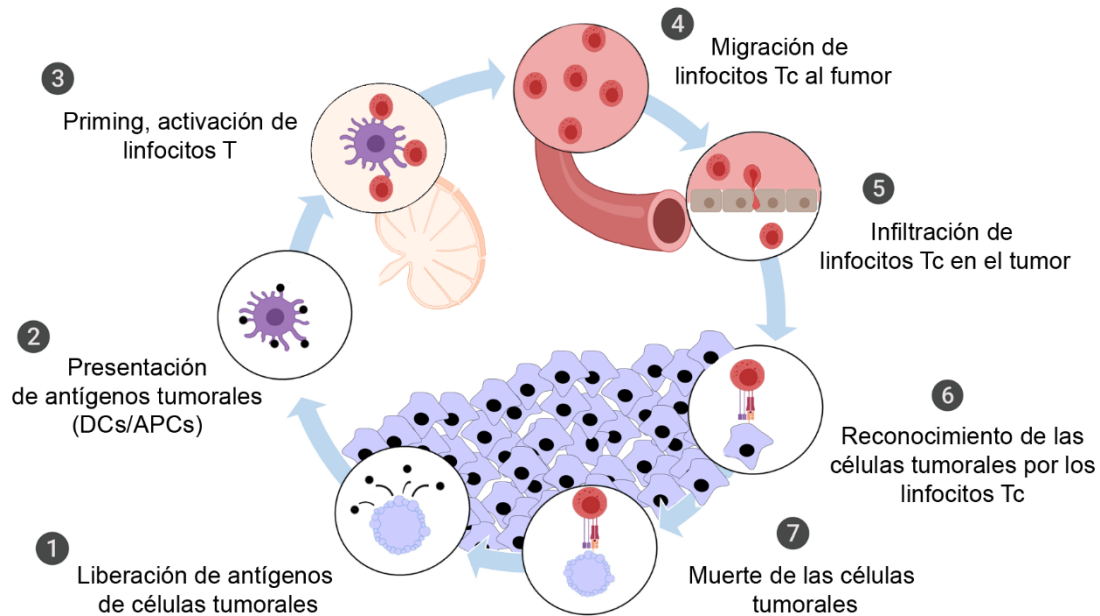


Figura 1.3 El ciclo de la inmunidad antitumoral. Elaboración propia, basada en la figura de Chen y Mellman, 2013 (60).

Las células presentadoras de antígeno **migran** a los ganglios linfáticos y activan linfocitos $T_{H1} CD4^+$, que intervienen en la generación de linfocitos Tc (Figura 1.3, etapas 2 y 3) (72). Estos **linfocitos específicos** del tumor migran hasta el lugar de su localización gracias a un gradiente de quimiocinas (Figura 1.3, etapas 4 y 5). Finalmente, los linfocitos Tc reconocen el antígeno tumoral específico asociado al MHC-I de las células transformadas a través de su TCR (del inglés *T Cell Receptor*), e inducen la muerte de las células tumorales a través de sus **mecanismos citotóxicos** (Figura 1.3, etapas 6 y 7). Gracias al aporte de IL-2 por parte de los linfocitos $T CD4^+$, y la IL-15 presente en el entorno, se favorece la función y viabilidad de estos linfocitos Tc intratumorales. La liberación de nuevos antígenos tumorales debido a la muerte inducida por los linfocitos genera un nuevo inicio del ciclo, amplificándose la respuesta (43).

1.1.4 Inmunoección y evasión del sistema inmune

Hasta el momento se ha mostrado el papel protector del sistema inmune en las primeras etapas del desarrollo tumoral. Sin embargo, la relación entre el sistema inmune y el cáncer va más allá del proceso de inmunovigilancia (49). Así, el concepto de **inmunoección** surge de la idea de que el sistema inmune es capaz de modular la inmunogenicidad del tumor a lo largo de su desarrollo (Figura 1.4; Shankaran et al. 2001) (53).

Esta hipótesis se comprobó a través de estudios que utilizaban un modelo de trasplante tumoral entre ratones inmunocompetentes e inmunocomprometidos. En ellos se observó que los tumores provenientes de ratones inmunocomprometidos eran más inmunogénicos, de manera que eran rechazados al trasplantarlos en ratones inmunocompetentes (53, 58, 73-75).

Por su parte, estudios epidemiológicos también han evidenciado este proceso en humanos. Por ejemplo, se ha observado que individuos inmunocomprometidos (tras un trasplante o pacientes con SIDA) presentan una mayor probabilidad de desarrollar cáncer. Por otro lado, también existe una relación entre la presencia de linfocitos infiltrantes en el tumor y el pronóstico del paciente. Y además, se han detectado respuestas específicas frente a antígenos tumorales que originan anticuerpos o linfocitos T (76).

De este modo se consideró que la relación entre el sistema inmune y el tumor consistía en un proceso dinámico de 3 fases (53, 77, 78):

I. La fase de **eliminación**, que se corresponde con la inmunovigilancia.

II. La fase de **equilibrio** se desencadena tras una eliminación incompleta del tumor. En ella, el sistema inmune es capaz de mantenerlo en estado latente. En este caso, es el sistema inmune adaptativo, a través de linfocitos T e IFN- γ , el encargado de controlar el crecimiento tumoral (79). Es la fase más larga, que puede durar años, y se consideran tres vías de evolución: la eliminación final del tumor, el mantenimiento de la fase de equilibrio, o el escape del sistema inmune. Para este último escenario hay que considerar que, debido a la gran tasa de mutación y la plasticidad de las células transformadas, existe heterogeneidad en la masa tumoral (80). Así, durante la interacción entre el tumor y el sistema inmune surgen clones celulares menos

INTRODUCCIÓN

inmunogénicos, resistentes al ataque. Posteriormente, estos clones siguen evolucionando en el contexto de una presión inmune que intentan evadir, por lo que se considera que existe una selección e **inmunoedición** del tumor (43, 78).

III. La fase de **escape** supone el crecimiento final del tumor, que ha escapado al control de la fase de equilibrio. En este sentido, la inmunogenicidad del tumor consolidado depende de la presión inmune a la que estuvo expuesto durante la fase anterior (43, 78).

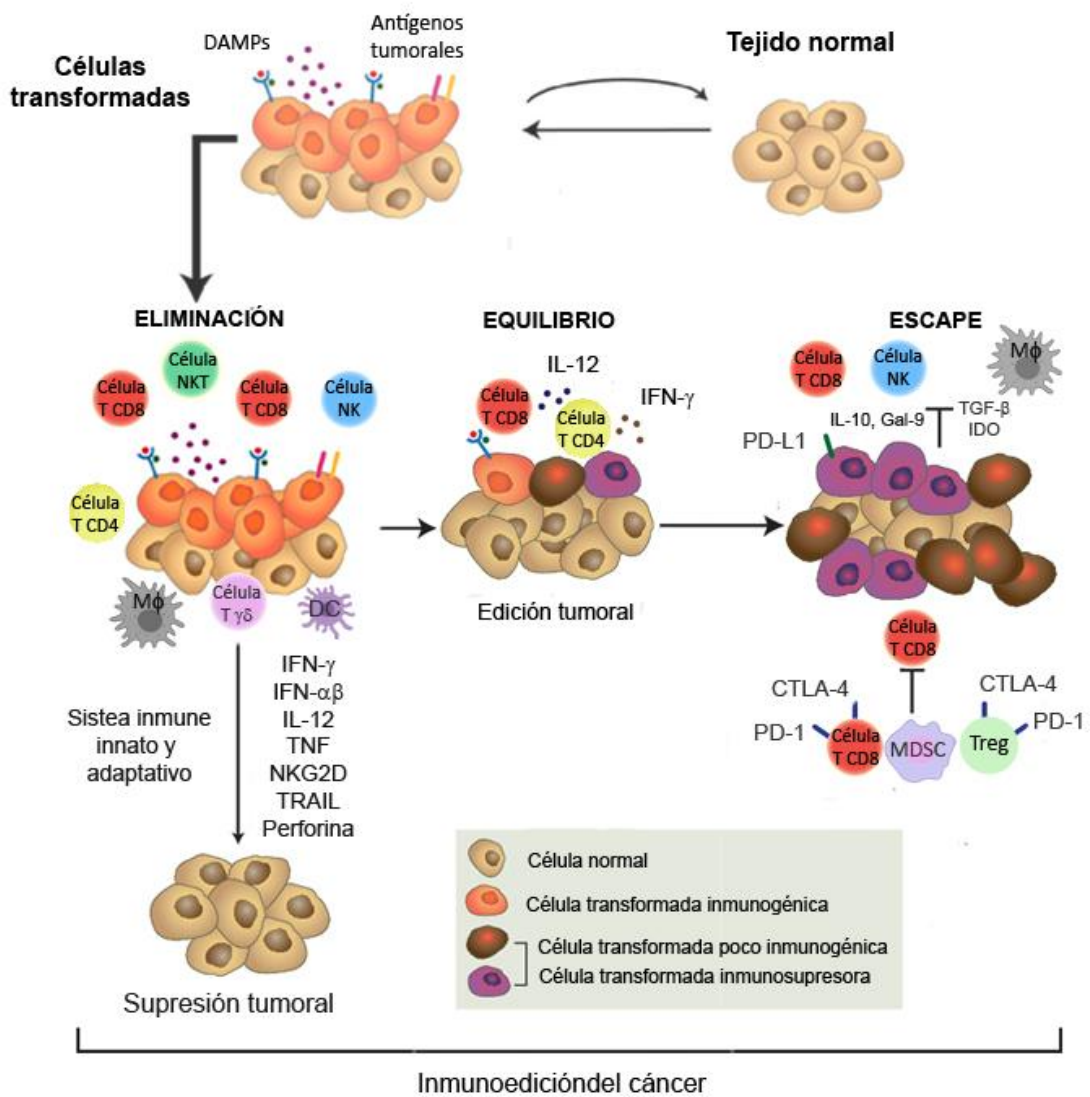


Figura 1.4 Las tres “Es” del cáncer, que comprenden los procesos de eliminación, equilibrio y escape englobados en la teoría de la inmunoedición del cáncer. Adaptada de la figura de Schreiber et al, 2011 (76).

1.1.4.1 Mecanismos de evasión del sistema inmune

Se han observado distintos **mecanismos de evasión** al ataque del sistema inmune, que comprometen la detección o la eliminación de las células transformadas. Éstos se han clasificado en dos categorías:

- Mecanismos de evasión intrínsecos al tumor

- Pérdida de la antigenicidad:

Las células tumorales pueden **disminuir la expresión de antígenos** o sufrir mutaciones que afecten a los epítomos antigénicos (81-83).

La disminución o pérdida de **expresión de HLA-I** se ha observado en multitud de tumores (84). Como consecuencia, se ve impedido el reconocimiento antigénico por parte de los linfocitos Tc. Por el contrario, se ha observado la sobreexpresión de moléculas no clásicas como HLA-E o HLA-G que pueden afectar a otras poblaciones inmunitarias (85, 86).

También los defectos en el **receptor de IFN- γ** hacen que las células tumorales no puedan sobreexpresar HLA-I como consecuencia de la estimulación con la citoquina (63).

Otros defectos pueden afectar a la expresión de genes relacionados con la proteína de la **maquinaria de presentación antigénica**: TAP1 (del inglés, *Transporter associated with Antigen Processing*), subunidades LMP2/7 (del inglés, *Low Molecular Weight Protein*) del inmunoproteasoma y β 2-microglobulina (43, 49, 87).

- Pérdida de la inmunogenicidad:

Las células tumorales inducen **tolerancia** en los linfocitos T debido a la falta de moléculas de co-estimulación y la sobreexpresión de moléculas de inhibición como PD-L1 (del inglés, *Programmed Death Ligand-1*), gal-9 (galectina-9) o VISTA (del inglés, *V-domain Ig suppressor of T-cell activation*) (88-90).

- Resistencia a la muerte celular

Se ha observado una disminución en la expresión de **los receptores de muerte** como Fas y TRAIL, así como alteraciones en otras proteínas implicadas en las vías de muerte celular, que disminuyen la sensibilidad a las células inmunes efectoras (91, 92).

- Mecanismos de evasión extrínsecos al tumor

- Liberación de moléculas inmunosupresoras

Las células tumorales liberan **citoquinas** como la IL-10, el TGF- β , la prostaglandina E2 o el VEGF, que inhiben a distintas células inmunes como DCs, linfocitos Tc y células NK. Además, estas citoquinas modulan la formación de un microentorno con poblaciones inmunosupresoras, como se explica más adelante. (34, 93)

También se han detectado otras moléculas solubles inhibitorias como la **IDO**, que afecta a la acción de las células efectoras. Esta enzima cataliza el metabolismo del triptófano a quineurina. En consecuencia, las células inmunes carecen de éste aminoácido esencial y además se ven afectados por los efectos citotóxicos de la quineurina. Por el contrario, la quineurina promueve la diferenciación de los linfocitos Treg (94).

Otra forma de inhibir la activación de las células efectoras consiste en la liberación de **formas solubles de ligandos** de los receptores de activación, que quedan bloqueados. Por ejemplo, formas solubles de MIC (95).

Finalmente, las células tumorales pueden “contra-atacar” al sistema inmune liberando moléculas como **Fas-L**, que induce la apoptosis de las células efectoras (96).

- Formación de un microentorno pro-tumoral

Como se ha explicado (apartado 1.1.2), los tumores pueden definir el conjunto de **poblaciones celulares del microentorno**. Por ejemplo, mediante la liberación de distintas quimiocinas reclutan macrófagos, MDSC o linfocitos Treg (97). Además, el TGF- β induce la conversión de los linfocitos T CD4⁺ infiltrados en el tumor en linfocitos Treg. Igualmente, induce la polarización de neutrófilos y macrófagos a su fenotipo pro-tumoral (N2 o M2, respectivamente). Todas estas poblaciones celulares actúan inhibiendo la acción de las células efectoras (34).

1.2 Células NK

Las células NK son **linfocitos granulares** grandes que tienen la capacidad de reconocer y eliminar células infectadas por virus y células tumorales (98, 99). Fueron descritas por primera vez en los años 70 (Herberman y Kiessling) como un tipo de linfocitos que eran capaces de inducir una **citotoxicidad espontánea**, sin necesidad de inmunización previa (100, 101). También, a diferencia de los linfocitos T, mostraron no estar restringidas por MHC-I (102). Gracias a esta citotoxicidad natural, las células NK se encuadraron dentro del **sistema inmune innato** (1). Sin embargo, no sólo se caracterizan por su capacidad lítica, sino que también son capaces de producir **citoquinas y quimiocinas** en respuesta a distintos estímulos (103, 104). A través de este intercambio de moléculas solubles, y de interacciones directas a través de moléculas de superficie, las células NK también ejercen una **actividad reguladora** (105). Intervienen en la homeostasis, activación y maduración de células dendríticas, macrófagos y linfocitos T. De este modo modulan la respuesta adaptativa, son capaces de polarizar hacia una respuesta T_{H1} e intervienen en la protección frente a reacciones autoinmunes (105, 106).

Las células NK constituyen un 5-15% de los linfocitos de sangre periférica, por lo que representan la tercera población de linfocitos tras las células T y B. También se encuentran en la médula ósea, en tejidos (hígado, bazo, pulmones y útero) y, en menor medida, en órganos linfoides secundarios y en el timo. Los gradientes de quimiocinas y la expresión de determinadas moléculas durante su desarrollo, como integrinas, dirigen a las células NK a las distintas localizaciones y regulan sus funciones efectoras (104).

1.2.1 Desarrollo de las células NK humanas

Frente al conocimiento que se tiene en el desarrollo de las células NK en el modelo murino, este proceso no está tan claro en humanos. Esto se debe a la heterogeneidad de los estudios, que se desarrollan en distintos modelos: muestras de tejido fetal, cordón umbilical (UCB; del inglés, *Umbilical Cord Blood*), médula ósea o tejidos linfoides secundarios. Además, estas muestras pueden provenir de individuos sanos o pacientes en proceso de reconstitución de poblaciones celulares tras un trasplante hematopoyético. Finalmente, el proceso de desarrollo se puede monitorizar *in vivo*, o generar una diferenciación *in vitro*. Con todos estos datos se ha establecido un modelo de diferenciación a células NK (Figura 1.5) (107).

Las células NK derivan de **células madre hematopoyéticas** (HSC; del inglés, *Hematopoietic Stem Cell*) CD34⁺, localizadas en la médula ósea. A través de distintos estímulos, como citoquinas, y factores de transcripción, las HSC comienzan la diferenciación hacia el linaje de células NK (108). En un siguiente paso, dan lugar al **progenitor multipotencial linfoide** (LMPP; del inglés, *Lymphoid-primed multipotential progenitor*). En este estadio 1 de diferenciación, el LMPP se caracteriza por ser CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁻ y no poseer marcadores de ningún linaje (lin⁻) (107, 109, 110). Su evolución al **precursor linfoide común** (CLP; del inglés, *Common Lymphoid Precursor*) constituye el segundo estadio. El CLP es capaz de generar todos los tipos de linfocitos (T, B, NK e ILCs) (110, 111) y está definido por expresar CD34⁺, CD45RA⁺, CD10⁺, CD7⁺, CD38⁺, lin⁻ (109, 110, 112).

Se ha observado que gran parte de estos precursores migran a los ganglios linfáticos y órganos linfoides secundarios, donde continua el proceso de compromiso con el linaje NK (98). Esta movilización parece depender de la disminución de CXCR4 en la superficie. Aunque existen evidencias de que las condiciones de inflamación generan un incremento de su ligando, la citoquina CXCL12, e inducen la movilización temprana de estos precursores (107).

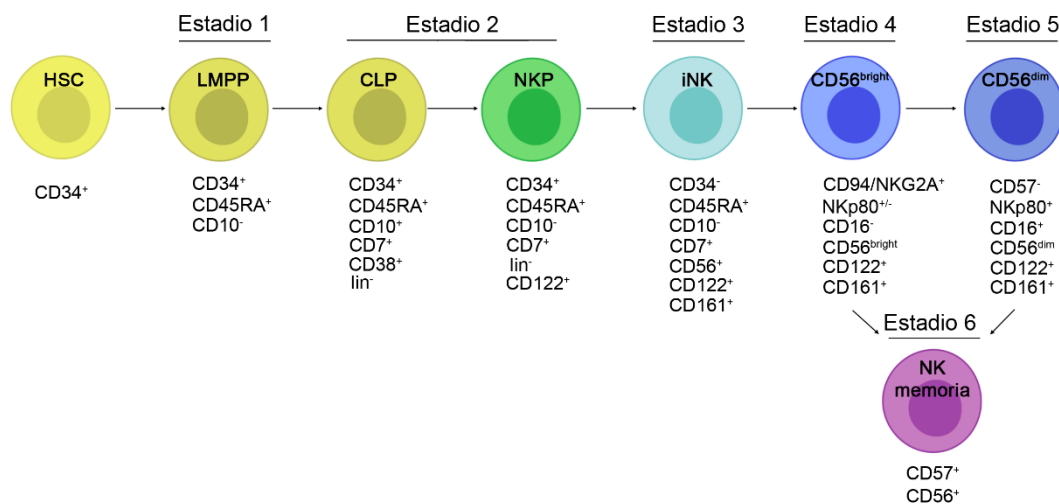


Figura 1.5 Desarrollo de las células NK humanas.

El progreso hacia células NK maduras se caracteriza por la adquisición gradual de receptores específicos (108). Un paso importante en esta evolución es la capacidad de respuesta a IL-15, que desarrolla el **precursor de células NK** (NKP; del inglés, *NK cell Precursor*) (113, 114). Gracias a la transpresentación de la IL-15, estas células NK reciben señales para su diferenciación, maduración y supervivencia (110, 115). En esta etapa se ha observado que los

NKP humanos expresan la cadena IL-2/15R β (CD122) (116), y en algunos casos también la cadena γ y común (CD132) (114). Los NKP se caracterizan por su incapacidad de derivar en linfocitos T (CD3 $^+$) o B (CD19 $^+$), y se han localizado en la médula ósea, las amígdalas y el cordón umbilical (117). En un tercer estadio, estos progenitores dan lugar a las **células NK inmaduras** (iNK), que expresan CD56 $^+$ y CD161 $^+$; pero aún no han adquirido CD16, NKp46, receptores KIR (del inglés, *Killer Inhibitory Receptors*) ni receptores CD94/NKG2. Las células iNK de ratón y humanas derivadas in vitro han mostrado citotoxicidad dependiente de TRAIL (117).

En el cuarto estadio, las células iNK derivan en células **NK maduras** CD56 $^+$ que expresan el receptor CD94/NKG2A, a través del que reciben señales de inhibición al reconocer MHC-I (apartado 1.2.3) (117). Adquieren además todos los receptores y moléculas efectoras que las capacitan para cumplir sus funciones con la liberación de IFN- γ , la exocitosis granular y la citotoxicidad mediada por ligandos mortales (115). Generalmente, se distinguen dos poblaciones de células NK maduras. Las células **CD56^{bright}/CD16^{dim}** son más abundantes en los tejidos linfoides secundarios, tejidos fetales y cordón umbilical, y su función principal es la producción de citoquinas. Las células **CD56^{dim}/CD16^{high}** son más abundantes en la sangre periférica, y tienen principalmente una función citotóxica. Por ello se ha indicado que las CD56^{bright} son precursoras de las CD56^{dim} (115). Además, algunos estudios apuntan a la existencia de una población intermedia en sangre periférica caracterizada por un fenotipo CD94 $^+$, CD56^{dim} y CD62L $^+$ (apartado 1.2.2) (118). Una vez en la sangre, la vida media de las células NK es de 7-10 días (119).

El paso final en el proceso de maduración de las células NK es la adquisición de su fenotipo de memoria (apartado 1.2.2). Además, un nuevo modelo de desarrollo de las células NK que no responde al tradicional esquema lineal, sino ramificado, propone que las células CD^{bright}, CD56^{dim} y células de memoria pueden derivar directamente de precursores como el NKP (109).

1.2.1.1 Células NK: un tipo de célula linfoide innata (ILC)

El **linaje de linfocitos innatos** humanos comprende tanto a las **células NK** como a otros subtipos de **ILCs** (del inglés, *Innate Lymphoid Cell*). Estas células comparten un precursor común en su diferenciación (109, 120). Posteriormente, la generación de cada subtipo depende de la activación de determinados factores de transcripción, lo cual les confiere distintas propiedades

(111). Aunque las células NK se han considerado parte de las ILC1 porque comparten la capacidad de secretar IFN- γ y TNF- α , el papel de las células NK y de los demás subtipos de ILCs se ha equiparado al de los linfocitos Tc frente a los linfocitos T_H (121). Por lo tanto, se distinguen principalmente:

- **Células NK:** se definen a través de la expresión de los factores de transcripción T-bet y EOMES, y presentan capacidad citotóxica (122, 123).

- **ILC1:** se definen a través de la expresión del factor de transcripción T-bet, y presentan la capacidad de producir IFN- γ y TNF- α (123).

- **ILC2:** se definen a través de la expresión del factor de transcripción GATA-3, y presentan la capacidad de producir citoquinas del perfil T_{H2} como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13; pero también IL-6, IL-8, GM-CSF (del inglés, *Granulocyte Monocyte- Colony Stimulating Factor*). Cumplen un papel en la defensa contra helmintos y en el procesamiento de antígenos y activación de los linfocitos T (123).

- **ILC3:** se definen a través de la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y AHR, y presentan la capacidad de producir IL-17A, IL-17F e IL-22. Distintas subpoblaciones están implicadas en la organogénesis de tejidos linfoides secundarios o la captación y procesamiento de antígenos, con la posterior activación de linfocitos T (123).

- Además, recientemente se ha descubierto un nuevo subtipo, denominado **ILCreg**, a nivel intestinal, que se definen a través del factor de transcripción ID3, y son capaces de producir IL-10 controlando la inflamación local (124).

1.2.2 Subgrupos de células NK

Algunos estudios han tratado de caracterizar las **diversas poblaciones** de células NK en base a su fenotipo. En ellos se ha estimado que pueden existir 100.000 fenotipos distintos de células NK por persona. Posteriormente, estos fenotipos se han intentado agrupar en *clusters* de acuerdo a receptores comunes (125).

INTRODUCCIÓN

Los dos subgrupos mejor diferenciados se corresponden con las células **CD56^{bright}** y **CD56^{dim}**. No obstante, son poblaciones heterogéneas en cuanto a la expresión de otros receptores (109). Se ha observado que las poblaciones que transitan entre ambos estados de maduración, van adquiriendo **CD62L** y **NKp80** (126) y van disminuyendo **CD94** dando lugar a subgrupos con distintas densidades superficiales de los marcadores (118). Posteriormente, cuando las células **CD56^{dim}** maduran, disminuyen la expresión de **NKG2A** y **CD62L**, mientras que aumentan la expresión de algunos **KIR** y **CD57**. A nivel funcional, esto supone una pérdida progresiva de la capacidad de proliferación ante ILs, pero el incremento de actividad citotóxica (118, 127). Un estudio más detallado de las poblaciones de células NK también permite distinguir subgrupos a partir de la expresión de receptores de quimiocinas (128), marcadores de activación como **CD69** (129), e incluso el perfil de las células NK residentes en cada tejido (130).

Otro subgrupo que está adquiriendo cada vez más interés es el de las **células NK adaptativas**. Se ha observado que algunas células NK cuentan con rasgos que no se consideran propios de la inmunidad innata. Por ejemplo, la expansión específica de tejido, la generación de células de “memoria” que persisten tras el encuentro con la célula diana y la habilidad de generar una respuesta secundaria incrementada tras un segundo encuentro (131). Estas características se han asociado a poblaciones de células NK que aparecen tras encontrarse con determinados **estímulos**: un hapteno (en un modelo murino) (132), una célula infectada por virus (133), una célula tumoral (134) o un *cocktail* de citoquinas (135). Tras descubrir esta nueva población de células NK, se ha planteado la duda acerca de si las células NK adaptativas se podrían dividir en subgrupos en función del estímulo que las ha activado (136). Por ejemplo, la infección por HCMV (del inglés, *human Cytomegalovirus*) genera células que expresan NKG2C (137). La IL-12, IL-15 e IL-18 generan células NK adaptativas humanas con mayor expresión de perforina y granzima B, (135) mostrando una mayor citotoxicidad. Además también incrementan su capacidad de producir citoquinas como TNF- α e IFN- γ (138). Sin embargo, las células NK adaptativas inducidas por citoquinas o por tumor, no tienen un fenotipo claro (135).

Finalmente, en el contexto de la inmunidad antitumoral y la inmunoterapia, es importante considerar que una patología crónica da lugar a la aparición de células NK “**exhaustas**” (139). Así, se ha visto una disminución de los receptores de activación NKG2D, CD16, NCRs, CD226 y 2B4 (apartado 1.2.3) (140, 141) en pacientes con distintas infecciones o tumores. Igualmente, se produce una sobreexpresión de receptores de inhibición como NKG2A (142, 143). También se ha visto incrementada la expresión de los denominados reguladores de

puntos de control o “checkpoints” característicos de los linfocitos T, por ejemplo TGIT (144), TIM-3 (145) y PD-1 (146, 147). Aunque actualmente el conocimiento que se tiene de este fenotipo exhausto es mucho menor en células NK que en linfocitos T, se sabe que es reversible con la eliminación de la patología o la administración de inmunoterapia (139).

1.2.3 Receptores de las células NK

Las células NK interactúan con ligandos solubles (citoquinas, quimiocinas) o moléculas de superficie a través de un conjunto de receptores (**Figura 1.6**).

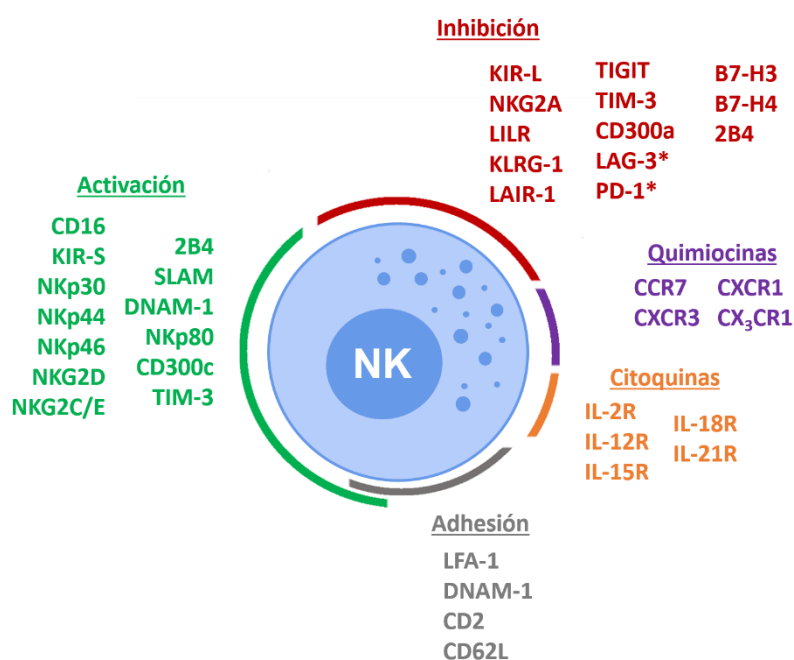


Figura 1.6 Receptores de las células NK agrupados según su función. Elaboración propia, adaptado de Vivier et al. 2011. *No está clara su función, podría estar limitada a pacientes con cáncer.

1.2.3.1 Receptores de adhesión

Los receptores de adhesión intervienen en la maduración, el tráfico y la interacción de las células NK con las células diana. Se pueden clasificar en tres grupos: **integrinas**, como **LFA-1** (del inglés, *Lymphocyte function-Associated Antigen 1*), que interviene en la formación de la sinapsis inmunológica; **inmunoglobulinas**, como **DNAM-1** (del inglés, *DNAX accessory molecule-1*) o **CD2**, que actúan como moduladoras de la función efectora (apartado 1.2.6); y **selectinas**, como **CD62L**, que interviene en el tráfico de las células NK (148, 149).

1.2.3.2 Receptores de Inhibición

Los receptores de inhibición (Tabla 1.1) se caracterizan por la presencia de un dominio **ITIM** (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs*), que disminuye el estado de activación. Tras la unión con el ligando, los dominios ITIM se fosforilan por la familia de kinasas Src. Esto da lugar al reclutamiento de fosfatasa como SHP-1 y SHP-2, a través del dominio SH2. Las fosfatasa ejercen su acción a un nivel proximal a la membrana plasmática, actuando sobre ésta o impidiendo la fosforilación de las vías de activación. En consecuencia, impiden la ejecución de las funciones efectoras (150).

Tabla 1.1 Receptores de inhibición y moduladores de las células NK

Receptor	CD	Ligando	Efecto	Referencia
KIR-S	CD158	HLA- I	Inh	(148)
KIR2DL1	CD158a	HLA-C2		(148, 149)
KIR2DL2-3	CD158b	HLA-C1		(148, 149)
KIR2DL4	CD158d	HLA-G		(148, 149)
KIR2DL5	CD158f	-		(148, 149)
KIR3DL1	CD158e1	HLA-A/B-Bw4		(148, 149)
KIR3DL2	CD158ek	HLA-A*03 y *11		(148, 149)
CD94:NKG2A	CD159a	HLA-E	Inh	(148, 150)
LILRB/ILT2	CD85j	HLA-A, B, C y HLA-G UL18	Inh	(148, 151)
KLRG-1	-	Cadherinas E, N, R	Inh	(152)
LAIR-1	-	Colágeno	Inh	(153, 154)
CD300a	CD300a	PE, PS	Inh	(155)
TIGIT	CD226	CD155 (Nectina-2)	Inh	(148)
2B4	CD244	CD48	Inh/Act	
TIM-3	CD366	Gal-9, HMGB1, PS, CEACAM	Inh/Act	(148)
LAG-3	CD223	HLA-II, Lsectin, FGL1	¿?	(156, 157)
PD-1	CD279	PD-L1, PD-L2	Inh	(148)

Act: Activación; **CEACAM:** Molécula de Adhesión Celular relacionada con el Antígeno Carcinoembrionario; **FGL1:** del inglés, *Fibrinogen-like Protein 1*; **HMGB1:** del inglés, *High Mobility Group Box 1*; **Inh:** Inhibición; **PE:** fosfatidiletanolamina; **PVR:** Receptor de Poliovirus

- **KIR-L** (del inglés, *Killer Immunoglobulin-like Receptors*): contienen dos (KIR2D) o tres (KIR3D) dominios inmunoglobulina (Ig) y una cola citoplasmática larga con dominios ITIM. Se distinguen 6 receptores: **KIR2DL1-5** y **KIR3DL1-2** (150, 151). Tienen un alto grado de polimorfismo e intervienen en la tolerancia de las células NK al reconocer HLA-I (131, 160).

- **CD94:NKG2A:** son proteínas transmembrana tipo II de la familia lectina tipo C que conforman un heterodímero (150, 161). También intervienen en la tolerancia de las células NK al reconocer HLA-I no clásico (152).
- **LILRB1/ ILT2:** es una proteína transmembrana tipo I de la superfamilia de las Ig (110, 150). Su expresión se correlaciona con un fenotipo adaptativo en los donantes CMV⁺ (162).
- **Receptores de inhibición que no se unen a HLA-I:** como **KLRG-1** (del inglés, *Killer cell lectin-like receptor G1*) (154) o **LAIR-1** (del inglés, *Leukocyte-Associated Immunoglobulin-like Receptor-1*) (155), o **CD300a**, que pertenece a la misma familia que su homólogo activador pero que señala a través de ITIM (157). En este grupo se encuadran también otros receptores cuyo estudio ha ganado interés en los últimos tiempos al haber demostrado actuar como puntos de control en linfocitos T, aunque su contribución no está clara en el caso de las células NK. **TIGIT** (del inglés, *T cell immunoglobulin and ITIM domain*) es un miembro de la superfamilia de Ig que compete con DNAM-1 por las proteínas tipo nectina y proporciona señales de inhibición (163). Interviene en la tolerancia de las células NK (164) y se encuentra sobreexpresado en pacientes con cáncer (165, 166). **TIM-3** (del inglés, *T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 3*) es una glicoproteína de membrana tipo I (151) que también se encuentra constitutivamente en las células NK (158). Se ha relacionado tanto con efectos activadores, induciendo la liberación de IFN- γ (167), como inhibidores (168); y se sobreexpresa en pacientes con cáncer (169, 170). Por su parte, **LAG-3** (del inglés, *Lymphocyte Activation Gene 3-encode protein*) es un receptor con homología estructural a CD4 (158). Se ha descrito en células NK activadas (171). Aunque se encuentra sobreexpresado en pacientes con cáncer (172), y en linfocitos Tc regula mecanismos de inhibición, se desconoce su papel en las células NK (173). Finalmente, **PD-1** (del inglés, *Programed Death protein 1*) es un receptor de la superfamilia de Ig (151). No se encuentra expresado (o con niveles muy bajos) de manera constitutiva, y su expresión puede estar relacionada con la infección por CVM (146). Sin embargo, es característico de las células NK de pacientes con cáncer (147, 174). Además, éstas parecen contribuir al efecto antitumoral en el tratamiento con anticuerpos monoclonales (mAbs) bloqueantes del eje PD-1/PD-L1 (175).

1.2.3.3 Receptores de activación

Existe una gran variedad de receptores de activación que reconocen ligandos codificados por virus o inducidos por estrés (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Receptores de activación y moduladores de las células NK

Receptor	CD	Adaptador	Ligando	Efecto	Referencia
FcγRIII	CD16	CD3ζ / FcRγ	Fracción Fc de IgG	Act	(148, 149, 158)
KIR-S	CD158	DAP-12	HLA- I	Act	(148, 149, 158)
KIR2DS1	CD158h		HLA-C		(148)
KIR2DS2-3	CD158j		HLA-C		(148, 159)
KIR2DL4	CD158d		HLA-G		(148)
KIR2DS4	CD158i		HLA-A*11, HLA-C		(148)
KIR2DS5	CD158f		-		(148)
KIR3DS1	CD158e1		HLA-Bw4, HLA-F		(148)
NKp30	CD337	CD3ζ / FcRγ	B7H6, BAG6/BAT3	Act	(148, 149, 158)
NKp44	CD336	DAP-12	21spe-MLL5	Act	(148, 149, 158)
NKp46	CD335	CD3ζ / FcRγ	Properdina, HA, HN	Act	(148, 149, 158)
NKG2D	CD314	DAP-10	MICA/B, ULBPs	Act	(148, 149, 158)
CD94/NKG2C CD94/NKG2E	CD159c CD159e	DAP-12	HLA-E	Act	(148, 149, 158)
2B4	CD244	-	CD48	Act/Inh	(136, 160)
SLAM	CD150	-	SLAM	Act	(149) 23
DNAM-1	CD226	-	CD112 (PVR) CD155 (Nectina-2) CD11a/CD18 (LFA-1)	Act	(149)
NKp80	-	-	AICL	Act	(136, 161)
CD300c	CD300c	-	PE, PS	Act	(155)
TIM-3	CD366		Gal-9, HMGB1, PS, CEACAM	Act/Inh	(156)

Act: Activación; **AICL:** lectina tipo C inducida en activación **HA:** hemaglutinina; **HN:** hemaglutinina-neuraminidasa ; **Inh:** Inhibición; **21spe-MLL5:** histona-Lisina N-metiltransferasa; **MICA/B:** polipéptidos relacionados con la secuencia MHC-I a/B ; **ULBP:** proteína de unión a UL-16

Tienen una región cargada positivamente en su dominio transmembrana, y se caracterizan por no poseer dominios de señalización intracitoplasmáticos. Por el contrario, dependen del reclutamiento y asociación de **moléculas adaptadoras** que permiten la transducción de la señal. Entre ellas se encuentran FcRγ, CD3ζ, DAP12 y DAP10. A excepción de DAP10, estos adaptadores señalizan a través de motivos **ITAM** (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosin-based Activating Motifs*). Por su parte, DAP10 señala a través de YINM (150, 151).

A nivel citoplasmático, los motivos ITAM reclutan ZAP70 y Syk a través de los dominios SH2. Por otro lado, los dominios YINM reclutan y activan a la subunidad p85α de PI3K (151).

Ambas vías convergen en una cascada de activación que provoca la entrada de Ca^{2+} , degranulación y transcripción de citoquinas y quimiocinas (176).

Dentro de los receptores de activación se distinguen varias familias:

- **CD16** (Fc γ RIIIA): es el receptor de baja afinidad para la fracción Fc de los anticuerpos. Reconoce células cubiertas por anticuerpos e induce citotoxicidad dependiente de anticuerpo (**ADCC**; del inglés, *Antibody Dependent Cytotoxicity*) y liberación de citoquinas (176).

- **KIR-S**: se diferencian de los homólogos inhibidores en que estos poseen una cola citoplasmática corta y una afinidad mucho menor por el HLA-I (180). Del mismo modo, contienen dos o tres dominios extracelulares tipo Ig. Se distinguen 6 receptores KIR-S: **KIR2DS1-5** y **KIR3DS1**. Excepcionalmente, el receptor **KIR2DL4** cuenta con funciones activadoras e inhibidoras. Los receptores KIR, tanto inhibidores como activadores, son moléculas altamente polimórficas (160), lo que afecta a su interacción con el HLA-I y modula el efecto protector o patológico de las células NK en infecciones, enfermedades autoinmunes o trastornos de la reproducción (180).

- **NCR** (del inglés, *Natural Cytotoxicity Receptors*): son moléculas transmembrana de la familia de Ig, donde se incluyen los receptores **NKp30**, **NKp46** y **NKp44**. Los dos primeros se expresan de manera constitutiva en casi todas las células NK, y tras la activación se incrementa su nivel de expresión. NKp44 sólo es constitutivo en las células CD56^{bright}, pero lo adquieren casi todas las células NK tras su activación *in vitro* con citoquinas. (150, 151)

- **NKG2D**: es una glicoproteína transmembrana de la familia lectina tipo C que se expresa como homodímero. Reconoce moléculas propias (homólogas a HLA-I) inducidas por estrés celular (150, 181).

- **CD94/NKG2**: son proteínas transmembrana tipo II de la familia de lectina tipo C. Se asocian en heterodímeros de CD94/NKG2C o CD94/NKG2E (150, 182). Reconocen HLA-Ib no convencionales, pero su unión es menos eficiente que la unión con CD94/NKG2A (183).

- **Receptores de coestimulación** proporcionan estímulos adicionales a la célula, aunque por sí mismos no inducen la activación de las células NK. **2B4** es un miembro de la familia

de proteínas CD2, relacionadas con Ig. Tiene dos dominios tipo Ig y una región citoplasmática compuesta por unos motivos característicos de la vía de señalización de **SLAM** (del inglés, *Signaling Lymphocyte Activation Molecule*) (150). **DNAM-1** es un miembro de la superfamilia de Ig con un papel esencial en la sinapsis inmunológica y la citotoxicidad de las células NK (184, 185). Otros co-receptores incluyen **NKp80**, un receptor de lectina tipo C (179, 186); y **CD300c**, que es una glicoproteína transmembrana tipo I (157).

Entre todos estos receptores, NKp46 es el único que se expresa exclusivamente en células NK.

1.2.3.4 Receptores de citoquinas y quimiocinas

Los **receptores de citoquinas** que se encuentran acoplados a la cadena **gamma común** (γ_c) están implicados en el desarrollo de las células NK y sus funciones efectoras. Dentro de ellos se encuentran los receptores: IL-2R, IL-15R, IL-21R (136). Por su parte, el receptor IL-12R está acoplado a **STAT4** (187), y media la producción de citoquinas y la sobreexpresión de la proteína adaptadora MyD88 (188). Además, los receptores acoplados a **MyD88**, como IL-1R e IL-18R, también están implicados en la maduración y en la función de las células NK (136, 188).

Los **receptores de quimiocinas** son receptores heterotriméricos acoplados a proteína G que desencadenan la polarización de la célula, migración y adhesión o el tráfico leucocitario (189).

1.2.4 Educación, tolerancia y homeostasis de células NK

Las células NK cuentan con múltiples receptores que reconocen moléculas endógenas (131). Sin embargo, la adquisición de la función citotóxica durante su desarrollo supone la existencia de unos mecanismos de regulación que eviten el daño de las células sanas del mismo individuo, lo que se considera como "**propio**" (190). Además, cada célula NK responde de una manera diferente a un estímulo dado. Este nivel de respuesta viene determinado por el proceso de **educación** de las células NK, gracias al cual se consigue un estado de **tolerancia** respecto al entorno propio (191). Este mecanismo de educación explica la activación de las células NK frente a la pérdida de lo propio, lo que se conoce como **hipótesis del *missing-self***.

La primera idea que explicaba la tolerancia (Kärre et al. 1986) se basó en la observación de que las células NK eran capaces de eliminar células que no expresaban HLA-I pero no atacaban a células que mantenían su expresión (52). Por lo tanto, las células NK debían tener **receptores específicos de inhibición** que reconocieran HLA-I (192, 193). Con los años, se han ido descubriendo un conjunto de receptores que regulan su actividad (193). En humanos, los principales receptores específicos para HLA-I son los **KIR** y el **heterodímero CD94/NKG2A**. Los KIR son capaces de reconocer moléculas de HLA-ABC, consideradas clásicas; mientras que el CD94/NKG2A reconoce HLA-E, considerado no clásico. Aunque también existe un subgrupo de células NK que cuenta con el receptor LILRB1 (Apartado 1.2.3.2) (131).

La **expresión de los KIR** en las células NK se produce de manera **estocástica** y con un patrón **irregular**. Además, estos receptores son **polimórficos** y presentan distinta afinidad por los ligandos de HLA-I (194). Como consecuencia, existen diferencias en el reconocimiento del HLA propio por distintos grupos de células NK, incluso algunos de estos grupos no expresan los receptores KIR para el HLA-I propio (131, 191, 195). Por lo tanto, a diferencia de los linfocitos T, no existe un mecanismo de selección positiva o negativa para evitar que las células NK que pudieran inducir un ataque autoinmune (131). Sin embargo, se ha observado que estas células que expresan KIR son hiporreactivas y presentan tolerancia (196). En un principio se propusieron dos **teorías** para explicar la educación de las células NK. Según la primera, las células NK partirían de un estado hiporreactivo o **“sin licencia”** y tras la exposición a HLA-I adquirirían las armas para convertirse en efectoras (197). Según la segunda, o **hipótesis del “desarme”** ocurriría al contrario. Inicialmente, las células NK tendrían la capacidad de responder pero, sin las señales provenientes de los KIR, recibirían una estimulación constante que las convertiría en anérgicas (198). Sin embargo, hoy se acepta un tercer modelo que responde a un **proceso cuantitativo de integración de señales** para explicar la reactividad de las células NK (199).

Este nuevo modelo denominado **“tuning”**, integra los dos modelos convencionales y el concepto de respuesta reostática. Según este concepto, no sólo hay un estado de respuesta y otro de anergia. Por el contrario, la capacidad de respuesta de las células NK se **ajusta** para permitir una protección constante y dinámica frente a los peligros, a la vez que asegura la tolerancia respecto a lo propio (199, 200). En la integración de señales intervienen tanto los receptores de inhibición específicos de HLA-I (KIR), como otros que no se unen a esta molécula (TGIT, LAIR-1, KLRG1, TIM-3, etc.), y receptores activadores (NKG2D, NKp46, SLAM, etc) (1, 191).

Por ejemplo, las células NK que cuentan con más **receptores de inhibición** poseen un umbral de activación más bajo y, en consecuencia, funciones efectoras más potentes (200). Mientras que el desarrollo de las células NK en un entorno sin MHC-I las vuelve anérgicas (201). Además, los KIR de células NK también se pueden unir al MHC-I expresado en la misma superficie celular (presentación en *-cis*). Se ha sugerido que estas interacciones modulan la educación de las células NK; frente a la interacción con el MHC-I expresado en otra célula (presentación en *-trans*), que media la señalización inhibitoria (202). Por otro lado, se ha observado que la presencia constante de **ligandos de activación** durante la educación de las células NK puede disminuir la expresión del receptor y, por lo tanto, del nivel de respuesta (como se ha descrito para NKG2D y NKp46) (203-205). Mientras que algunas deficiencias en los receptores de activación (como SLAM o NKG2D) han generado células NK más reactivas (206, 207). En resumen, cuanto mayor sea la estimulación neta, menor será la capacidad de respuesta (191).

Finalmente, un factor importante en la tolerancia de las células NK es que presenta **plasticidad**. Por ejemplo, se puede reajustar si se producen cambios en la expresión de MHC-I en el entorno (208). También con las condiciones de inflamación derivada de una infección por virus, como el CMV murino. En este caso se ha visto que las células NK anérgicas, que no expresan los KIR para el HLA-propio, comienzan a proliferar sin la restricción de las señales de inhibición y contribuyen a controlar la infección (209). Igualmente, el cultivo con IL-2 de las células anérgicas es capaz de romper el estado de tolerancia (210). Por lo tanto, el estado de anergia es reversible y depende del **contexto** (192).

1.2.5 Activación de células NK

Durante la vigilancia inmune, las células NK han de ser capaces de **identificar células anormales** que pueden suponer un peligro. Pero aunque funcionalmente sus mecanismos sean equiparables a los de los linfocitos Tc, los dos tipos celulares difieren en el proceso de reconocimiento de las células diana y su posterior activación. Los linfocitos Tc reconocen específicamente el antígeno que les han presentado las células APC, y que ha inducido su activación, la recombinación somática de su receptor TCR y una expresión clonal (primer encuentro). Cuando el TCR de los linfocitos Tc detecta este antígeno asociado al HLA-I en las células diana (segundo encuentro), se desencadenan los mecanismos citotóxicos (1, 136). Sin embargo, las células NK ya están pre-activadas a raíz del proceso de maduración y pueden proporcionar una respuesta inmediata. En ausencia de TCR, su activación responde a un balance

de señales que recibe a partir de sus receptores activadores e inhibidores codificados en la línea germinal (136).

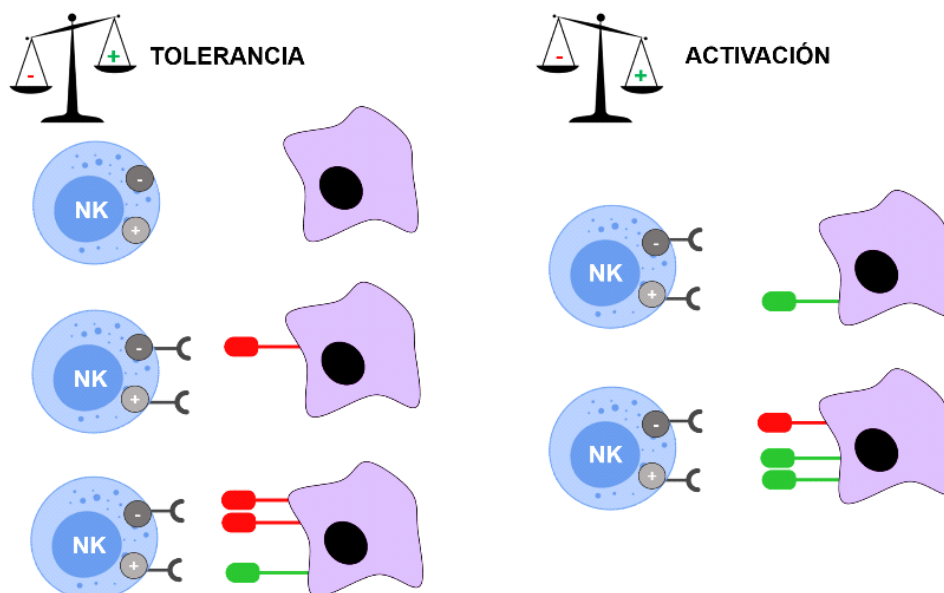


Figura 1.7 Regulación de la actividad citotóxica de las células NK. Las células NK reconocen ligandos activadores (verde) o inhibidores (rojo) a través de sus respectivos receptores (símbolo “+” para los activadores y símbolo “-” para los inhibidores). La integración de estas señales determina la respuesta de la célula NK.

Anteriormente se ha hablado de la **integración de señales** en el proceso de educación de las células NK. Del mismo modo, la activación de sus funciones efectoras (Figura 1.7) se explica a través de las hipótesis de **“ausencia de lo propio”** y respuesta **“inducida por estrés”** (del inglés, *stress-induced*) (162). En condiciones normales, las células NK reconocen el MHC-I, como principal señal de inhibición, y no reciben la estimulación a partir de sus receptores de activación. Cuando las células resultan infectadas o transformadas, pueden disminuir la expresión de las moléculas de HLA-I o aumentar la expresión de ligandos de estrés. La respuesta de la célula NK (tolerancia o ataque) viene determinada por la integración del conjunto de señales de activación e inhibición (110, 149). Cuando las señales de activación sobrepasan un **valor umbral**, las células NK desencadenan sus mecanismos citotóxicos (163). Un caso particular en esta activación proviene del reconocimiento de la fracción Fc de algunos Ab a través del CD16, induciendo **ADCC** (apartado 1.2.3.2) (136). Esto induce una señal potente, que es capaz de superar las señales inhibitorias. Además, la co-estimulación a través de otros receptores de activación puede tener un efecto sinérgico (164, 165).

1.2.6 Mecanismos efectores de las células NK

Las células NK, junto con los linfocitos Tc, son **células citotóxicas** del sistema inmune que median la muerte celular a través de unos mecanismos compartidos. Estos comprenden: la vía de los **ligandos de muerte** y la vía de la **exocitosis granular**. La contribución de cada vía a la inmunidad anti-tumoral no está clara, y parece depender de del tipo de célula tumoral (1). Además, las células NK también ejercen funciones citotóxicas e inmunomoduladoras a través de la **liberación de citoquinas** y quimiocinas (110, 166).

1.2.6.1 Liberación de citoquinas

La activación de las células NK, a través del contacto directo con otra célula o a través de mediadores solubles, induce la liberación de factores solubles. Por ejemplo, la liberación de **IFN- γ** se produce como consecuencia de la activación del receptor NKG2D, o por la estimulación mediada por IL-2 derivada de los linfocitos T y por IL-12 e IL-15 derivada de los monocitos y las DC (167). La activación a través de 2B4 y NKG2D también induce la liberación de TNF- α (103). Estas citoquinas inducen un aumento en la expresión de ICAM-1 y Fas en las células diana, y así favorecen los mecanismos citotóxicos (168).

1.2.6.2 Vía de los ligandos de muerte

Los ligandos de muerte (TNF- α , FasL y TRAIL) se unen a sus respectivos receptores (TNFR, Fas y DR4/DR5) localizados en las células diana. Así, inducen la vía extrínseca de la apoptosis, con la consiguiente activación de las caspasas en la célula diana (Figura 1.8). Aunque en determinadas condiciones también pueden inducir necroptosis (169). La estimulación de las células NK a través de sus receptores induce la expresión y liberación de estos ligandos de muerte (Figura 1.9) (169). Y, de hecho, los mecanismos efectores dependientes de FasL (170), TNF- α (171) y TRAIL (169) han mostrado tener un papel esencial en la inmunovigilancia tumoral o en la prevención de la metástasis (79).

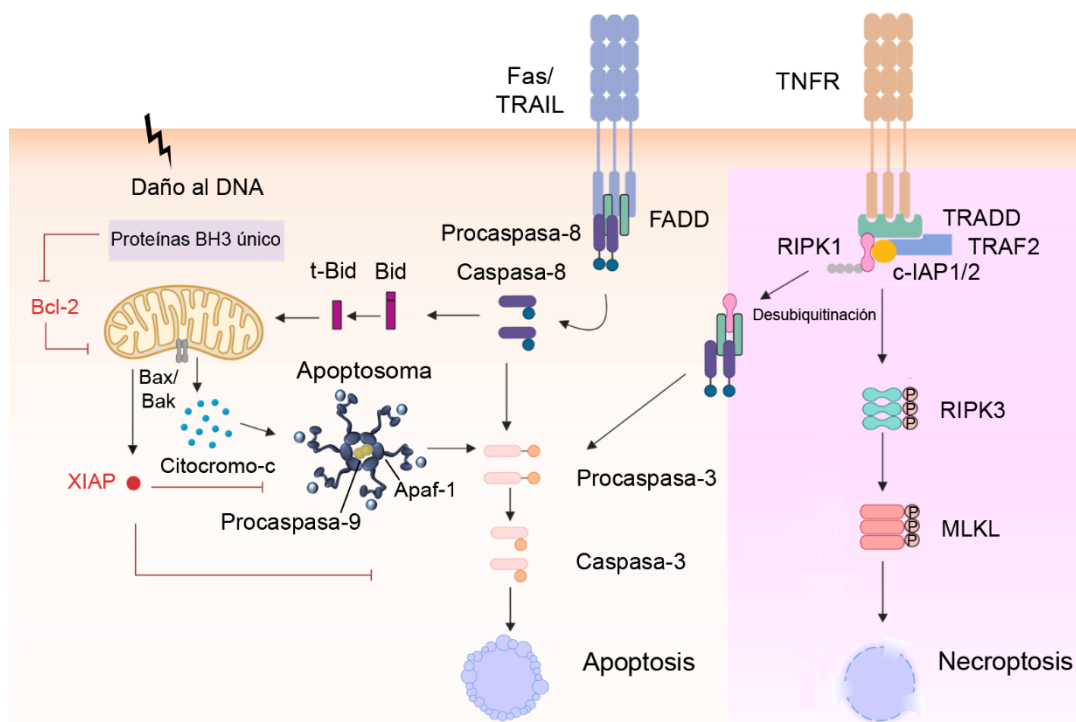


Figura 1.8 Mecanismos de muerte celular. La activación del receptor Fas/TRAIL desencadena la vía intrínseca de la apoptosis, con la activación directa de las caspasas ejecutoras (caspasa-3), o de la vía intrínseca o mitocondrial. Al activarse la vía intrínseca, las proteínas transmembrana de la mitocondria Bax y Bak forman un poro que da lugar a la permeabilización de la membrana externa y a la salida del citocromo-c al citosol. En el citosol, el citocromo-c se une a otras proteínas formando el apoptosoma, que interviene en la activación de la caspasa-9. Esta caspasa induce la activación de otras caspasas ejecutoras de la apoptosis. Por otro lado, la activación del TNFR puede desencadenar apoptosis, o necroptosis en ausencia de caspasas. Elaboración propia.

1.2.6.3 Vía de la exocitosis granular

La vía de la exocitosis granular, o degranulación, se desencadena a través del balance de señales de activación e inhibición que recibe la célula efectora por sus receptores de superficie. Supone la liberación de gránulos citotóxicos preformados que contienen moléculas encargadas de inducir la muerte de las células diana (Figura 1.9) (110, 169). Es un proceso muy regulado, que depende del establecimiento de unos contactos especializados entre ambas células, generando una estructura tridimensional dinámica conocida como **sinapsis inmunológica** (172, 173). La movilización de los gránulos citotóxicos a esta interfaz es un proceso rápido que supone:

1- La **reorganización del citoesqueleto de actina** y la formación de unas agrupaciones supramoleculares de activación (**SMAC**; del inglés, *Supramolecular Activation Cluster*) (166, 172). En ellas, las moléculas de adhesión como LFA-1 y CD2 conforman la periferia del SMAC; mientras que los receptores de activación conforman el centro del SMAC (165, 174, 175).

2- La **traslocación del centro organizador de microtúbulos** (MTOC; del inglés, *Microtubule Organizing Center*) hacia la zona de unión, creando una red de microtúbulos que permite la **polarización** de los gránulos hacia la sinapsis. (166, 169)

3- La **exocitosis** de los gránulos a la zona de contacto y la **fusión** con la membrana plasmática (166, 169)

Diversas proteínas se han implicado en la **regulación del proceso**. Es el caso de **WASP** (del inglés, *Wiskott-Aldrich Syndrome Protein*), que interviene en la reorganización de la actina (176). La proteína **AP-3** (del inglés, *Adaptor Protein 3*) está implicada en el desplazamiento de los gránulos por la red de actina (177), **Rab27a** en su liberación (178), **Munc1 3-4** en su fusión con la membrana plasmática (179) y, finalmente, la **esfingomielinasa ácida** en la expulsión direccional del contenido (180).

Dentro de los componentes de los gránulos citotóxicos (Tabla 1.3), la proteína formadora de poros (**perforina**) y las serin-proteasas (**granzimas**) son los principales agentes que intervienen en la lisis celular.

- La **perforina** es una proteína homóloga al factor C9 del complemento que forma el complejo de ataque a la membrana (MAC; del inglés, *Membrane Attack Complex*) (181). Dentro de su estructura destacan: un dominio N-terminal responsable de su actividad lítica, un dominio central de anclaje a la membrana, un dominio tipo EGF (del inglés, *Epidermal Growth Factor*) y un dominio C2 C-terminal de unión a Ca^{2+} que determina su activación (182).

Tabla 1.3 Principales componentes de los gránulos citotóxicos. Adaptada de Antón et al. 2018 (1).

Molécula	Función
Perforina	Formación de poros
Granzimas	Proteasas de serina
Granulislina	Agente antimicrobiano
Calreticulina	Inhibidor de la perforina
Catepsina C	Activación de las granzimas
Serglicina	Unión a granzimas
Catepsina B	Degradación de la perforina
Serpinas	Inhibidores de granzimas
Esfingomilinaasa ácida	Degradación esfingomielina/exocitosis granular
Catepsina D	Proteasa
Catepsina L	Proteasa
Receptor de manosa 6-fosfato	Tráfico de proteínas
ATPasa-H ⁺	Acidificador de los gránulos
Arilsulfatasa	Degradación de polisacáridos
β-Hexosamidasa	Degradación de polisacáridos
β-glucuronidasa	Degradación de polisacáridos
CD63	Marcador lisosomal
CD107a (Lamp-1)	Marcador lisosomal. Estabilización de la membrana plasmática durante la degranulación.

Dentro de las células efectoras, la perforina se mantiene inactiva ya que el dominio C2 no queda expuesto a la unión de Ca²⁺ (183). También en los gránulos citotóxicos, el pH ácido (pH ≤5), (184) y la intervención de la calreticulina como chaperona, mantienen la conformación inactiva de la proteína (185). Una vez liberada al exterior, la perforina encuentra un pH neutro y una gran concentración de Ca²⁺. Su unión al dominio C2 induce un cambio de conformación en la proteína. De este modo los monómeros de perforina pueden ensamblarse a la membrana, y entre sí, para formar un poro (183).

Aunque no está claro si la mera formación del poro es capaz de inducir la muerte a las células diana, se ha demostrado que su acción es esencial para poder inducir una respuesta inmune eficaz. Se ha visto que ratones deficientes en perforina no son capaces de mostrar esta respuesta (50, 51) y que, en su ausencia, las granzimas no llegan al citosol (186). Por eso se ha propuesto que las granzimas son las ejecutoras de la muerte celular (187).

- Las **granzimas** son serín proteasas de los gránulos citotóxicos, aunque también se han descrito en otros tipos celulares. Se conocen un total de 12 granzimas, de las cuales 7 son exclusivas de ratón y una es exclusiva de humanos (Tabla 1.4) (188).

Se sintetizan como zimógenos, por lo que han de proteolizarse para ser activas. Una vez en los gránulos citotóxicos, la catepsina C degrada los aminoácidos GlyGlu de su extremo N-terminal, activándola. Pero gracias al pH bajo de los gránulos, y a la formación de complejos serglicina/granzima (189) se mantienen inactivas. Una vez liberadas, acceden al citosol de la célula diana y proteolizan distintos sustratos induciendo la muerte celular, principalmente por apoptosis (190).

Tabla 1.4 La familia de las granzimas en humanos. Adaptada de Antón et al. 2018 (1).

Granzima	Especie	Actividad	Tipo celular
Granzima A	h,m	Triptasa	Tc, Treg, NK, NKT, GMC, Pne, MfAlv, Plaquetas (h)
Granzima B	h,m	ASPasa	Tc, Treg, NK, NKT, MC, MDSC (h), Bas (h), DC, GMC, linfocito B, Ser, Pne, Quer
Granzima H	h	Chymasa	NK
Granzima K	h,m	Triptasa	Tc, NK, NKT (h), CD56 ^{bright}
Granzima M	h,m	METasa	NK, NKT, T γ δ

Actividad: especificidad de corte. Especie. **h**: humano; **m**: murino. Tipo celular: principales tipos celulares donde se han detectado. **Tc**, Linfocitos T citotóxicos (T α β CD8+, T γ δ CD8+); **NK**, células NK; **NKT**, células NKT; **MDSC**, Células Supresoras de Origen Mieloide; **MC**, mastocitos; **Treg**, Células Treg; **Bas**, basófilos; **Mac**, macrófagos; **DC**, Células Dendríticas; **Ser**, Células de Sertoli; **GMC**, Células glándula metrial; **Pne**, neumocitos; **MfAlv**, Macrófagos alveolares; **Quer**, queratinocitos.

Estas proteínas fueron descritas en un principio por su capacidad de eliminar células alteradas, aunque ahora se conoce que intervienen en otros procesos como la inflamación o la regulación de la supervivencia de linfocitos activados. De hecho, algunos estudios muestran que la granzima A tiene mayor relevancia en procesos inflamatorios. Por otro lado, la funcionalidad de granzimas K, H y M sólo ha sido caracterizada en modelos *in vitro*, donde pueden inducir muerte celular o inflamación (granzima K y M) (169, 188, 190, 191).

La **granzima B** es, junto con la granzima A, la más abundante en los gránulos citotóxicos. Además, es la más relevante en la inducción de apoptosis (192). Ejerce su actividad proteasa sobre residuos de ácido aspártico (188), habiéndose identificado diversos sustratos intracelulares y extracelulares. Existen dos vías principales por las que puede inducir la muerte celular:

- Una vía dependiente de caspasas, en la cual proteoliza directamente a la caspasa 3 (modelo murino) o la proteína pro-apoptótica Bid (modelo humano) (193, 194). Como consecuencia, se induce la apoptosis de la célula diana (191).

- Una vía independiente de caspasas y de la vía mitocondrial de la apoptosis, que no está bien caracterizada (169). De hecho, se ha observado que células NK humanas activadas *ex vivo* (195), o linfocitos Tc específicos de tumor en un modelo murino (196), son capaces de inducir la muerte celular en tumores con resistencia a la apoptosis. Aunque no está claro qué vía de muerte celular produce la muerte de estas células, se ha sugerido que la granzima B podría actuar sobre distintos sustratos. Por ejemplo, el inhibidor de DNAsas ICAD, con la consiguiente degradación internucleosomal (197); o las proteínas lamina B (198), α -tubulina (199) y filamina (200), induciendo la pérdida de la integridad estructural del núcleo en el primer caso, o del citoesqueleto en los otros dos (201).

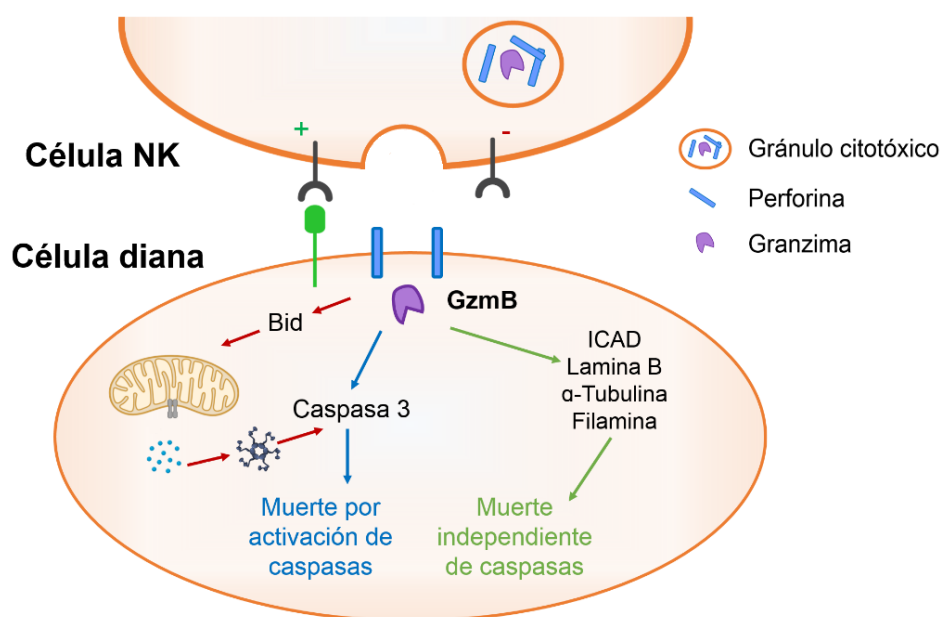


Figura 1.9 Mecanismos de muerte celular activador por las células NK, en células tumorales, a través de la vía de la exocitosis granular.

1.2.7 Células NK en el microentorno tumoral

Como se ha tratado anteriormente, las células NK tienen la capacidad innata de reconocer y eliminar células tumorales, y su infiltración en tumores está asociada a un buen pronóstico (202). Además son capaces de destruir CSC (del inglés, *Cancer Stem Cell*) (203) y controlar el desarrollo de metástasis (204). Sin embargo, son sensibles a los cambios que se producen en el microentorno tumoral. Éste les opone barreras para contactar con las células tumorales y las conduce a un estado de anergia (205).

En primer lugar, las células NK se ven afectadas por la polarización del microentorno a un **fenotipo T_{H2}**. En un contexto T_{H1} las células NK pueden interactuar con DCs y macrófagos que promueven su activación, o con neutrófilos, que favorecen su diferenciación (205). Sin embargo, en un contexto T_{H2} están expuestas a diversos factores que las modulan. Por ejemplo, las citoquinas liberadas por los TAFs, MDSC y Tregs disminuyen la expresión de NKp30, NKp44, DNAM-1 y NKG2D. Estas citoquinas inmunosupresoras son esencialmente PGE2 y TGF- β , el cual también actúa anclado a la membrana de los Treg (206-209). Adicionalmente, los Treg compiten con las células NK por la IL-2 del entorno (210).

Por otro lado, se ha observado que las células tumorales también pueden liberar citoquinas inmunosupresoras, como IDO o PGE2, que disminuyen la **expresión de los receptores de activación** (208). Otros mecanismos que contribuyen a la evasión del ataque de las células NK son la disminución de la expresión de los respectivos ligandos de activación (211); o su escisión (**shedding**), generando formas solubles que compiten por los receptores como NKG2D y NKp30 de las células NK (212); la inducción de señales de inhibición (PS) durante la apoptosis, que señala a través del receptor CD300a (213); o el desarrollo de mecanismos de **tolerancia**, debido a una exposición crónica a ligandos de activación como MICA, que generan la pérdida de los receptores de activación (211).

Finalmente, las células NK también se ven afectadas por factores físico-químicos, como la **hipoxia**, el **pH ácido** y la falta de **glucosa**. Por ejemplo, las especies reactivas de oxígeno (ROS) derivadas de los monocitos suprimen la actividad de las células NK e inducen su apoptosis (214, 215). También se produce un cambio metabólico en las células NK debido a los factores inducidos por la hipoxia (HIF-1; del inglés, *Hypoxia-Inducible Factor-1*) que, junto con la limitación de glucosa, promueven la polarización a su fenotipo regulador (216, 217).

1.3. Inmunoterapia

Las evidencias que apoyan la teoría de la inmunoedición y el ciclo de la inmunidad antitumoral impulsaron a que la terapia en cáncer se enfocara a la actividad antitumoral del sistema inmune (78, 218). Sin embargo, este concepto apareció mucho antes, cuando Coley observó la desaparición del tumor de un paciente con sarcoma tras haber desarrollado una infección en el mismo. En esta idea se basó el uso del bacilo BCG de la tuberculosis bovina (bacilo Calmette-Guérin) para prevenir la recurrencia del cáncer de vejiga (219). En ambos casos se piensa que la infección es capaz de reactivar el sistema inmune de los pacientes (220).

La **inmunoterapia** es una estrategia terapéutica que aprovecha el sistema inmune para conseguir una respuesta contra el tumor. En este sentido, es la primera que busca una respuesta duradera intentando prevenir recaídas o la aparición de metástasis (221). En cuanto a su mecanismo de acción, puede estar enfocada bien a modular o a restaurar el sistema inmune, según lo cual se hablará de **inmunoterapia activa** o **pasiva** (222).

1.3.1 Inmunoterapia activa

La inmunoterapia activa induce una respuesta inmune dentro del organismo. Este tipo de tratamientos requiere de un paciente inmunocompetente (1, 223).

1.3.1.1 No específica. Moduladores del sistema inmune

Los precursores de este grupo de tratamientos son las mencionadas toxina de Coley y la vacuna BCG. Actualmente, se encuentran aprobados los siguientes grupos de tratamientos:

Los **adyuvantes inmunoestimuladores** parten de la idea de que ya existe una respuesta específica frente al tumor, y pretenden activar dicha respuesta inmune al aportar las “señales de peligro” necesarias para generar un reconocimiento. Actúan favoreciendo la presentación antigénica o mediante la inducción de citoquinas proinflamatorias que generen un microentorno inmunoestimulador (1).

- **Agonistas de PRR.** Los PRR son receptores que reconocen señales de peligro asociadas a microbio, como el LPS; o asociadas a daño, como el DNA mitocondrial y HMGB-1 (del inglés, *High Mobility Group Box-1*). Entre ellos se encuentran los TLR y los NLR (del inglés,

Nucleotide-binding oligomerization domain containing (NOD)-Like Receptors). Aunque no de manera exclusiva, se encuentran en células del sistema inmune innato que liberan citoquinas como el IFN-I (222). Algunos ejemplos serían: el imiquimod (224), que reconoce TLR7; el mifamurtide, que reconoce NOD2 (225); el monofosforil lípido A que reconoce TLR4 (226) y la vacuna BCG que reconoce TLR2/TLR4 (227).

- **Inductores de muerte celular inmunogénica.** El concepto de muerte celular inmunogénica se refiere a un tipo de muerte controlada que es capaz desencadenar una respuesta inmune adaptativa y, por lo tanto, generar memoria inmunológica (222, 228). Los inductores de este tipo de muerte incluyen tratamientos de quimioterapia, radioterapia o terapia fotodinámica que pueden inducir la liberación de DAMPs, una mayor inmunogenicidad o una mayor sensibilidad al ataque de células efectoras (60, 229). Algunos ejemplos serían: bleomicina (230), bortezomib (231), ciclofosfamida (232), antraciclinas (233) y oxaliplatino (234).

- **Inhibidores del metabolismo inmunosupresor.** La enzimaIDO constituye uno de los principales inmunosupresores inducidos por los tumores, especialmente para linfocitos T (apartado 1.1.4.1) (60). Algunos inhibidores deIDO, como el indoximod (1-metil-*D*-triptófano), se encuentran en ensayo (222).

- **Otros.** La lenalidomida y la pomalidomida son derivados de la talidomida con propiedades inmunomoduladoras (235). Estos fármacos tienen un efecto indirecto *in vivo* en la modulación de células NK (236). Otros agentes inclinan el balance de la población de macrófagos M1 sobre los M2. Por ejemplo, la trabectedina que es el único aprobado para su uso en clínica, o inhibidores de la señalización de vías de quimioquinas como la CCL2/CCR2 (229) y la CXCR4 (237). También existen, en ensayo, estrategias para eliminar las células MDSC circulantes, por ejemplo mediante ATRA (del inglés, *All-transretinoic acid*) (238); o mAb bloqueantes de la señal antifagocítica CD47 (239). Por último, se está estudiando el bloqueo de la citoquina inmunosupresora TGF- β mediante mAbs como el Fresolimumab (240), o impidiendo la vía de señalización con un inhibidor de kinasas del receptor de TGF- β (241).

Las **citoquinas** se pueden administrar *in vivo*, generalmente por vía parenteral, para generar una respuesta antitumoral. Su acción se dirige principalmente a las células efectoras del sistema inmune (linfocitos Tc y células NK), pero también a las células del estroma (1). El inconveniente es que, para conseguir concentraciones efectivas a nivel tumoral, es necesario administrar las citoquinas a altas dosis que suelen ocasionar toxicidades (242, 243). Dentro de las citoquinas aprobadas en clínica se encuentran el IFN- α y la IL-2. La IL-2 también se ha formulado combinada a la toxina de la difteria para ejercer citotoxicidad sobre células que expresen el receptor de IL-2 (222); o modificada genéticamente para disminuir su afinidad por el receptor IL-2R α y mejorar su especificidad sobre linfocitos T antitumorales (244). Otros ejemplos de citoquinas en ensayo son: la IL-12 (245), IL-15 (246), IL-18 (247) e IL-21 (248). Aunque la IL-15, (249) y la IL-21 (250) han mostrado cierta eficacia en monoterapia, estas citoquinas se administran como coadyuvantes de otras inmunoterapias.

1.3.1.2 Específica.

A diferencia del caso anterior, la inmunoterapia específica se basa en la inducción de una respuesta frente a antígenos concretos del tumor, que se presentan de manera inmunogénica. De este modo se pretende superar la tolerancia al tumor.

1.3.1.2 a Vacunas

Los primeros intentos de este tipo de terapia se remontan a principios del siglo XX, cuando Le Bertrand utilizó una vacuna de células tumorales del propio paciente (autólogas) y observó un caso de regresión. Hoy en día se disponen de técnicas para identificar los antígenos tumorales y administrarlos junto con adyuvantes para generar una respuesta efectiva y duradera (1). Según el producto que se administre se distinguen:

- **Vacunas de péptidos:** se dirigen frente a antígenos específicos de tumor o antígenos asociados a tumor. Estos últimos pueden estar presentes en las células normales pero su expresión se altera en tumores. Los tratamientos se pueden basar en una combinación de péptidos sintéticos inmunogénicos comunes a distintos pacientes (251, 252), un lisado tumoral autólogo, o un lisado tumoral de otro paciente con el mismo tumor (allogénico) (348). Cada estrategia tiene sus ventajas e inconvenientes; por ejemplo, la restricción alélica de MHC, la accesibilidad del tumor o el volumen tumoral (1). Una alternativa reciente a las vacunas de

péptidos son las **vacunas de ADN**, en las que la secuencia que codifica para el antígeno se inserta en un vector que se administra al paciente (222).

- Terapia de **células dendríticas**: aprovecha la capacidad de presentación antigénica de las DCs y su efecto inmunomodulador al liberar IL-12, IL1- β y TNF- α (253). Se suele partir de monocitos de sangre periférica del paciente, aunque también de DCs circulantes o precursores CD34⁺. Estas células se maduran *in vitro* y se incuban con péptidos sintéticos, mRNA o lisados tumorales para aumentar su inmunogenicidad (Figura 1.10) (222, 254). Los ensayos clínicos realizados hasta el momento han demostrado que es una estrategia segura con una eficacia variable. A pesar de ello, en el 2010 se aprobó la vacuna Sipuleucel-T frente al cáncer avanzado de próstata (255).

1.3.1.2 b Anticuerpos reguladores de puntos de control del sistema inmune

Estos mAbs se denominan inmunomoduladores por ir dirigidos frente a moléculas de co-estimulación o co-inhibición, que están implicadas en la activación y homeostasis del sistema inmune. De este modo, favorecen la respuesta anti-tumoral y contribuyen a superar el estado de tolerancia inducido por el tumor como mecanismo de evasión (256).

- **Activadores**: actúan como agonistas de las moléculas co-estimuladoras. Estas moléculas pueden pertenecer a la superfamilia de las Ig, como **CD28**. Los agonistas de CD28 actúan aportando la segunda señal en la activación de linfocitos T. Sin embargo han mostrado graves efectos adversos en los ensayos clínicos (257). Por otro lado se encuentran las moléculas de la superfamilia del TNFR, que son diana de mAbs en ensayo. El mAb Urelumab está dirigido frente a **CD137**, que se expresa en linfocitos activados y en células NK que han reconocido un Ab a través de CD16 (257, 258). Los agonistas de **OX40** y de **GITR** (del inglés, *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related protein*) favorecen la proliferación y supervivencia de los linfocitos T_c y T_H, e inhiben la acción de las Treg. En el caso de **CD40**, favorecen la activación de a las APCs y la presentación antigénica. Finalmente, los agonistas de **CD27** favorecen la activación de linfocitos T y B vírgenes y la función de las células NK (258).

- **Inhibidores**: actúan bloqueando receptores que inicialmente fueron identificados como marcadores de linfocitos T exhaustos tras su activación, por lo que

pretenden devolver la funcionalidad a estos linfocitos (259, 260). Posteriormente, se ha observado que otras poblaciones celulares también son capaces de expresarlos. Por ejemplo, las células NK de los pacientes con cáncer sobreexpresan PD-1, TGIT y TIM-3 (258, 260). El primer mAb aprobado frente a estos *checkpoints* fue el **bloqueante de CTLA-4** (Ipilimumab) (260). Libera los ligandos CD80/86 de las APC ganglionares, de modo que se pueden unir al receptor co-estimulador CD28 de los linfocitos T (258). Además, también favorece la depleción de linfocitos Treg. Posteriormente llegaron los anticuerpos frente al **receptor PD-1** (Nivolumab, Pembrolizumab y Pidilizumab), o frente a sus **ligandos, PD-L1** (Atezolizumab) y **PD-L2** (en ensayo clínico) (258). Actúan a nivel del microentorno tumoral, impidiendo la interacción con el tumor y las células del estroma. Los bloqueantes de PD-1 favorecen además la depleción de linfocitos Treg (258, 261, 262). Estos dos grupos de inhibidores de *checkpoints* han mostrado respuestas duraderas en distintos tipos tumorales, especialmente melanoma y cáncer de pulmón (260, 263). Sin embargo, la aparición de resistencias y de efectos adversos relacionados con autoinmunidad han evidenciado la necesidad de encontrar biomarcadores de respuesta y otros tratamientos alternativos (256). Otros mAbs en ensayo están dirigidos frente a los receptores **LAG-3**, **TIM-3**, **TIGIT** y **VISTA** (256). De hecho, aunque la **estrategia de combinación** más estudiada es la de CTLA-4 y PD-1 (258), la combinación de anti-LAG-3 (264), o de anti-TIM-3 (265), con los inhibidores de PD-1 ha mostrado sinergia. Finalmente, también existen mAb para receptores expresados principalmente en las células NK, aunque también en algunas poblaciones de linfocitos T. Es el caso de los mAb anti-**KIR** (Lirilumab) y anti-**NKG2A** (Monalizumab), que se encuentran en ensayo. Mientras que Lirilumab no ha conseguido mostrar eficacia, parece que Monalizumab ofrece buenos resultados (258, 266).

1.3.2 Inmunoterapia pasiva

Engloba a una serie de agentes terapéuticos que poseen actividad antineoplásica por sí mismos. Por ello se dice que restauran las funciones alteradas del sistema inmune del paciente.

1.3.2.1 Específica. Anticuerpos antitumorales

Esta estrategia tiene su origen en el trabajo de Miltein y Köler, quienes desarrollaron la tecnología para la producción de mAb. En la actualidad, es la inmunoterapia más empleada y la mejor caracterizada. Atendiendo a su funcionalidad se ha establecido una clasificación de los distintos mAb (222, 267).

- Anticuerpos dirigidos frente a **receptores de vías de señalización** activadas en las células tumorales. Actúan bloqueando la unión del ligando e impidiendo así el crecimiento y proliferación celular. Por ejemplo: el anticuerpo Cetuximab frente a EGFR (268).

- Anticuerpos que reconocen y **neutralizan factores tróficos** producidos por el tumor o las células del estroma. Por ejemplo: el anticuerpo Bevacizumab, que bloquea el factor VEGF previniendo la angiogénesis, el crecimiento tumoral y la metástasis (269).

- Anticuerpos que inducen la **muerte de las células tumorales** directamente o a través de otros mecanismos que implican al sistema inmune (vía del complemento, fagocitosis o ADCC). Por ejemplo: el anticuerpo Rituximab frente al CD20 de los linfocitos B (270).

- Anticuerpos monoclonales **conjugados** a toxinas, drogas o isótopos radiactivos. En este caso el anticuerpo actúa como un transportador que dirige al tumor un cierto compuesto activo antineoplásico. Por ejemplo, el anticuerpo Gemtuzumab Ozogamicina dirigido frente a CD33 y unido al antibiótico antitumoral calicheamicina (271).

- Anticuerpos **bi-/tri- específicos**, que se unen a varias dianas simultáneamente. El diseño de estos anticuerpos es muy variado. Por ejemplo, Catumaxomab (272) es un anticuerpo triespecífico que resulta de la combinación de las cadenas pesadas y ligeras de dos mAb frente a EPCAM y CD3. Blinatumomab (273) es un anticuerpo de los denominados BiTE (del inglés, *Bispecific T cell engager*) producidos por la unión de dos scFv (del inglés, *single chain variable domain fragment*), frente a CD19 y CD3, a través de un espaciador (274-276).

Por último indicar que, además de estas funciones descritas, los mAb también pueden poseer propiedades inmunomoduladoras asociadas a su fragmento Fc. Los anticuerpos con isotipo IgG1 desencadenan respuesta de ADCC, como ocurre por ejemplo en el caso del Cetuximab (222, 277).

1.3.2.2 Virus oncolíticos

La viroterapia utiliza cepas de virus no patogénicos, que infectan específicamente a células tumorales. Esta especificidad se debe más al metabolismo tumoral que al tropismo viral (278, 279). Este potencial citotóxico puede ser innato, debido a un exceso de metabolismo en la célula tumoral que se conoce como “efecto citopático”. Por otro lado, puede ser mediado por productos génicos que sean tóxicos para la célula (222). La liberación de restos celulares y antígenos virales debido a la lisis tumoral contribuye a generar una respuesta inmune (280). Además, mediante la manipulación genética se pueden dirigir los virus frente a antígenos específicos; inducir la síntesis de enzimas que convierten profármacos en agentes citotóxicos; o hacer que expresen citoquinas/ quimiocinas inmunomoduladoras (222). Actualmente se encuentra aprobado el uso de Talimogene Laherparepvec, un virus herpes-simple 1 atenuado, para el tratamiento del melanoma (281).

1.3.2.3 Inmunoterapia celular adoptiva

En general, la ACT (del inglés, *Adoptive Cell Therapy*) se basa en la transferencia de células citotóxicas que se han manipulado *ex vivo* para modificarlas, activarlas o expandirlas. Según el origen de las células transferidas se habla de una inmunoterapia celular autóloga o alogénica.

1.3.2.3 a Inmunoterapia celular adoptiva no específica

Las **células LAK** (del inglés, *Lymphokine Activated Killer*) se obtienen del cultivo de los linfocitos de sangre periférica (PBMCs; del inglés, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) con altas dosis de IL-2. Resulta una población heterogénea que parece provenir de las células NK (**Figura 1.10**) (243). Las células LAK pueden reconocer y destruir un rango amplio, no específico, de células transformadas. Su eficacia *in vivo* depende de la continua administración de IL-2, lo cual genera altas toxicidades (282, 283). Además, un ensayo que comparaba la eficacia de la administración de IL-2 sola o en combinación con LAK no pudo probar su beneficio clínico (284). Por todo ello, no se siguió con su uso en clínica (285, 286); aunque estudios posteriores apuestan por una optimización del protocolo de empleo (287).

Las **células NK**, tienen de manera innata el potencial para destruir células alteradas. En el contexto de un tumor desarrollado, se pueden activar *ex vivo* para incrementar su potencial citotóxico; tal y como se desarrolla posteriormente (apartado 1.3.3.1).

Las células **CIK** (del inglés, *Cytokine Induced Killers*) son una población heterogénea de células **NKT**, activadas *in vitro* a partir de la incubación con IL-2, IFN- γ y OKT3, aunque también se está estudiando el efecto de otras ILs como IL-1, IL-7 o IL-15. En ensayos clínicos, el empleo de células **CIK** ha mostrado ser seguro y mejorar el tiempo hasta la recaída o la supervivencia (187(288)).

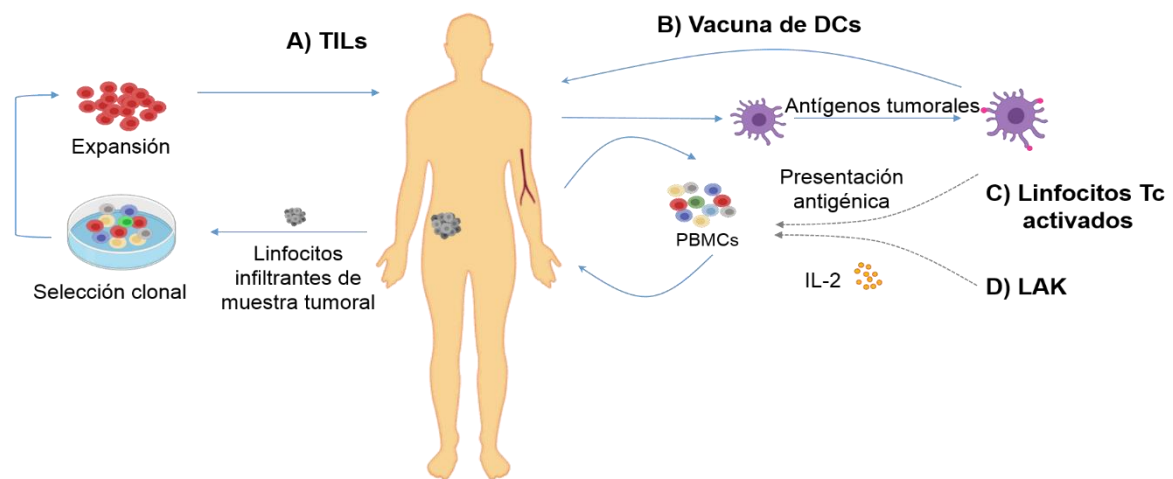


Figura 1.10 Inmunoterapia celular basada en A) TILs purificados a partir de biopsias; B) Vacunas de DCs expuestas a antígenos tumorales; C) Linfocitos Tc activados, a partir de PBMCs, con péptidos tumorales y D) LAK activados, a partir de PBMCs, con altas dosis de IL-2. Elaboración propia.

1.3.2.3.b Inmunoterapia celular adoptiva específica

Dentro de la **terapia basada en linfocitos T** se pueden distinguir distintas estrategias de modulación de la actividad *ex vivo* (Figura 1.10). Por un lado, la obtención de **linfocitos Tc** específicos de antígenos tumorales a partir de PBLs que se cultivan con DCs o agonistas de CD3 y CD28, en presencia del antígeno tumoral. Debido a su falta de reproducibilidad, el escape antigénico de los clones del tumor (289, 290) y su elevado coste, esta terapia todavía se encuentra en ensayo (291, 292). Por otro lado, la obtención de **TILs** (del inglés, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) a partir de biopsias de tumor que se cultivan en un medio suplementado con IL-2. Los clones que se desarrollan de esta primera estimulación se expanden con células estimuladoras, el anticuerpo OKT3 (agonista anti-CD3) e IL-2 durante 5-6 semanas. Esta aproximación se encuentra más extendida y cuenta con resultados esperanzadores para algunos tumores como el melanoma (243, 293, 294). Sin embargo, todavía no existen ensayos que demuestren su superioridad frente a otros tratamientos establecidos (1, 290).

Una de las principales desventajas del empleo de TILs es su escasa disponibilidad por problemas de accesibilidad al tumor. Para solventar este problema, y mejorar además la eficacia antitumoral, se planteó como alternativa el desarrollo linfocitos T modificados genéticamente que expresaran un receptor quimérico (CAR; del inglés, *Chimeric Antigen Receptor*) específico de un antígeno tumoral. Es lo que se conoce como células **CAR-T** (1, 243, 290).

El diseño de los **CAR-T** está basado en la estructura de un TCR, pero con la ventaja de no estar restringidos por HLA. El primer CAR-T fue diseñado por el grupo de Eshhar en 1989 (295). Su estructura básica se compone de los siguientes dominios (Figura 1.11):

- Un **dominio extracelular de reconocimiento** de antígeno. Generalmente, se trata de un scFV, que se compone de las regiones variables de un mAb unidas por un espaciador. Sin embargo, también pueden encontrarse regiones de fragmentos Fab de anticuerpos o ligandos de un determinado receptor. Una de las ventajas de los CAR es que no sólo pueden reconocer péptidos, sino también carbohidratos y glicolípidos (296). Al final de la secuencia de este dominio de reconocimiento se encuentra una **región bisagra**, que es el responsable de ofrecer flexibilidad de movimiento (297). Generalmente, el espaciador se compone de la región bisagra de la IgG1 (296).

- Un **dominio transmembrana**, que cumple con funciones estructurales. Son comunes los dominios transmembrana de CD3, CD4 y CD8 (298).

- Un **dominio intracelular** de transducción de la señal. Normalmente está formado por la cadena CD3- ζ que, tras recibir la señal de unión, es capaz de poner en marcha los mecanismos citotóxicos (296).

Estos dominios esenciales constituyen los denominados **CARs de primera generación**. Sin embargo, incluso modelos *in vivo* de ratón, estos CAR no fueron capaces de inducir una respuesta potente de citoquinas, como la IL-2 o IFN- γ , volviéndose anérgicos; ni generar una expansión (296, 299).

- La introducción de **dominios de coestimulación** en la fracción intracelular del CARs dio lugar a los CAR de **segunda** (un dominio) y **tercera** (más de un dominio) **generación**. Hasta el momento se han utilizado multitud de dominios diferentes que se corresponden con la

INTRODUCCIÓN

fracción citoplasmática de las moléculas CD28, 4-1BB, DAP10, OX40 o ICOS. La inclusión de estos dominios proporciona una mayor actividad y persistencia de los CAR-T (296, 298, 299).

Posteriormente se diseñaron los **CARs de cuarta generación**, también denominados “CARs armados” o TRUCKS (del inglés, *T cell Redirected Universal Cytokine Killing*). En este caso, tras la activación del CAR se activan vías de transducción por las que se libera una molécula transgénica (presente en otro transgen) al microentorno (300), por ejemplo, la IL-12 (301) o la IL-18 (302). A partir de aquí, se han ido desarrollando distintos enfoques para mejorar la efectividad, especificidad y persistencia de los CAR; de modo que se habla de la “**siguiente generación de CARs**” (303): basados en nanobodies (304); quiméricos (305); bifásicos, que reconocen dos antígenos (306); duales específicos, donde una célula expresa dos CARs (307).

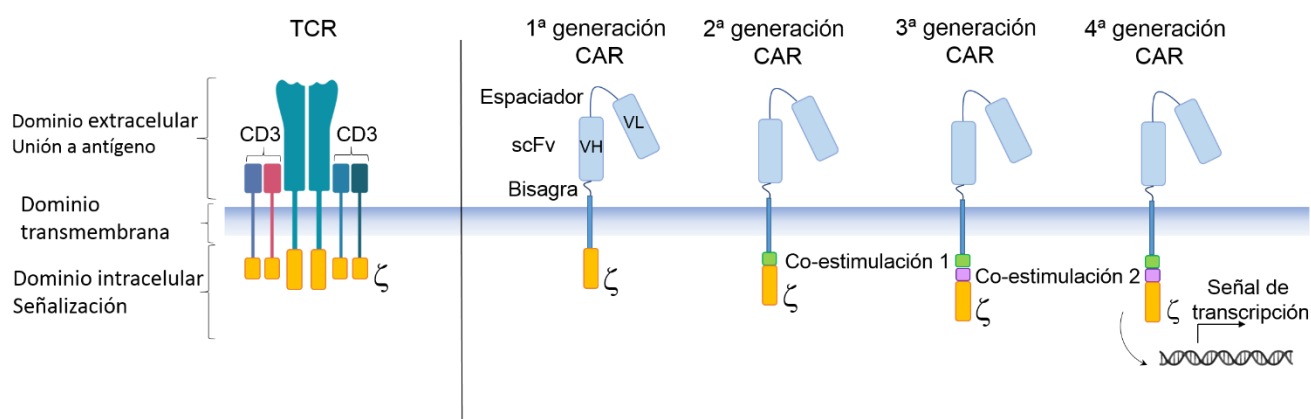


Figura 1.11 Diseño y evolución de los Receptores Quiméricos de Antígeno (CAR). Elaboración propia.

A nivel clínico, dos terapias CAR-T cuentan con la aprobación de las agencias reguladoras europea y americana. Son el Tisagenlecleucel -T (CD19-41BB-CD3ζ) y Axicabtagén Ciloleucel (CD19-CD28- CD3ζ) (300). Los ensayos clínicos con CARs frente a CD19 han mostrado resultados exitosos frente a neoplasias hematológicas de la estirpe B (308, 309). En cuanto a tumores sólidos, se han generado CARs frente a un gran número de dianas (EGFR, CEA, Her2, MART, GD2 etc), que son antígenos compartidos por un tipo tumoral. Los resultados encontrados hasta el momento son más modestos y variables, probablemente debido a todas las barreras del microentorno (310, 311).

1.3.3 Inmunoterapia basada en células NK

La actividad anti-tumoral *in vivo* de las células NK está regulada por factores que implican al tumor y al estroma. Por eso, una parte de la terapia basada en células NK se ha centrado en fármacos que favorecen la activación de las células NK endógenas. Estos fármacos se encuadran dentro de las **estrategias activas** mencionadas anteriormente (apartado 1.3.1).

El ejemplo más claro se encuentra en los primeros estudios basados en la administración de IL-2 a los pacientes. La administración de **citoquinas** como la IL-2 y la IL-15 tienen un efecto en la persistencia, expansión, migración o citotoxicidad (249). Entre otros mecanismos, ensayos *in vitro* han mostrado una alteración en el **perfil de receptores**, sobreexpresando receptores de activación como NKG2D y algunos NCR. También los **fármacos inmunomodulares** como la lenalidomida han mostrado un aumento de NKp44 y NKp46 en las células NK de pacientes tratados (312). Finalmente, el **bloqueo del TGF- β** elimina el antagonismo que produce la citoquina sobre los efectos de la IL-15, e induce la expresión de NKG2D y NKp30 (236).

Otra estrategia para mejorar la función de las células NK se basa en alterar el balance de **señales de activación e inhibición** que reciben del entorno. En el primer caso, algunos mAbs inducen ADCC, el fármaco bortezomib disminuye la expresión de HLA-I (313) y los fármacos etopósido y doxorubicina aumentan la expresión de DNAM-1 y de ligandos de NKG2Dn(314). En el segundo caso, algunos mAb bloquean los receptores KIR o sus ligandos; otros bloquean ligandos de inhibición solubles que libera el tumor; otros mAb bloquean los puntos de control de las células NK, etc.

1.3.3.1 Inmunoterapia celular adoptiva con células NK

La ACT con células NK empezó a despuntar a raíz de los de los **trasplantes de células hematopoiéticas** (HSCT; del inglés, *Hematopoietic Stem Cell Transplantation*) (315). Estos trasplantes se pueden realizar en condiciones de (316):

- HLA-idéntico, donde donante y receptor comparten los dos haplotipos. Aunque se minimizan los riesgos de rechazo, es una condición difícil de cumplir.
- HLA-haploidéntico, donde donante y receptor comparten un haplotipo y difieren en el otro, por lo que suele implicar a familiares del paciente.

- No compatible, donde difieren los dos haplotipos. Es una condición a evitar.

Los trasplantes **haploidénticos** son los más habituales, aunque conllevan riesgos asociados al tratamiento. Por ejemplo, la población de células T alorreactivas del donante puede generar una enfermedad de injerto frente a huésped (GvHD; del inglés, *Graft vs Host Disease*). Es por ello que la terapia evolucionó en la selección de las poblaciones celulares transferidas (317). Así se vio que en aquellos en que se habían eliminado los linfocitos T, existía una población de **células NK alorreactivas** procedentes del donante que eran capaces de reconstituir rápidamente las células NK circulantes (318). Esas células NK, que se caracterizaban por la falta de complementariedad en un haplotipo, eran capaces de rechazar células tumorales de leucemia sin generar GvHD (316, 319-321). Esta terapia se centró entonces en el la caracterización fenotípica de los KIR y HLA del donante y el receptor para asegurar una falta de complementariedad, pero minimizando el riesgo de rechazo. Como consecuencia, se observó una mejoría en las tasas de supervivencia y recaída (315, 322, 323).

En este contexto, se consideró la **inmunoterapia celular adoptiva con células NK** (Figura 1.12) como una alternativa terapéutica a los tratamientos convencionales de quimio y radioterapia. Además, en términos de terapia celular, las células NK presentan la ventaja, sobre los linfocitos T, de no tener una respuesta específica de antígeno restringida por HLA.

1.3.3.1 a Fuentes de células NK

Los primeros ensayos basados en esta terapia celular se realizaron utilizando **células NK autólogas** (Figura 1.12) para tratar neoplasias hematológicas; aunque posteriormente también se han evaluado frente a tumores sólidos como cáncer de mama (324), melanoma o carcinoma de riñón (325). Sin embargo, aunque es una terapia que reduce las posibilidades de rechazo, no se han observado beneficios clínicos (326). Esta falta de respuesta se asocia a los efectos secundarios de la co-administración de IL-2, como la proliferación de linfocitos Treg (210), y a la tolerancia de HLA esencialmente (327). Por ello, se ha preferido el uso de **células NK alogénicas** (Figura 1.12) que, a partir de la experiencia en los HSCTs, han mostrado ser efectivas sin comprometer la seguridad del paciente (328, 329). Posteriormente, se realizaron ensayos basados en células NK alogénicas en un contexto fuera del trasplante de células hematopoiéticas (330). Estos ensayos se dirigieron principalmente a neoplasias hematológicas (331, 332), con

alguna excepción de tumores sólidos como el cáncer de pulmón o el cáncer ovárico y de mama (333, 334).

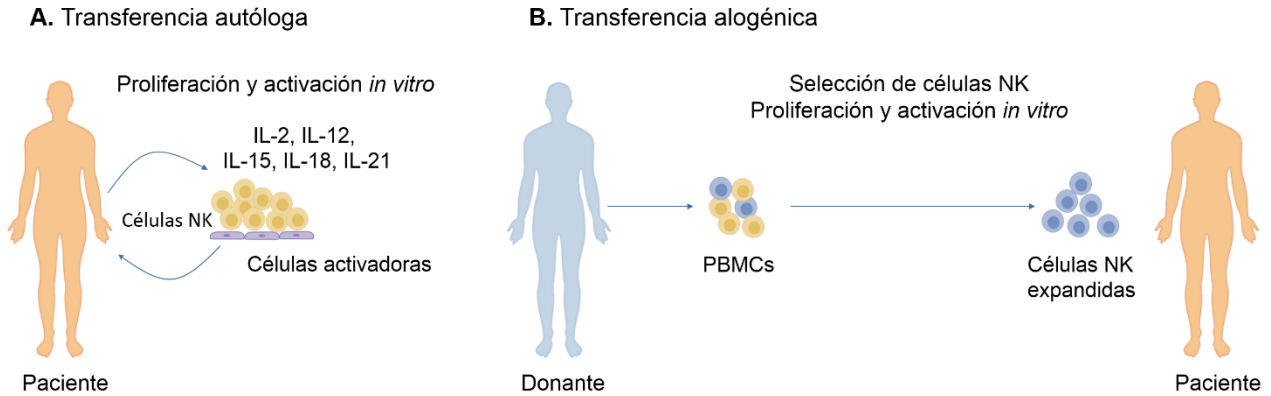


Figura 1.12 Terapia celular adoptiva de células NK A) alogénicas o B) autólogas, activadas y expandidas *ex vivo*. Elaboración propia, basada en la figura de Guillery et al. 2016 (335).

Otra estrategia consiste en el empleo de **líneas celulares**, que están caracterizadas y no presentan problemas de supervivencia a largo plazo como en el caso de las células NK primarias (322). La línea celular NK-92 es la única que está aprobada para su uso en clínica. Presenta las características de carecer de KIRs y ser dependiente de IL-2. Su eficacia se ha probado en varios ensayos, aunque con malos resultados (336, 337). Así, la inmunoterapia con células NK involucra habitualmente a un donante, y se distinguen distintas fuentes para su obtención:

- **PBMCs:** se pueden obtener directamente del donante o tras una leucaféresis, utilizando factores estimuladores como el G-CSF (del inglés, *Granulocyte*- Colony Stimulating Factor) para movilizar progenitores hematopoyéticos CD34⁺. Constituyen la principal fuente de obtención y, debido al escaso número de células NK (5-20% de los PBMCs), es necesario aplicar técnicas de expansión *ex vivo* (aparato 1.3.3.1b) (315).

- **Médula ósea y cordón umbilical:** ambas son una fuente importante de progenitores hematopoyéticos CD34⁺. La primera tiene un uso minoritario debido a que se prefiere la leucaféresis. Sin embargo, el uso del cordón umbilical se consolidó tras el primer trasplante en un paciente con anemia de Fanconi (338). Los protocolos de expansión realizados con éxito requieren un cultivo enriquecido en citoquinas (339) o su combinación con líneas celulares estromales para reconstituir el microentorno de la médula ósea (340). Otra alternativa es la expansión de las células CD56⁺ derivadas del cordón con protocolos similares a los de los

PBMCs (340, 341). Las altas tasas de expansión de algunos estudios han llevado a la realización de ensayos clínicos (342).

- **Células madre embrionarias (hESC) y pluripotentes inducidas (iPSC):** poseen una pluripotencia innata (hESC) o adquirida, tras tratar células somáticas con ciertos factores reprogramantes (iPSC). A partir de ellas se pueden diferenciar los progenitores hematopoyéticos CD34⁺ y conseguir la diferenciación a células NK a través de distintos protocolos. Algunos de ellos han conseguido alcanzar la producción a escala clínica (343, 344).

1.3.3.1 b Protocolos de activación y expansión de células NK

Como se ya se conocía a partir de la experiencia con las LAK, la capacidad citotóxica de las células NK puede aumentar con la exposición de las células a algunos factores como la IL-2. Además, para su uso en clínica, se requiere un número elevado de células (con rangos típicos de 5-50x10⁶/kg) (322). Por ello, ha habido un gran interés en el desarrollo de protocolos que permitan la activación y expansión de las células NK. Estos protocolos pueden partir del conjunto de PBMCs o de células CD56⁺ purificadas. Aunque para la producción en condiciones GMP (del inglés, *Good Manufacturing Practice*) se suele realizar la eliminación de células CD3⁺ y la posterior selección de las células CD56⁺ antes de su expansión (345). Generalmente, los protocolos estudiados se mantienen en cultivo durante 2-3 semanas, y emplean una combinación de distintos factores que proporcionen señales de supervivencia, proliferación y activación (346).

- **Interleuquinas:** Las células NK activadas a base de IL se suelen denominar CIK (de inglés, *Cytokine Induced Killers*) (346). La **IL-2** es la más estudiada. Se ha visto que aumenta la proliferación y la citotoxicidad de las células NK (347, 348). La **IL-15** promueve el desarrollo (349), expansión y supervivencia (350, 351) de las células NK en mayor medida que la IL-2 (346), y también es capaz de aumentar su citotoxicidad (352). En el organismo señala a través de los receptores IL-2/IL-15 $\beta\gamma$ de las células NK al ser trans-presenta en la superficie de los monocitos (353), por lo que algunos estudios han simulado esta presentación a través de células estimuladoras (354, 355). La **IL-12** promueve un fenotipo más maduro en las células NK; aumenta la expresión de moléculas de adhesión (356) y de CD16 y, en consiguiente, su capacidad citotóxica a través de ADCC (357, 358); y la liberación de IFN- γ (359). De manera similar, la **IL-21** también promueve la maduración de las células CD56^{dim}. Así, la exposición a esta IL favorece la liberación de IFN- γ y de ADCC (360). Sola no afecta a la proliferación de las células NK, pero

puede cooperar con las demás en este efecto (361). Finalmente, la **IL-18** sinergiza con la IL-2 en la proliferación de las células NK (362) o con la IL-12 y la IL-15 en la generación de un fenotipo de memoria y la producción de IFN- γ (135).

- **Células estimuladoras:** son capaces de incrementar la tasa de expansión respecto al uso de ILs solas. Algunos estudios han utilizado el conjunto de **PBMCs irradiados** como células estimuladoras (363), aunque lo más común es el empleo de líneas celulares. Por ejemplo, las **líneas celulares linfoblastoides B** (LCL) transformadas con el virus Epstein-Barr (EBV⁺) (341, 364, 365), la línea celular **linfoblastoide T-KL1** (366) o la línea celular de **leucemia K562**. Esta última se ha modificado genéticamente para expresar quimeras de IL-15 y 4-1BB, o de IL-21 y 4-1BB, ancladas en la membrana (361, 367, 368)

- Otros factores que se han incluido en los cócteles de estimulación son la **hidrocortisona** (369), o agonistas de CD16 (346).

- **Expresión de CARs:** aunque es una estrategia todavía menos expandida que en el caso de linfocitos T, las células NK presentan ciertas ventajas: mantienen su capacidad antitumoral innata, no generan una expansión clonal con el consiguiente síndrome de liberación de citoquinas y no provocan GvHD (370-372) Gracias a estas ventajas se ha extendido su estudio a nivel pre-clínico y hay alrededor 20 ensayos clínicos frente a distintas dianas como CD19, CD30, GD2, mesotelina o Her2. Los CARs se pueden clonar tanto en células primarias como en la línea NK92, aunque con una eficiencia menor a los linfocitos T (372). Finalmente, se está estudiando la introducción de dominios intracelulares propios de las células NK, como NKG2D (373) o 2B4 Alvater (374), para mejorar la transducción.

Una vez optimizado el protocolo de expansión, es necesario tener en cuenta ciertos factores a la hora de llevar a la **clínica** la ACT con células NK. En primer lugar, la pureza, viabilidad y caracterización del cultivo. Aunque no hay unos requisitos estandarizados, algunos estudios han establecido sus criterios para evitar una situación de GvHD o una tormenta de citoquinas. La caracterización del cultivo también permite determinar el perfil de receptores que expresan las células NK, por ejemplo, es común la escisión “shedding” de CD16 en la expansión (345, 375). En segundo lugar, hay que considerar que la vida media de las células NK *in vivo* suele estar entorno a los 7 días. Por ello, es necesaria la administración concomitante de citoquinas para mejorar su supervivencia sin afectar a su actividad (376, 377). Por último, existen barreras

fisiológicas y tumorales que reducen su actividad, en especial en el caso de los tumores sólidos. Por eso, se ha estudiado la combinación de la ACT basada en células NK con otros tratamientos que mejoren su actividad (apartado 1.3.3). Por ejemplo, estrategias para potenciar el reconocimiento de las células transformadas; mejorar el tráfico hacia el tumor; o superar la inmunosupresión del microentorno (335, 378).

1.3.4 Retos de la inmunoterapia

Como se comentó anteriormente, el principal reto de la inmunoterapia es lograr una respuesta duradera, creando memoria inmune. Sin embargo, cada una de las distintas estrategias tiene unos retos particulares.

La terapia que cuenta con una mayor experiencia es la basada en los **anticuerpos monoclonales**. Esto ha permitido observar a la aparición de resistencias que permiten la supervivencia del tumor (379, 380). Igualmente se han detectado casos de inmunogenicidad de los anticuerpos, que pueden reducir su efectividad (381).

La **ACT** tiene como reto principal asegurar la persistencia y proliferación de las células transferidas. Los estudios han comprobado que es necesario un acondicionamiento previo del paciente para inducir inmunosupresión y una administración de IL-2 en combinación con esta terapia (290). Por otro lado, en tumores sólidos, la eficacia va a estar asociada a la capacidad de infiltración de los linfocitos (472).

En cuanto a la terapia con **CAR**, existe una gran investigación por delante para mejorar los resultados en tumores sólidos. Por otro lado, se debe estudiar la toxicidad del tratamiento. Es necesaria una selección cuidadosa del antígeno. Por lo general se prefieren neoantígenos frente a los antígenos asociados a tumor. Los últimos son propensos a generar respuestas específicas de la diana fuera del tumor. Por ejemplo, en los CAR frente a CD19 se produce una depleción de linfocitos B, que se puede resolver mediante el aporte de inmunoglobulinas. Sin embargo, el CAR frente a Her2 resultó altamente tóxico (382). Otros aspectos a prevenir serían: la tormenta de citoquinas inducida por los linfocitos T activados (383); la aparición de inmunogenicidad frente al CAR o la aparición de mutaciones en oncogenes derivada del uso de retrovirus; o la selección de clones tumorales que dejan de expresar el antígeno frente al que se genera el CAR (296, 310).

1.4 Cáncer colorrectal

El **cáncer colorrectal (CCR)** se ha establecido como un grave problema de salud a nivel mundial. Es el tercer tipo de cáncer más diagnosticado (6,1%) y el segundo más letal (9,2%). Según las últimas estadísticas de GLOBOCAN del año 2018, se diagnosticaron 1,8 millones de nuevos casos y hubo 880.000 muertes asociadas a la enfermedad (384). La **incidencia y mortalidad**, en comparación con el conjunto de cánceres, también depende del género y la edad. Existe una mayor incidencia y mortalidad en los hombres, y su inicio suele ser más común a partir de los 50 años (385) aunque existe una tendencia a la alza en adultos jóvenes (386). En base a estos datos se han realizado programas de estrategias de **cribado y diagnóstico** temprano (386). Según la localización geográfica, el CCR presenta una incidencia 3 veces superior en países desarrollados, afectando a Europa, Norteamérica, Australia y este asiático. Su incidencia en estas áreas está en aumento, ya que se ve influido por **patrones alimenticios** y el estilo de vida. Sin embargo, las tasas de mortalidad disminuyen frente a los países en vías de desarrollo, gracias a los **avances terapéuticos** (384).

Los **factores de riesgo** comprenden aspectos ambientales y genéticos, como síndromes hereditarios (386) (poliposis adenomatosa familiar, poliposis asociadas al gen *MUTYH*, síndrome de Lynch) (387) o enfermedad inflamatoria intestinal (388) y cambios en la microbiota (389). Todo ello afectará a la patogenia de la enfermedad.

1.4.1 Patogenia del CCR: carcinogénesis y metástasis

El CCR es una enfermedad heterogénea que comprende varios pasos en los que se van acumulando mutaciones. Estas mutaciones suponen la reprogramación de la regulación celular en un proceso conocido como **transición epitelial-mesenquimal** (EMT). Así, las células adquieren la capacidad de resistir a la apoptosis, de invasión y de diseminación (390, 391).

Los **mecanismos patogénicos** que conducen a su desarrollo se pueden clasificar en tres vías (Figura 1.13): inestabilidad cromosómica (CIN; del inglés, *Chromosomal Instability*), inestabilidad de microsátelites (MSI; del inglés, *Microsatellite instability*) y fenotipo metilador de islas CpG (CIMP; del inglés, *CpG island Methylator Phenotype*) (392).

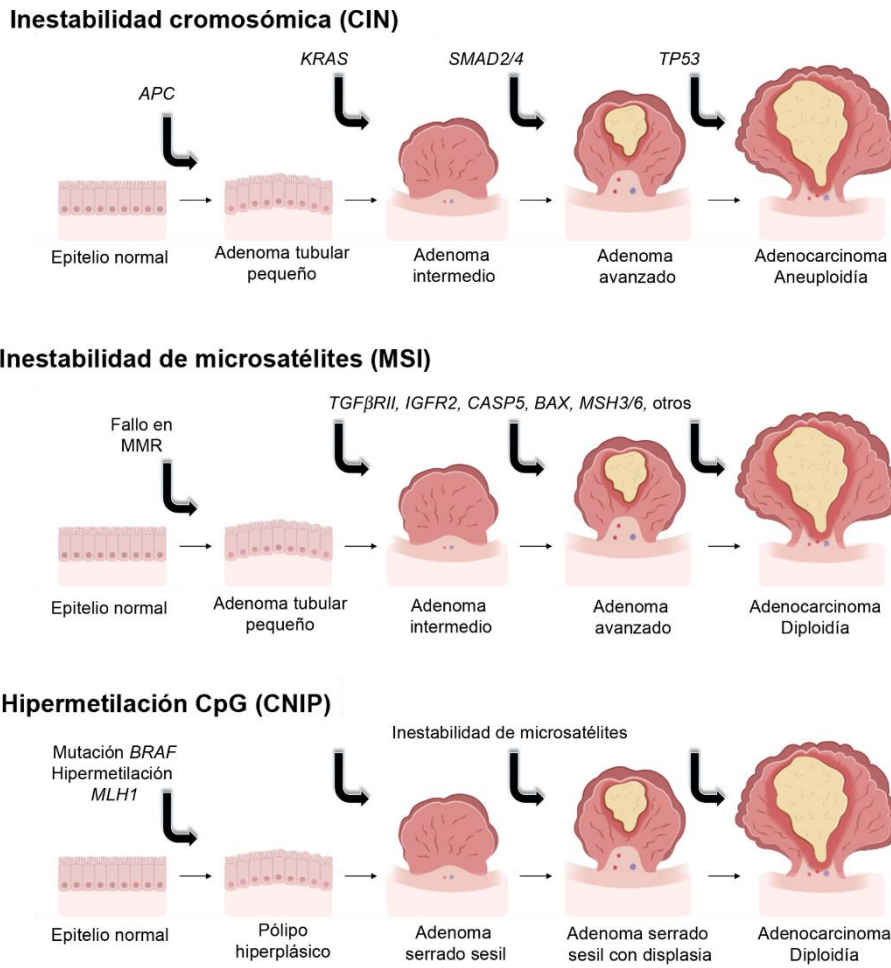


Figura 1.13 Mecanismos patogénicos del CCR que se explican en función de tres vías de desarrollo, desde el epitelio normal hasta el adenocarcinoma. Elaboración propia, basada en la figura de Ahnen et al.2011 (486)

- **Vía CIN**, o vía clásica, ya que corresponde con el 80-85% de los CCRs (392). Esta vía apoya la teoría de las mutaciones secuenciales en genes concretos como causa del tumor, y se corresponde con la clásica transición **adenoma-carcinoma**. Brevemente, se produce en primer lugar una mutación en el gen *APC* (del inglés, *Adenomatous Polyposis Coli*), que codifica un supresor tumoral. En su ausencia, la β -catenina se acumula y se trasloca al núcleo, tal y como ocurre con la activación canónica de la vía *Wnt* (393). En el núcleo interviene en la transcripción de genes relacionados con la invasión y la tumorigénesis, como *c-MYC* o *CCND1*, que codifica para la ciclina 1 (394). Posteriormente, las mutaciones *KRAS* y *PI3K* producen activación constante de la MAP quinasa y, por tanto, una señalización de proliferación celular intrínseca. Así, se produce la expansión de un clon celular. También aparecen mutaciones en genes supresores de tumores como *SMAD2* y *SMAD4*, que median la vía del TGF- β y así regulan el crecimiento celular, diferenciación y apoptosis (395). Finalmente, las mutaciones en el gen

supresor de tumores **TP53**, que es el principal punto de control del ciclo celular. Esta vía suele resultar en aneuploidías y pérdida de heterocigosidad (392).

- **Vía MSI**, que se corresponde con un 15% de los CCRs. Está relacionada con la pérdida de los mecanismos de reparación del DNA (MMR; del inglés, *Mismatch Repairs*). Esto se puede deber a un evento espontáneo, como la hipermetilación de un promotor, o a una mutación germinal, como en el síndrome de Lynch (396). En consecuencia, no se reparan las alteraciones del tipo repeticiones tándem, que son secuencias repetidas de nucleótidos. Así, se acumulan mutaciones en estas regiones que pueden afectar a genes implicados en el crecimiento celular (*TGFβRII* y *IGF2R*) (397) o la apoptosis (*CASP5*) (398). Igualmente, se pueden producir mutaciones en genes de la maquinaria de reparación del DNA (*MLH-3* y *MLH-6*) (398) que llevan a la generación del carcinoma. Esta vía suele resultar en tumores diploides y de mejor pronóstico que los CIN (392).

- **Vía CIMP** se caracteriza por la hipermetilación de citosina en islas CpG de los promotores. Cuando afecta a promotores de genes supresores de tumores, se produce su silenciamiento y la pérdida de la expresión de la proteína (399). Por ejemplo, es común la metilación del promotor *MLH-1*, tal y como se ha descrito en los tumores MSI (400). Estos tumores se han establecido como un fenotipo independiente en base a sus características particulares. Independientemente de presentar MSI alto o bajo, se asocian a localización proximal, baja diferenciación y mutación en *BRAF*; mientras que presentan una correlación inversa con mutaciones en *TP53*. (Tabla 1.5) (401). Además, su evolución no corresponde a la transición adenoma-carcinoma; sino que evoluciona desde un pólipo serrado que sufre hiperplasia, a un carcinoma (392).

Tabla 1.5 Rasgos de los tipos de CCR según el grado de metilación. Adaptado de Ogino et al. 2008(401)

Rasgo	Sin CIMP	CIMP bajo	CIMP alto
Localización	Distal>Proximal	-	Proximal>Distal
Género	Hombre=Mujer	Hombre>Mujer	Hombre<Mujer
BRAF	Wild type	Wild type	Mutado
KRAS	Wild type	Mutado	Wild type
Inestabilidad	CIN	Variable	Variable

1.4.2 Clasificación del CCR

Tradicionalmente, el CCR se ha clasificado como **esporádico** (70%), **hereditario** (5%) o **familiar** (25%) (385). Esta clasificación depende del origen de las mutaciones que lo desencadenen. Los **cánceres esporádicos** suelen estar asociados a factores ambientales y del estilo de vida (402). Aparecen mutaciones puntuales en distintos genes que dan lugar a una patogénesis heterogénea, aunque su evolución suele responder a la secuencia adenoma-carcinoma iniciada por el gen *APC* (403). Los **cánceres hereditarios** se producen al heredarse un alelo mutado de un gen y aparecer una mutación puntual en el otro alelo. En este grupo son característicos los defectos en la MMR (404, 405). Los **cánceres familiares** se deben a polimorfismos concretos heredados, lo que se traduce en una mayor susceptibilidad por antecedentes familiares (406, 407).

Posteriormente, algunos estudios establecieron una nueva clasificación basada en los distintos estados de inestabilidad y metilación (Tabla 1.5) (401, 408). Aunque fue más adelante, con el proyecto *The Cancer Genome Atlas*, cuando se revelaron los distintos patrones moleculares asociados al CCR (tasa de mutaciones, perfil de metilación y de expresión y variación en el número de copias). Se estableció entonces una nueva clasificación basada en el **subtipo molecular** (CMS; del inglés, *Consensus Molecular Subtypes*). **CMS1** o MSI inmune, **CMS2** o canónico, **CMS3** o metabólico, **CMS4** o mesenquimal y los no clasificados, o **indeterminados**.

Tabla 1.6 Características de los subtipos moleculares del CCR. Adaptado de Guinney et al. 2015 (409)

CMS1	CMS2	CMS3	CMS4
Inmune	Canónico	Metabólico	Mesenquimal
14%	37%	13%	23%
MSI, CIMP ^{High} Hipermutación	SCNA ^{High}	MSI mixto, CIMP ^{Low} , SCNA ^{Low}	SCNA ^{High}
Infiltración y activación inmune	Sello epitelial Activación de las vías WNT y MYC	Sello epitelial Desregulación metabólica	Infiltración estromal, angiogénesis, EMT, hiperactivación de TGF-β
Mujeres	Hombres	Sin diferencias de género	Sin diferencias de género
Proximal	Distal	Colon proximal	Distal
Peor supervivencia tras la recaída	-	-	Peor supervivencia global y libre de progresión

SCNA: alteraciones en el número de copias somáticas

En la (Tabla 1.6) se recogen las características de cada subtipo en cuanto a frecuencia, marcadores genómicos y epigenómicos, rasgos distintivos, prevalencia por género y localización, y supervivencia (409).

1.4.2.1 Principales alteraciones moleculares

A pesar de la heterogeneidad del CCR, existen **mutaciones y alteraciones comunes** (Tabla 1.7) en algunas vías (Wnt, MAPK/PI3K, TGF- β , TP53; Figura 1.14) y genes (*KRAS*, *BRAF*, *PI3CA*, *PTEN*, *SMAD2*, *SMAD4*, entre otros). Estas alteraciones tienen implicación en el pronóstico y el tratamiento de los pacientes (385).

Tabla 1.7 Mutaciones características de los subtipos moleculares de CCR. Basado en Guinney et al. 2015 (409)

	CMS1 Inmune	CMS2 Canónico	CMS3 Metabólico	CMS4 Mesenquimal
Vía WNT	-	<i>APC</i> mutado	<i>APC</i> Mixto	<i>APC</i> Mixto
Vía EGR	<i>BRAF</i> mutado	-	<i>KRAS</i> mutado	-
Vía TGF-β	<i>SMAD4</i> mutado			<i>SMAD1</i> mutado
	<i>TGFBR1</i> mixto	-	-	<i>ACVRL1</i> mutado
TP53	-	<i>TP53</i> mutado	-	<i>TP53</i> mixto

La **vía Wnt** puede estar alterada a través de *APC* (apartado 1.4.1). Están asociadas a pérdida de adhesión celular y metástasis. De hecho, la sobreexpresión de c-MYC activada por esta vía es un marcador de metástasis y un factor pronóstico de supervivencia (410).

En la **vía de MPAK/PI3K**, las alteraciones más frecuentes afectan a *KFRAS*, *BRAF* Y *PI3K* (385); que provocan una señalización constitutiva de la vía. Las mutaciones en estos genes están asociados a mal pronóstico y resistencia a tratamientos (411-413). Además, la pérdida de *PTEN*, que regula a *PI3K* se asocia con mayor riesgo de muerte (414).

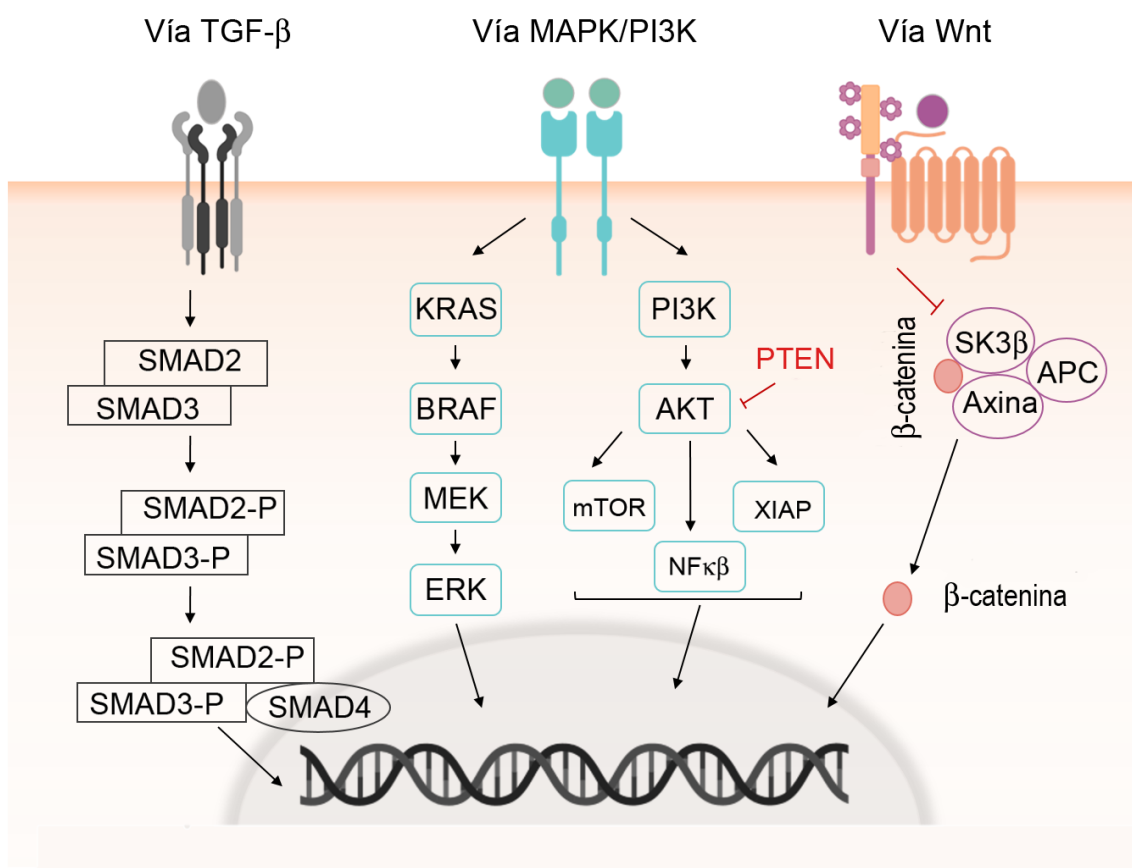


Figura 1.14 Principales vías de señalización alteradas en el CCR. Elaboración propia

Las alteraciones en la **vía del TGF-β** están más asociadas a cambios cromosómicos que a mutaciones puntuales, por ejemplo, la pérdida de 18q. Este codifica para los supresores de tumores SMAD2 y SMAD4 (403). Sin embargo, todavía no se ha podido establecer la pérdida de 18q como un marcador potente asociado a mal pronóstico (415).

Finalmente, la **vía del supresor de tumores TP53** debido a una pérdida de la región 17q, o alteraciones de su regulador ATM, es esencial en la evolución de los tumores CIN (apartado 1.4.1) (385). Aunque existe una asociación entre la pérdida de TP53 y peor pronóstico, no se considera un buen marcador pronóstico (416).

1.4.3 Interacción tumor-microentorno

La heterogeneidad del CCR empieza desde el propio tumor, distinguiéndose distintas poblaciones de células tumorales. Algunas células tienen las características de una célula diferenciada transformada, pero existen otras con características de CSC que se relacionan con la resistencia a tratamientos y recaídas (417). Estas células, con capacidad de renovación tumoral, poseen distintas características en función de la vía que guíe el desarrollo del CCR. Posteriormente, la selección clonal y la interacción con el microentorno da lugar a los distintos subtipos de CCR. Es por ello que cada uno de los subtipos presenta distinto perfil inmune y distintos mecanismos de escape (Figura 1.15) (418).

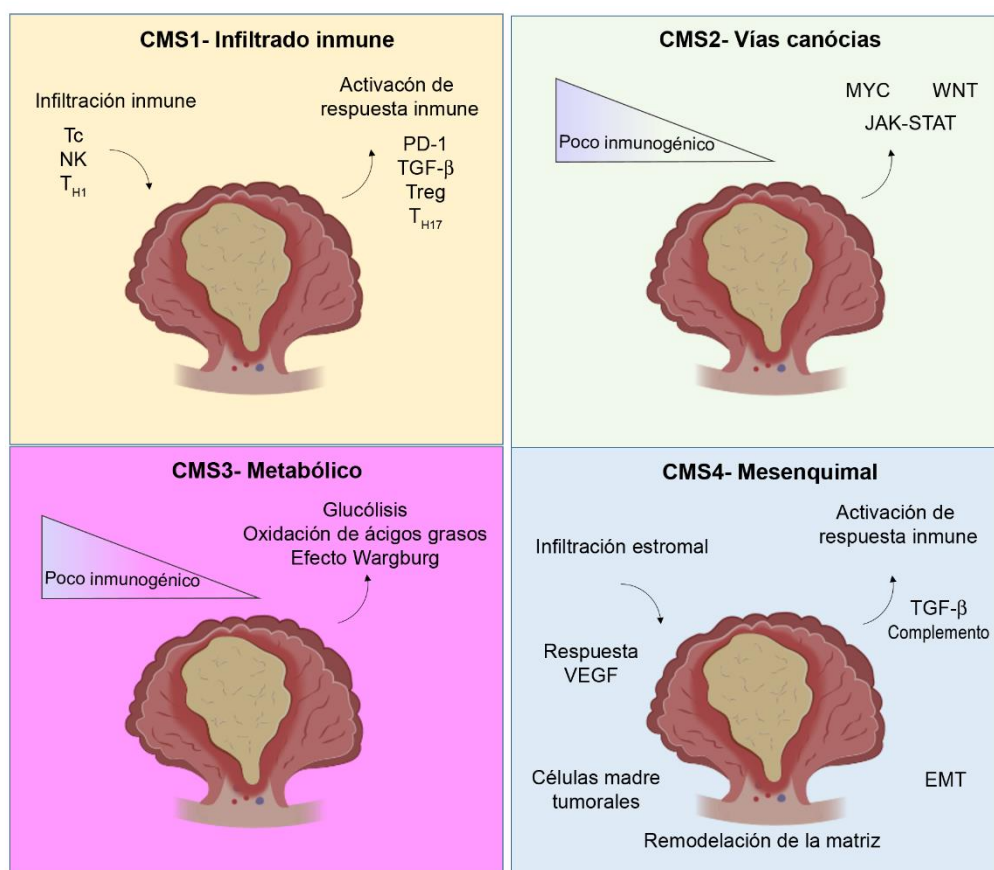


Figura 1.15 Perfil inmune de los distintos tipos de CCR. Elaboración propia, basada en Roelands et al. 2017 (419).

Los tumores CMS1 se caracterizan por una alta tasa de mutaciones debido a su estado MSI, lo que permite que se generen nuevos antígenos tumorales (420). Presentan infiltración inmune de tipo T_{H1}, linfocitos Tc, células NK y expresión de las quimiocinas CXCR3 y CCR5. Igualmente, los tumores CMS4 presentan una alta infiltración linfocitaria, aunque también CAFs

y la expresión de las quimiocinas CCL2 y CXCL12. Esto implica que, mientras que los tumores CMS1 tienen un infiltrado inmune que promueve una orientación favorable a la eliminación tumoral, la cual estaría bloqueada por la expresión de *checkpoints* como PD-1; los tumores CMS4 tienen un fenotipo desfavorable por la activación de TGF- β y las vías de angiogénesis. Por otro lado, los tumores CMS2 y CMS3 son poco inmunogénicos, con exclusión de infiltrado linfoide (419, 421).

La infiltración linfocitaria es un marcador de buen pronóstico en el CCR (422-424), de modo que se utiliza para el estadiaje de los tumores según el criterio *Immunoscore*. Los estudios que caracterizan las poblaciones celulares asociadas a los tumores infiltrados (MSI) han revelado una presencia predominante de linfocitos Tc y linfocitos T de memoria (425, 426). Para su aplicación, el *Immunoscore* valora la densidad de estas poblaciones (CD3/CD45RO, CD3/CD8 o CD8/CD45RO) en el centro y el margen del tumor. No obstante, se ha observado que los tumores MSI tienden a disminuir la expresión de HLA-I como mecanismo de evasión, mientras que este fenómeno no es tan común en los tumores MSS (427, 428). El valor pronóstico de la expresión de HLA-I no está claro. Algunos estudios asocian valores altos de HLA-I y la presencia de infiltración de linfocitos como marcadores independientes de buen pronóstico (429). Sin embargo, otros muestran una mejor evolución en pacientes con disminución de HLA-I (430, 431). Estas discrepancias pueden estar debidas a la falta de datos en la caracterización de los tumores, como el estado MSI (431).

La pérdida de expresión de HLA-I se ha planteado como una posible vía para el ataque de las células NK. De hecho, la infiltración de estas células en el CCR se ha correlacionado con un buen pronóstico (432, 433). Sin embargo, los estudios patológicos han mostrado una baja presencia de células NK en el tejido tumoral frente a la periferia del tumor (434). Además, se ha observado que los tumores de CCR también desarrollan mecanismos de evasión frente a su ataque. Por ejemplo, se ha visto aumentada la expresión de HLA-G (435-437) y HLA-E (436, 438-440), lo cual también se correlaciona con un peor pronóstico. Por otro lado, no está claro el papel que cumple la modulación de los ligandos para los receptores de las células NK. Algunos estudios muestran que la expresión de MICA se relaciona con una buena evolución (441), mientras que otros detectan formas solubles de MICA/B en plasma, que podrían inhibir su función (442).

En cuanto a la presencia de otras poblaciones inmunes, el CCR frecuentemente cuenta con un infiltrado de TAMs (443). Únicamente los TAMs que expresan CD16⁺ se han asociado a una mejor evolución (444), mientras que la acumulación de células supresoras de la línea mieloide predisponen a un peor pronóstico (445). Además, frente a lo que se podría esperar, la presencia de linfocitos Treg resulta ser favorable para los pacientes (446, 447). Por otro lado, el establecimiento de un microentorno inmunosupresor se ha asociado con la acumulación de TGF- β a nivel extracelular. Esta acumulación está relacionada con la alteración de las vías de señalización, y favorece el fenotipo de célula madre tumoral, la EMT y metástasis. Por ello se está considerando como una nueva diana para el tratamiento del CCR (448-450)

1.4.4 Tratamientos del cáncer colorrectal

El tratamiento del CCR depende del tipo de tumor, la localización y el **estadio** (451). Con un estadiaje basado en el TNM (Tamaño, Nódulos linfáticos, Metástasis) del *American Joint Committee on Cancer* (452), los tumores localizados TI y TII se tratan mediante **cirugía**. El estadio TIII, que implica diseminación a ganglios linfáticos regionales, ya requiere además el empleo **adyuvante** de quimio o radioterapia. Mientras que un 20-30% de los nuevos diagnósticos se encuentran en estadio IV metastásico. Estos casos avanzados se abordan mediante un tratamiento sistémico con quimioterapia y, si es posible, posterior resección de las metástasis (409, 453).

Los tratamientos de **quimioterapia** se basan en combinaciones de **fluoropirimidinas** (5-fluorouracilo o 5-FU y capecitabina), que bloquean la conversión de dUMP a dUTP (454); **folatos** (leucovorin), que mejora el efecto de los anteriores (455); **oxaliplatino**, que forma aductos con la cadena del DNA (456); o **irinotecan**, que inhibe la topoisomerasa I (457). Los esquemas más utilizados actualmente son FOLFOX (5-FU, leucovorin y oxaliplatino), FOLFIRI (5-FU, leucovorin e irinotecan) y XELOX (capecitabina y oxaliplatino) (453). Sin embargo, es común que aparezcan resistencias a los tratamientos que conduzcan a la progresión tumoral. Estas resistencias pueden ser intrínsecas o adquiridas, debido a mecanismos de compensación del tumor (458). La inestabilidad cromosómica (MSI) (459), y las mutaciones en BRAF V600E (460) o en p53 (461), están asociadas a una peor respuesta al tratamiento, mientras que el efecto de la hipermetilación (CIMP) todavía no está claro (462-464).

Posteriormente se incluyeron estrategias de **tratamiento dirigido** basadas en mAbs e inhibidores de kinasas. Los tratamientos frente a la **vía del VEGF** (Bevacizumab, Regorafenib, Zivaflibercept o Ramucirumab) previenen la angiogénesis, el crecimiento celular, la migración y la metástasis. A excepción del inhibidor de kinasas, Regorafenib, se emplean en combinación con los esquemas anteriores de quimioterapia. Actualmente se está estudiando si las mutaciones en la vía MAPK/PI3K pueden tener un impacto en la efectividad de la terapia (465). Los **mAbs frente al EGFR** (Cetuximab y Panitumuab) están aprobados para el tratamiento del CCR metastásico (465). Sin embargo, la respuesta a estas terapias está limitada por diversos factores: las mutaciones en la vía de señalización del receptor (KRAS, BRAF, PI3K, PTEN, etc), el cambio metabólico de los tumores CMS3 o el fenotipo mesenquimal de los tumores CMS4 (466). Por eso, se está estudiando su combinación con inhibidores de kinasas que bloqueen la señalización a nivel intracelular. (465). Por ejemplo, inhibidores de MEK (Selumetinib (467); inhibidores de BRAF (Vemurafenib (468) o Encorafenib (469)) o inhibidores de PI3K (Alpelisib (469)). Los resultados apoyan las estrategias de combinación para potenciar la actividad antitumoral.

Más recientemente se ha abierto el campo de los tratamientos de inmunoterapia. Los más utilizados en clínica son los **mAbs inhibidores de checkpoints**. La efectividad de estos tratamientos requiere de un entorno inmunogénico, con la presencia de células efectoras anti-tumorales. Sin embargo, este contexto sólo se encuentra en los tumores CMS1 (466). De hecho, en los ensayos clínicos con inhibidores del eje PD-1/PDL-1 sólo se han obtenido resultados favorables en los pacientes con MSI (470). En consecuencia, se están desarrollando otros estudios que combinan los inhibidores de *checkpoints* con otros tratamientos dirigidos a aumentar la inmunogenicidad de los tumores. Por ejemplo:

- Inductores de muerte inmunogénica, ya que favorecen la liberación de antígenos (471). Modelos preclínicos han confirmado el sinergismo de la combinación de oxaliplatino con bloqueantes de CTLA-4 y PD-1 (472). Los ensayos clínicos en humanos frente a CCR tipo MSS todavía no han obtenido resultados concluyentes (471).

- Inhibidores de kinasas, que producen la muerte tumoral y además inducen la sobreexpresión de MHC-I. Dos ensayos clínicos están evaluando la combinación del mAb anti-PD-1 Atezolizumab y el inhibidor de MEK Cobimetinib, en pacientes con CCR tipo MSS (473, 474).

- Bloqueantes de VEGFR. Aunque la combinación del mAb anti-VEGFR Bevacizumab y el mAb anti-CTLA-4 Ipilimumab se ha estudiado en melanoma (475), algunos trabajos apoyan su uso en CCR al mostrar que los pacientes tratados con bevacizumab desarrollan células dendríticas con mayor capacidad presentadora de antígenos (476).

- Bloqueantes de EGFR, que han mostrado favorecer la citotoxicidad de las células efectoras y disminuir la población de células inmunosupresoras. Existen distintos ensayos clínicos que combinan mAbs frente al EGFR e inhibidores de CTLA-4 y del eje PD-1/PD-1 (471).

- Inmunomoduladores. Los inhibidores deIDO disminuyen la población inmunosupresora. Dos ensayos clínicos en CCR están valorando al mAb anti-PD1 Pembrolizumab con un inhibidor deIDO solo o en combinación con el antineoplásico azacitidina (471). Por otro lado, los bloqueantes de TGF- β han mostrado mejorar la terapia con inhibidores del eje PD-1/PD-L1 en modelos preclínicos (449).

- Otros inhibidores de checkpoints. Estudios preclínicos han mostrado sinergia en la combinación de anticuerpos anti-PD1/PDL-1 y anti-TIM-3 o anti-PD1/PDL-1 y anti-LAG-3. Dos ensayos clínicos están valorando esta última combinación en pacientes con CCR (470).

- Anticuerpos agonistas de *checkpoints* activadores. Distintos ensayos clínicos están valorando el efecto de la combinación de agonistas de OX40, GITR, 4-1BB o CD40 con mAbs frente a *checkpoints* inhibidores en tumores sólidos, entre ellos CCR (470).

- Otras estrategias de inmunoterapia. Existen combinaciones con vacunas de células tumorales autólogas en pacientes con CCR tipo MSS; o con anticuerpos bi-específicos frente a CEA (471).

Más allá de los mAbs frente a *checkpoints* inhibidores, las estrategias de inmunoterapia frente al CCR se encuentran en ensayo. Entre ellas, las **vacunas** con células autólogas de tumor administradas con adyuvantes (477, 478); las vacunas peptídicas frente a CEA, EGFR o MUC1 (479); las vacunas de células dendríticas maduradas *ex vivo* (480); las vacunas de DNA (480) o las vacunas de vectores virales que expresan antígenos tumorales como CEA o MUC1 (481, 482). En cuanto a la **ACT**, los estudios basados en **linfocitos T** se están enfocando en la ingeniería genética para mejorar su especificidad y efectividad (480). Se están desarrollando ensayos

clínicos con linfocitos T que expresan CARs frente a ligandos de NKG2D (483), MUC1, CEA, entre otros; o que se arman con mAbs como Cetuximab (484). Igualmente, un ensayo ya finalizado ha demostrado que las células CIK autólogas presentan un beneficio clínico como tratamiento adyuvante al esquema FOLFOX4 (485). En cuanto a los estudios basados en **células NK**, varios ensayos están probando la actividad anti-tumoral de estas células expandidas ex vivo (486). Además, a nivel preclínico se ha demostrado que las células NK son capaces de destruir preferentemente a las CSC frente a las células diferenciadas, lo que apoya su empleo como tratamiento adyuvante para prevenir recaídas y metástasis (487). Por último, y también en modelos preclínicos, se está valorando la expresión de CARs en las células NK, por ejemplo el basado en EpCAM-CAR-NK-92 (488).

Respecto a las vías de **tratamiento alternativo**, se ha revelado una nueva perspectiva centrada en los factores de riesgo y los condicionantes de a progresión tumoral. Entre ellas se encuentran los fármacos antiinflamatorios, como antiinflamatorios no esteroideos o inhibidores de la COX (409). O el empleo de probióticos para regular la microbiota intestinal, que pretende modular el sistema inmune y la respuesta a los tratamientos (489).

1.5. Modelos tridimensionales para el estudio de tumores sólidos

Los tumores sólidos son **organizaciones multicelulares** con una **arquitectura tridimensional** (3D). Dentro de estas organizaciones existe **heterogeneidad**, debido tanto a la propia naturaleza de las células (apartado 1.1.1) como a las diferentes condiciones que se generan en la superficie o el interior del tumor. En consecuencia, se pueden desarrollar distintos fenotipos de células quiescentes o en proliferación (490). Además, los tumores se encuentran dentro de un **TME** (apartado 1.1.2) que les aporta señales bioquímicas y mecánicas, influyendo en el desarrollo y progresión tumoral. Estas señales influyen en su biología (expresión génica, diferenciación, proliferación y resistencia a tratamientos), su forma y su movilidad (491, 492).

La consideración del tumor como un sistema complejo 3D, evidenció la necesidad de un **modelo de estudio** representativo del estado fisiológico. En este sentido, el modelo debe reflejar la arquitectura y funcionalidad del tumor en cuanto a la red de interacciones celulares, las señales mecánicas, flujo de sustancias etc. Así, hace alrededor de 40 años se comenzaron a desarrollar los **modelos 3D *in vitro***, que constituyen un paso intermedio entre los cultivos convencionales en placa (2 dimensiones) y los modelos *in vivo* (490, 491).

Estos modelos se utilizaron por primera vez en el estudio de la resistencia a radioterapia (493). A partir de entonces se han utilizado para estudiar la respuesta a quimioterapia (494), la tumorigénesis (495), las interacciones heterotípicas (496), la invasión y la migración, entre otros (497). Aunque la aplicación de estos cultivos va más allá del campo de la oncología. Por ejemplo, dentro de la ingeniería de tejidos se han generado modelos 3D de cardiomiocitos que reproducen el ritmo cardíaco (498), o de hepatocitos que adquieren la funcionalidad hepática(499).

1.5.1 Propiedades biológicas y físico-químicas de los cultivos 3D

En los **cultivos convencionales**, las células se encuentran adheridas a una superficie rígida en su superficie basal, mientras que la superficie apical se encuentra expuesta a un medio de cultivo. Esta disposición supone la reorganización del citoesqueleto, adquiriendo una **polaridad artificial** (492, 500), lo que puede dar lugar a cambios en la **expresión génica** y el **metabolismo celular** (501, 502).

Los **cultivos 3D** proporcionan una red de **contactos complejos** entre las células y la matriz. Además, son capaces de reproducir los **gradientes dinámicos** de factores de crecimiento, oxígeno, nutrientes, desechos celulares y factores paracrinos que se desencadenan en el tumor (490, 500). (Figura 1.16) Estos gradientes se deben a las barreras de difusión dentro del propio esferoide y a las tasas de consumo y producción de factores en cada capa celular (490). De hecho, se ha observado que estos gradientes están directamente relacionados con la forma y el grado de compactación de los cultivos 3D (503).

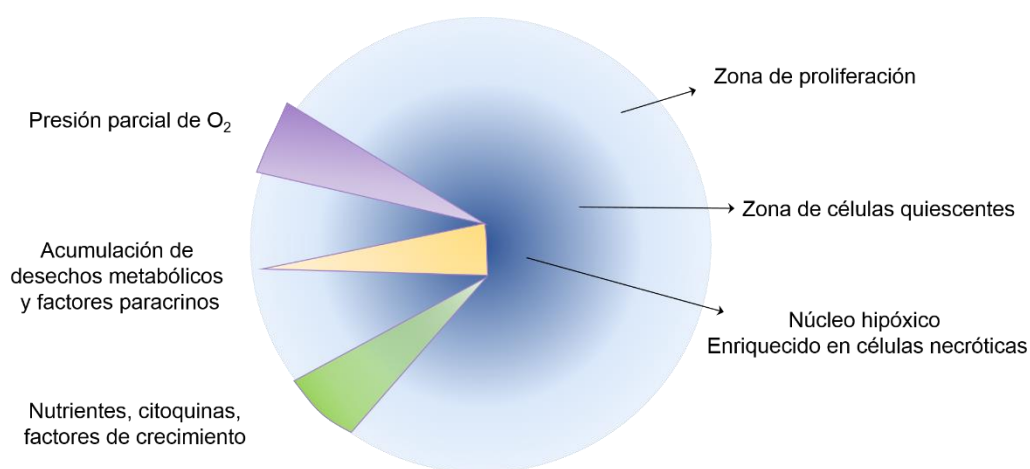


Figura 1.16. Representación de los gradientes de un cultivo 3D y de la heterogeneidad en la composición de sus capas. Cuando la estructura 3D alcanza un tamaño superior a 1-2 mm³, equivalente a un tumor pequeño no vascularizado o una micrometástasis, se produce una difusión insuficiente de oxígeno, generando una región hipóxica en el núcleo del tumor. La hipoxia conlleva un cambio metabólico en el que la glicolisis se convierte en la principal fuente de energía. Se produce una disminución del pH en la capa interna del tumor y se liberan ciertos factores como HIF para iniciar el proceso pro-angiogénico (492, 504). Elaboración propia, basada en Nath et al. 2017 (492)

La morfología resultante de la agregación celular depende tanto de las condiciones del cultivo como de las características de las células tumorales. Convencionalmente, se habla de estructuras redondeadas, en masa, en forma de racimo y estelares (Figura 1.17) (492).

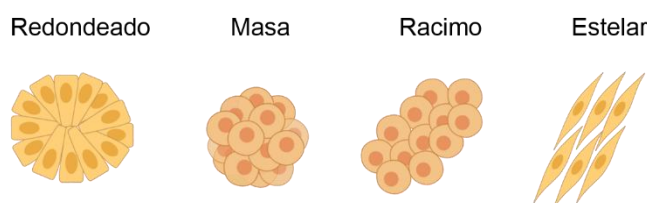


Figura 1.17 Morfologías adoptadas por los cultivos 3D. Elaboración propia, basada en Nath et al. 2017 (492).

1.5.2 Clasificación de los modelos 3D

En el estudio de los tumores se han utilizado modelos 3D basados en esferas que se han clasificado en función de los métodos de cultivo necesarios para su establecimiento (Tabla 1.8). Estas diferencias se traducen en unas características biológicas propias de cada modelo (491):

- **Esferoides multicelulares de tumor (MCTS; del inglés, *Multicellular Tumor Spheroid*):** es un modelo derivado de líneas celulares que reproduce el crecimiento de un tumor *in vivo*. Los agregados que generan se denominan comúnmente esferoides.
- **Tumorosferas:** es un modelo enriquecido en CSC que busca estudiar las propiedades de esta población. Se basa en la capacidad clonogénica de estas células, que son capaces de formar esferas en condiciones de baja adherencia.
- **Esferoides multicelulares organotípicos (OMS; del inglés, *Organotypic Multicellular Spheroid*):** es el modelo más parecido al tumor *in vivo*, ya que no sufre ningún proceso de disociación. De hecho conserva la morfología y heterogeneidad del tumor y también se suelen denominar esferoides primarios.
- **Esferas derivadas de tejido tumoral (TDTS; del inglés, *Tissue-Derived Tumor Spheres*):** están compuestas por células tumorales y del estroma, que se han reorganizado tras sufrir un proceso de disociación.

Tabla 1.8 Métodos utilizados para generar los modelos 3D. Adaptado de Achilli et al. 2012 (491)

Modelo	Material de partida	Condiciones de cultivo	Tiempo requerido
MCTS			
Esferoides	Suspensión celular a partir de líneas establecidas	<ul style="list-style-type: none"> ○ Medio con suero ○ Condiciones no adherentes 	1-7 días
Esferas de CSC			
Tumorosferas	Suspensión celular a partir de sangre, tejido o líneas celulares	<ul style="list-style-type: none"> ○ Medio sin suero ○ Factores EGF y FGF-2 ○ Plástico de baja adherencia 	De 1 a 8 semanas
Derivados de tejido tumoral			
OMS	Corte del tejido de la biopsia (0,3-0,8 mm de diámetro)	<ul style="list-style-type: none"> ○ Medio con suero ○ Aminoácidos no esenciales ○ Condiciones no adherentes 	De 2-5 a 12-18 días
TMTS	Corte y disociación parcial del tejido de la biopsia	<ul style="list-style-type: none"> ○ Medio con/sin suero ○ Plástico tratado y posteriores condiciones no adherentes 	1-3 días

EGF: Epidermal Growth Factor; FGF-2: Fibroblast Growth Factor 2.

1.5.3 Métodos de generación de esferoides

La formación de esferoides se basa en favorecer las **interacciones célula-célula** y célula-ECM, frente a las interacciones célula-plástico de los cultivos convencionales. En este proceso de ensamblaje intervienen tanto **moléculas de adhesión** como componentes del **citoesqueleto** (491). La participación de estas moléculas se ha explicado en **modelos** que varían ligeramente en función de las condiciones de generación del esferoide, como la presencia o no de ECM (500, 505). De modo genérico el proceso comprende (Figura 1.18):

- Etapa de **agregación**: las células en suspensión se aproximan y las moléculas de adhesión (actina y E-cadherina), junto con los microtúbulos, ayudan a formar unos agregados “suelos”.
- Etapa de **compactación**: las células se reorganizan y forman agregados sólidos compactos. Esta etapa involucra también elementos de adhesión y el citoesqueleto.
- Etapa de **proliferación**: el esferoide aumenta en tamaño gracias a la proliferación celular. En esta etapa se ven involucrados los microtúbulos y la kinasa de adhesión focal (FAK).

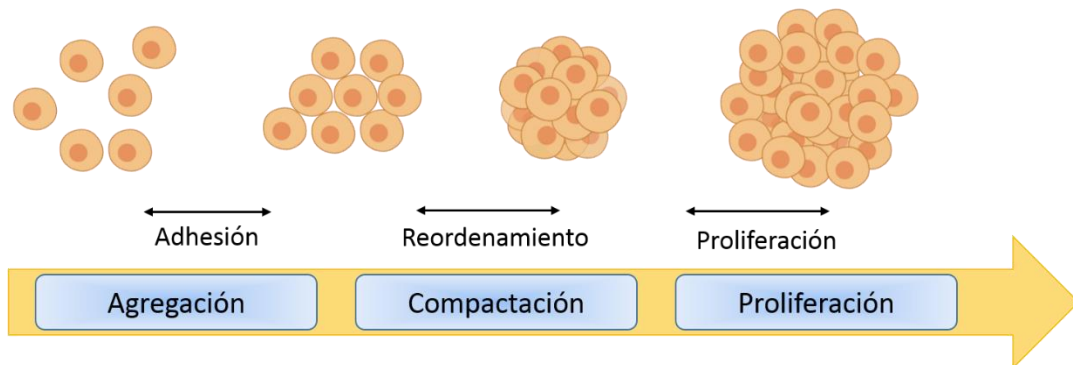


Figura 1.18. Proceso general de formación de esferoides. Elaboración propia, basado en la figura de Smyrek et al. 2019 (598).

Las técnicas que permiten la formación de esferoides se pueden clasificar en dos grandes grupos, en función del empleo de andamiajes o *scaffolds*.

1.5.3.1 Métodos sin scaffolds

En ausencia de *scaffold*, las células que conforman una suspensión monocelular agregan en un proceso de auto-ensamblaje (491). Este proceso se asemeja a los procesos de embriogénesis, morfogénesis y organogénesis que ocurren de manera fisiológica (491). Se distinguen diversas técnicas:

- **Cultivo en pellet:** parte de un primer paso de incubación en agitación. Posteriormente, utiliza la fuerza centrífuga para concentrar las células en la parte inferior de un tubo y favorecer las interacciones intercelulares. Es un modo sencillo de obtener esferoides, pero genera estrés y daño celular. Suele utilizarse para crear esferoides de gran tamaño, que tienen bajo aporte de oxígeno en el centro (491, 506, 507).

- **Cultivo en agitación (*spinner*):** impide el asentamiento celular mientras que favorece las colisiones entre células a través de agitación. La transferencia de masa del fluido del entorno se consigue gracias a las fuerzas de convección generadas por una barra magnética. No es un método apto para células con baja cohesión o para células adherentes que entren en apoptosis al estar en suspensión (508).

- **Gota colgante:** utiliza la fuerza de la gravedad para generar los esferoides. Se disponen gotas que contienen una suspensión celular en la superficie de la tapa de una placa de cultivo. La tapa se invierte y se coloca encima de la placa, dejando que las células se concentren en el fondo de la gota (apartado 3.1.1.2) (491, 508). Además, este método puede usarse en combinación con *scaffolds* como la metilcelulosa o el colágeno, que favorecen la compactación y circularidad del esferoide (503).

- **Capa líquida:** se basa en impedir la adhesión a la placa de cultivo y promover la agregación celular. Para ello se utilizan superficies de baja adherencia, como la agarosa. La aplicación de una agitación leve favorece la agregación celular. Es un método sencillo aplicable a cultivos primarios y líneas celulares, pero con el inconveniente de generar esferoides heterogéneos (491, 509).

- **Vaso de pared giratoria:** mantiene a las células en suspensión generando un entorno de microgravedad. Se consigue gracias a un vaso con una pared giratoria. Esta comienza una

rotación a una velocidad que aumenta gradualmente, para mejorar la agregación. Permite el cultivo a largo plazo y con condiciones controladas (491, 510).

- **Fuerza externa:** utiliza un agente externo (un campo eléctrico (511, 512), un campo magnético (513) o ultrasonidos (514)) para generar la agregación de la suspensión celular. Suele ser difícil controlar el tamaño del esferoide, y se desconocen los efectos que pueden tener las fuerzas externas en las células (491).

1.5.3.2 Métodos basados en scaffolds

Los *scaffolds* pueden ser **polímeros naturales** (hidrogeles como el colágeno, Matrigel o quitosano) o **polímeros sintéticos** (politetilenglicol, óxido de polietileno o ácido poli-(láctico-co-glicólico) (500). Estos *scaffolds* sirven como soporte para la organización 3D y también como señal externa que promueve los contactos intercelulares y con la ECM (492). Se distinguen diversas técnicas:

- **Capa de ECM:** las células se pueden sembrar encima de una capa de matriz, dando lugar a la agregación espontánea (492). También se pueden sembrar en el interior de la matriz, utilizando polímeros termosensibles. Estos cambian sus propiedades hidrofóbicas con la temperatura, como es el caso de la N-isopropilacrilamida. Cuando está en su condición hidrofílica, libera grupos de células que se pueden cultivar posteriormente en una superficie no adherente (491).

- **Microfluídica:** las células se colocan en un canal situado en una red de micro-cámaras. La formación del esferoide se puede conseguir por “encapsulación” de las gotas en la matriz (515). No obstante, esta técnica también se puede utilizar para generar esferoides sin *scaffolds*, bajo la perfusión de un flujo continuo (516). Los dispositivos de microfluídica se suelen utilizar para la producción de alto rendimiento de esferoides con un tamaño controlado (492). El empleo de dispositivos de microfluídica está cada vez más extendido gracias a las posibilidades que aporta en los ensayos (517). Se puede conseguir un control de los distintos compartimentos conectados por canales y establecer gradientes de fármacos, citoquinas, oxígeno, presión, etc. Igualmente, se puede estudiar la dinámica de procesos fisiológicos, como la extravasación de las células inmunes; o patológicos, como la migración de las células tumorales (518).



**ANTECEDENTES
Y OBJETIVOS**

2. Antecedentes y objetivos

El **CCR** es una enfermedad que constituye un grave problema de salud a nivel mundial, siendo el segundo tipo de cáncer más letal a nivel mundial (384). Se caracteriza por ser una **enfermedad heterogénea**, de modo que los perfiles de mutaciones que regulan su desarrollo también condicionan el pronóstico y la respuesta al tratamiento (409). La primera opción de **tratamiento** para los tumores localizados es la **cirugía**. Sin embargo, un 20-30% de los casos se diagnostican en estadio metastásico, y un 40-50% desarrolla recaídas tras la intervención (453). Entonces, el tratamiento de estos pacientes se centra en una **quimioterapia** sistémica. Pero debido a la existencia de tumores refractarios, y a la aparición de resistencias, la esperanza de vida a los 5 años es <50% (519). Posteriormente, se incluyeron nuevas estrategias basadas en **tratamientos dirigidos** frente a dianas relevantes en el desarrollo del CCR. Entre ellas, los mAbs e inhibidores de kinasas que ejercen su acción sobre la vía de EGFR/MAPK/PI3K. Sin embargo, un 80% de los tumores presentan mutaciones en esta vía de señalización (520). Así, la introducción de los nuevos protocolos de **inmunoterapia** se ha planteado como una alternativa de tratamiento. Dentro de ellos, los mAbs inhibidores de *checkpoints* como los anti-CTLA-4 y anti-PD-1/PD-L1, ya han sido aprobados para su uso en clínica. Pero su efectividad depende de la existencia de un TME inmunogénico, lo cual solo ocurre en el subtipo “MSI o inmune” del CCR (466).

A pesar de que el empleo de protocolos de inmunoterapia parece restringido a un porcentaje reducido de pacientes de CCR, los estudios observacionales han revelado que la infiltración linfocitaria es un marcador de buen pronóstico en el CCR (422). Por ello, se planteó una estrategia basada en la **ACT**. Además, dado que una de las características del CCR es la pérdida de la inmunogenicidad la inmunoterapia basada en **células NK** puede presentar ventajas frente a la terapia de linfocitos T.

El beneficio clínico de la capacidad anti-tumoral innata de las células NK fue descrito en origen en el contexto de **HSTC**, donde se observaron mejores respuestas en condiciones de alogenicidad (318). A partir de estos resultados, comenzaron a realizarse estudios para el tratamiento de tumores con una ACT de células NK fuera del contexto de HSCT. Del mismo modo que se había descrito, el empleo de células NK autólogas proporcionó peores resultados que las células NK alogénicas, debido a la complementariedad entre el HLA del paciente y los receptores inhibidores KIR de las células NK (330). Los primeros ensayos se centraron en el tratamiento de

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

neoplasias hematológicas, y con ellos comenzaron a desarrollarse diversos protocolos que indujeran la activación y proliferación de las células NK. De hecho, estudios previos en el grupo analizaron la activación de las células NK con estímulos basados en citoquinas (IL-2) y células estimuladoras (la línea celular K562 o líneas LCL-EBV⁺). En ellos se demostró que dicha activación dependía del estímulo utilizado, y que las células NK activadas con la línea R69 eran capaces de eliminar neoplasias hematológicas incluso con multirresistencia a drogas (195, 521, 522).

A la vista de los resultados obtenidos se planteó la aplicación de la inmunoterapia basada en células NK alogénicas activadas en el tratamiento de **tumores sólidos**. Frente a las neoplasias hematológicas, la efectividad de esta terapia va a contar con condicionantes adicionales. Para la eliminación tumoral, las células NK han de migrar por la red vasos sanguíneos, penetrar en un TME que favorece un estado de inmunosupresión y enfrentarse a la arquitectura 3D del tumor. De hecho, los estudios basados en muestras de pacientes y en modelos *in vivo* de CCR han mostrado una baja penetración de las células NK en el estroma tumoral (434), así como un fenotipo disfuncional (523). Pero, mientras que inmunoterapia centrada en la actividad linfocitos T ha sido capaces de revertir esta disfuncionalidad, a través de mAbs que bloqueen los *checkpoints* inmunológicos, la modulación de la respuesta de las células NK es más compleja. Mientras que su activación depende de un balance de señales, todavía no está claro qué receptores están implicados en su regulación en unas condiciones patológicas como las del cáncer. Por ello, en el desarrollo del protocolo de inmunoterapia se hace imprescindible valorar la capacidad de las células NK alogénicas activadas para interactuar con la masa tumoral y un microentorno inmunosupresor (524).

A partir de estos antecedentes se planteó la **hipótesis** de que una correcta activación de las células NK podría conferirles la capacidad de destruir tumores sólidos de CCR, con resistencia a tratamientos convencionales, y vencer los mecanismos de inmunosupresión del TME. De este modo, el **objetivo general** fue el desarrollo de un protocolo de inmunoterapia basado en células NK alogénicas para el tratamiento de tumores sólidos de CCR con mutaciones de resistencia a droga. Con este fin se plantearon los siguientes **objetivos intermedios**:

- 1- Establecer y caracterizar una colección de líneas celulares de CCR con distintos estados mutaciones en cultivos convencionales y 3D.
 - 1.1 Establecer los cultivos convencionales y generar los cultivos 3D de una colección de líneas celulares de CCR.

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

- 1.2 Analizar la expresión de moléculas de superficie con relevancia en la interacción con las células NK.
- 1.3 Analizar la sensibilidad o resistencia de las líneas celulares de CCR a los tratamientos de quimioterapia convencionales.
- 2- Evaluar la capacidad anti-tumoral de las células NK alogénicas activadas frente a las líneas de CCR.
 - 2.1 Analizar la citotoxicidad de las células NK activadas frente a cultivos convencionales y 3D de CCR.
 - 2.2 Determinar la relación entre la sensibilidad de las líneas de CCR y los parámetros de funcionalidad de las células NK.
 - 2.3 Establecer una correlación entre la sensibilidad a las células NK y la expresión de ligandos para los receptores de estas células.
 - 2.4 Analizar la capacidad de las células NK para infiltrar la masa tumoral.
- 3- Establecer el mejor protocolo de activación y expansión de las células NK.
 - 3.1 Evaluar las tasas de expansión de las células NK proporcionadas por distintos estímulos.
 - 3.2 Caracterizar el fenotipo de las células NK expandidas.
 - 3.3 Analizar la capacidad citotóxica de las células NK expandidas frente a las líneas celulares de CCR.
- 4- Valorar la combinación de las células NK alogénicas activadas con mAbs anti-*checkpoints*.
 - 4.1 Analizar el papel de los mAbs en la modulación de la respuesta citotóxica de las células NK alogénicas activadas.
 - 4.2 Analizar el papel de los mAbs en la modulación de la respuesta citotóxica de las células NK derivadas de pacientes de CCR.
- 5- Determinar la capacidad anti-tumoral de las células NK alogénicas activadas en un modelo *in vivo* de CCR.
 - 5.1 Establecer un modelo de xenotrasplante de CCR.
 - 5.2 Evaluar la capacidad de las células NK activadas de eliminar o retener el crecimiento de los tumores de CCR.



MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1 Cultivos celulares

Los cultivos celulares se mantuvieron en un incubador termostatzado con regulación electrónica de flujo de CO₂, a 37°C, en aire saturado de humedad y con un 5% de CO₂ (Sanyo, Panasonic). Las manipulaciones de estos cultivos se realizaron en campana de flujo laminar vertical (Telstar BioAll) y en condiciones estériles, utilizando material autoclavado (Autester) durante 20 min a 121°C.

A menos que se indique lo contrario, todas las centrifugaciones en lavados y cambios de medio se realizaron de manera rutinaria a 500 xg (Beckman Coulter Allegra® X-15®; o microcentrífuga Haraeus Pico 17 Thermo).

3.1.1 Líneas celulares

Todas las líneas celulares se mantuvieron criopreservadas en nitrógeno líquido utilizando su medio correspondiente (Tabla 3.1) suplementado con 10% DMSO (Dimetilsulfóxido; Anexo 1, Tabla 1) como agente crioprotector. En la recuperación de las líneas, este agente se eliminó por dilución en 9 volúmenes de medio completo atemperado, libre de DMSO, y la posterior renovación del mismo.

3.1.1.1 Detección y eliminación de micoplasmas

Al iniciar cada cultivo, y cada 6-8 semanas, se analizó la posible contaminación por *Mycoplasma*, en el Servicio Técnico de Cultivos Celulares del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), mediante el kit *MycoAlert Mycoplasma* (Anexo 1, Tabla 1). Este kit detecta la actividad de enzimas de *Mycoplasma* presentes en las 6 principales cepas que contaminan los cultivos celulares, y no se encuentran presentes en células eucariotas. Para ello, se recogió el sobrenadante de las células que hubieran estado en cultivo al menos 48 h y se realizó el ensayo según las instrucciones del fabricante.

En caso de contaminación, ésta se eliminó a través del kit *BM Cyclin* (Anexo 1, Tabla 1), según las instrucciones del fabricante.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1.2 Establecimiento y mantenimiento de cultivos convencionales

Se utilizaron líneas de origen humano (Tabla 3.1) que se cultivaron en medio RPMI 1640, DMEM o Leibovitz's L-15 suplementados con Glutamax™ (2mM; Tabla 3.2), antibióticos (penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL; Tabla 3.2) y 10% SFB (Suero Fetal Bovino; Tabla 3.2). El SFB utilizado para suplementar el medio RPMI fue previamente deconcentrado mediante un tratamiento de 30 min, a 56°C (Precistern Selecta), y una posterior centrifugación durante 10 min, a 3.000 xg, para desechar el precipitado. Todos los medios suplementados como se indica se denominarán “medios completos”.

Tabla 3.1. Líneas celulares eucariotas

Línea celular	Tipo celular/enfermedad	Propiedades de cultivo	Medio de cultivo	Origen
721.221-LCL	Línea linfoblastoide de células B – EBV ⁺	Suspensión	RPMI completo	Dr. Miguel López-Botet
CaCo-2	Epitelial/ Adenocarcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	Dra. Ana Isabel Alcalde†
Colo-201	Bipolar/ Metástasis de adenocarcinoma de colon	Mixto	RPMI completo	Dr. Gabriel Gil
Colo-205	Epitelial/ Metástasis de adenocarcinoma de colon	Mixto	RPMI completo	Dr. José Fernando Díaz
DLD-1	Epitelial/ Metástasis de adenocarcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	Dr. Gabriel Gil
HCT-116	Epitelial/ Carcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	ATCC
HCT-116 GFP	Epitelial/ Carcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	Dr. Ignacio Ochoa
HCT-116 bax/bak ^{-/-}	Epitelial/ Carcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	Dr. Javier Naval
HT-29	Epitelial/ Adenocarcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	ATCC
LoVo	Epitelial/ Adenocarcinoma de colon	Adherente	RPMI completo	Dr. José Fernando Díaz
R69-LCL	Línea linfoblastoide de células B – EBV ⁺	Suspensión	RPMI completo	Dr. José Antonio López
SKCO-15	Epitelial/ Metástasis de adenocarcinoma de colon	Adherente	DMEM completo	Dr. Gabriel Gil
SW620	Epitelial/ Metástasis de adenocarcinoma de colon	Adherente	Leibovitz's L-15 completo	Dr. Gabriel Gil

ATCC: American Type Culture Collection; **EBV⁺:** inmortalizadas con el virus Epstein-Barr; **LCL:** línea linfoblastoide; **DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium; **GFP:** Proteína Fluorescente Verde

Las líneas celulares se mantuvieron rutinariamente en frascos de 25 o 75 cm², con tapón de filtro, en un volumen máximo de 10-15 mL para los frascos de 25 cm² y un volumen máximo de 60 mL para los frascos de 75 cm².

Tabla 3.2. Medios de cultivo y suplementos

Producto	Casa comercial
RPMI-1640	Gibco
DMEM (4500 mg/L glucosa)	Sigma
Leibovitz's L-15	Gibco
SFB	Sigma
GlutaMAX™ 100x	Gibco
Penicilina-estreptomicina 100x (10.000 U- 10 mg/mL)	Sigma
Tripsina-EDTA 1x (0,05-0,02 %)	Sigma

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético **SFB:** Suero Fetal Bovino

Para los cultivos en suspensión, cada dos días se renovó el medio y se ajustó la densidad celular a 2×10^5 células/mL. Para los cultivos adherentes, se despegaron las células mediante tratamiento con Tripsina-EDTA (Tabla 3.2) y se diluyeron en medio fresco completo para dejar una confluencia del 20%. Cada 2 o 3 días, cuando el cultivo alcanzó el 80% de confluencia, se realizaron los pases subsiguientes. Para los cultivos mixtos, se recogieron tanto las células en suspensión como las células despegadas mediante Tripsina-EDTA y se diluyeron en medio fresco completo como se ha indicado anteriormente.

3.1.1.3 Establecimiento y mantenimiento de cultivos tridimensionales

El establecimiento de cultivos tridimensionales (3D) de tipo esferoide se realizó a través del “método de la gota colgante” (525). Este método utiliza un agente viscosante, como es la metilcelulosa, que se añade a una suspensión monocelular para poder generar gotas, que se disponen sobre la superficie de la cubierta de una placa de Petri. Al invertir la cubierta, las gotas quedan colgando de la superficie gracias a la disminución de la tensión superficial por parte de la metilcelulosa (Figura 3.1). Dentro de cada gota, las células se desplazan al fondo por acción de la gravedad, favoreciendo que se establezcan contactos entre ellas y formen un agregado multicelular denominado “esferoide” (526).

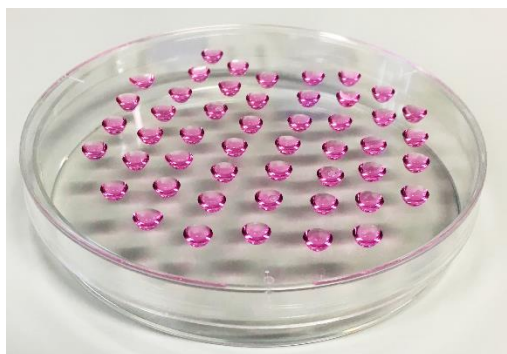


Figura 3.1 Método de la gota colgante. Imagen del método descrito (apartado 3.1.1.3) para la generación de cultivos celulares 3D de tipo esferoide.

Para establecer los cultivos en 3D se utilizó, como agente viscosante, un medio denominado *Methocell*, generado mediante la adición de metilcelulosa de alta viscosidad (Anexo 1, Tabla 1) a un medio basal (en nuestro caso DMEM), a una concentración de 12 g/L. Para su preparación, la mitad del volumen de DMEM se calentó a 50°C y se añadió sobre la metilcelulosa previamente autoclavada. Esta mezcla se mantuvo en agitación durante 20 min antes de añadir la segunda mitad del volumen de DMEM. Entonces, la mezcla se almacenó a 4°C durante 1,5-2 h. Tras ese tiempo, todo el volumen se centrifugó a 4000 xg durante 2 h. De este modo se diferenciaron: una fase superior más clara, que es la deseada y representa en torno al 90% del volumen total, y una fase inferior más opaca que contiene los desechos de la metilcelulosa.

La generación de esferoides requiere preparar una suspensión monocelular, en medio completo, a partir de los cultivos convencionales (apartado 3.1.1.1). La densidad celular de esta suspensión depende del número de células/esferoide que se desea. En nuestro caso fue de aproximadamente 1.000 células/esferoide, estando contenido cada esferoide en una gota de 30 μ L. Para proporcionar la viscosidad adecuada a la suspensión, ésta contuvo un 20-30% de *Methocell*, en función de la capacidad de agregación de la línea celular (Tabla 3.3), diluido en medio completo. Una vez preparada esta suspensión, las gotas se dispusieron sobre la cubierta de una placa de Petri de 100 cm² y se cubrió el fondo de la placa con agua mili-Q estéril para evitar la evaporación del medio. Tras invertir la cubierta y colocarla sobre la placa Petri, se incubó durante 48-72 h, a 37°C, para la formación de los agregados. La monitorización del proceso se realizó a través de microscopía convencional (Leica DMI1 u Olympus IX81).

Tabla 3.3. Condiciones de generación de los cultivos en 3D

Línea celular	Porcentaje de <i>Methocell</i>	Tiempo de incubación (h)
CaCo-2	20%	48
Colo-201	20%	48
Colo-205	20%	48
DLD-1	20%	48
HCT-116	20%	48
HCT-116 GFP	20%	48
HCT-116 <i>bax/bak</i> ^{-/-}	30%	72
HT-29	20%	48
LoVo	30%	72
SKCO-15	30%	72
SW620	30%	72

Los esferoides formados se recogieron de las gotas por aspiración con una micropipeta. Cuando fue necesaria la disgregación del esferoide, tras lavar los restos de *Methocell* con PBS (tampón fosfato salino, del inglés, *Phosphate Buffered Saline*), ésta se realizó en uno o dos pasos dependiendo de las propiedades de agregación de las líneas.

- Paso 1 (opcional): los esferoides se incubaron durante 20-30 min en 100 µL de medio completo suplementado con 2 mM EDTA (Anexo 1, Tabla 1).
- Paso 2: los esferoides se incubaron durante 5-10 min en 100 µL de Tripsina-EDTA suplementado con 40 µg/mL DNasa (Anexo 1, Tabla 1).

3.1.2 Células NK primarias

Las células NK primarias se obtuvieron a partir de los PBMCs de donantes sanos o de pacientes con cáncer colorectal y cáncer de pulmón. Las muestras de sangre de donantes sanos fueron proporcionadas como capa leuco-plaquetaria (del inglés, *buffy coat*) por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón con la aprobación del Comité de Ética en la Investigación Clínica de la Comunidad de Aragón (CEICA), número C.I.P.11/006. Las muestras de sangre de pacientes con cáncer fueron proporcionadas como sangre total anticoagulada por el Hospital Clínico Lozano Blesa de Zaragoza, con la aprobación del CEICA número C.P.C.I.14/124.

3.1.2.1 Aislamiento de PBMCs

Para obtener los PBMCs de las muestras de sangre se realizó una separación de células en gradiente de densidad, utilizando la solución de extracción Ficoll (Histopaque®-1077; Anexo 1, Tabla 2). En primer lugar, la sangre procedente de *buffy coats* se diluyó en 5 volúmenes de PBS estéril; mientras que la sangre total se diluyó a la mitad. Esta sangre diluida se añadió, con cuidado de no mezclar las fases, sobre un volumen de Ficoll en proporción 1:1. Se centrifugó a 500 xg durante 30 min, quitando el freno de la centrífuga, y posteriormente se recuperó el anillo de PBMCs localizado en la interfase. Tras centrifugar a 500 xg durante 5 min para retirar el plasma y Ficoll arrastrados, se lisaron los glóbulos rojos con 2 mL de tampón de lisis (Anexo 1, Tabla 2) mediante una incubación de 5 min a RT. Finalmente, los PBMCs purificados se lavaron 3 veces con PBS estéril y se utilizaron en estudios posteriores, recién aislados o tras ser activados (apartado 3.1.2.2).

3.1.2.2 Generación de células NK activadas a partir de PBMCs

3.1.2.2.a Activación a corto plazo de PBMCs de donantes sanos

Cuando el objetivo del procedimiento fue únicamente la activación de las células NK para incrementar su actividad citotóxica, sin llegar a obtener una expansión de las mismas, se siguió un protocolo de activación a corto plazo que había sido establecido previamente en el laboratorio (Sánchez-Martínez et al. 2015) (527).

Este protocolo, que consideramos *estándar*, se basa en el empleo de las células estimuladoras R69, que son una línea linfoblastoide (LCL, del inglés, *Lymphoblastoid Cell Line*) procedente de células B, inmortalizada con el Virus Epstein-Barr (EBV). La línea celular R69 se caracteriza por expresar tanto HLA-I, con todos los epítomos conocidos de los KIR, como HLA-II (527, 528). Previamente a ser utilizadas en co-cultivo con los PBMCs, las células estimuladoras se trataron con mitomicina-C (25 µg/mL; Anexo 1, Tabla 1) en RPMI sin SFB, durante 90 min, a 37°C, para arrestar el ciclo celular. Pasado este tiempo, se inactivó la mitomicina-C añadiendo RPMI completo y se realizó un lavado con el mismo medio. Seguidamente, las células estimuladoras se dejaron incubar en RPMI completo durante 30 min, a 37°C, para eliminar el exceso de droga.

MATERIALES Y MÉTODOS

La activación de las células NK se llevó a cabo mediante el co-cultivo de los PBMCs y las células estimuladoras (ratio 10:1; PBMCs:R69) durante 5-7 días. El cultivo se mantuvo en medio de células primarias (RPMI completo sin antibióticos) a una densidad 1×10^6 PBMCs/mL en un volumen de 50 mL en frascos de cultivo de 75 cm².

3.1.2.2.b Activación y expansión de PBMCs de donantes sanos

Cuando se quiso estudiar la expansión de las células NK, se consideraron varios protocolos basados en la literatura (Sánchez-Martínez et al. 2018) que utilizaban diferentes estímulos solos o en combinación (529).

- Citoquinas: IL-2 (100 UI/mL; Tabla 3.4) y/o IL-15 (5 ng/mL; Tabla 3.4)
- Células estimuladoras: R69 o 721.221 (ratio 10:1; PBMCs:LCL-EBV⁺). Las células 721.221 también son una línea linfoblastoide de células B inmortalizadas con EBV, deficientes en HLA-I pero que mantienen la expresión de HLA-II (530, 531).

Tabla 3.4 Interleuquinas (IL)

Intreleuquina	Casa comercial	Concentración del stock	Medio de dilución	Concentración de trabajo
IL-2	Miltenyi Biotec.	200 µg/mL $\approx 10^6$ U/mL	PBS + 0,1% BSA	100 U/mL
IL-15	Miltenyi Biotec.	250 µg/mL	PBS + 0,1% BSA	5 ng/mL

Por otro lado, también se valoró el empleo del conjunto de PBMCs al inicio de la expansión o, en su lugar, la fracción de PBMCs remanente tras haber eliminado las células CD3⁺ (apartado 3.1.2.3) que puedan afectar a la activación y expansión de las células NK.

En esta ocasión, la activación de las células NK se llevó a cabo mediante el cultivo de los PBMCs, o PBMCs-CD3⁻, con los diferentes estímulos durante 21 días, siguiendo el esquema (Figura 3.2):

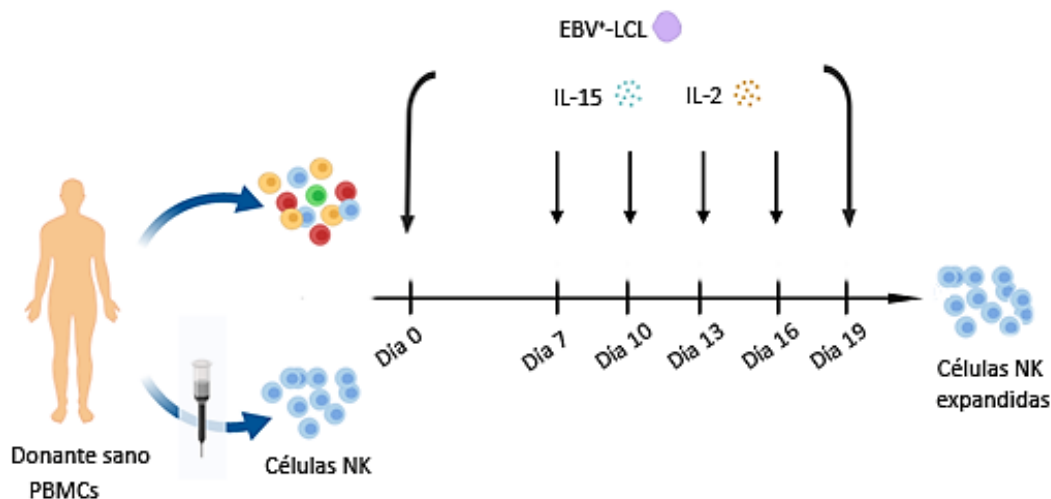


Figura 3.2 Protocolo de expansión de PBMCs provenientes de muestras de sangre de donantes sanos. Para la activación se partió del conjunto de PBMCs, o la fracción enriquecida en células NK, y se añadieron los distintos estímulos (células estimuladoras y/o interleuquinas) según se explica (apartado 3.1.2.2.b).

- El cultivo se inició a una densidad 1×10^6 PBMCs/mL, en un volumen de 3-10 mL, que se mantuvo durante los 7 primeros días.
- A día 7, se añadió al cultivo un volumen equivalente de medio de células primarias junto con los estímulos correspondientes. Esto supuso añadir una cantidad de IL doble de la inicial, pero el mismo número de células estimuladoras ya que, a este día, todavía no se ha iniciado la expansión de los PBMCs.
- A partir de día 7, se siguió con la reactivación de los PBMCs cada 2-3 días. En cada reactivación se reajustó la densidad celular a la inicial, para que el cultivo nunca superara los 2×10^6 PBMCs/mL, y se añadieron de nuevo los estímulos como se ha descrito anteriormente, manteniendo un volumen máximo de 10 mL.

En el caso particular de la expansión de células NK destinadas a los ensayos *in vivo* (apartado 3.5.2.2), se optó por iniciar el cultivo con PBMCs-CD3⁻ y utilizar como estímulo la línea celular R69 en combinación con IL-2 e IL-15. La producción acumulativa de células NK se mantuvo en volúmenes máximos de 20-30 mL para obtener un mayor número de células NK.

Finalmente, la tasa de expansión de las células NK se determinó mediante el recuento acumulado de los PBMCs en cultivo en cada día de reactivación (apartado 3.1.3) y la caracterización por citometría de flujo de las poblaciones de cada expansión a través de los marcadores CD3/CD56 (apartado 3.3.3.1). Además, tras seleccionar algunos de los protocolos

de expansión, también se realizó una caracterización más extensa de las subpoblaciones de células NK, por citometría de flujo (apartado 3.3.3), a través de un análisis multiparamétrico de sus proteínas de superficie (Anexo 2).

3.1.2.2 c Activación a corto plazo de PBMCs de donantes sanos con mAbs inmunomoduladores

De modo excepcional, en los ensayos en que se estudió el efecto del bloqueo del eje PD-1/PDL-1 en la activación y función de las células NK, se introdujo una modificación del protocolo “estándar” incorporando al cultivo Pembrolizumab (20 µg/mL; Tabla 3.5), un anticuerpo monoclonal frente a PD-1.

3.1.2.2 d Activación de PBMCs de pacientes con cáncer

Los PBMCs obtenidos de la sangre de pacientes con cáncer se destinaron a estudiar la implicación del eje PD-1/PDL-1 en la actividad citotóxica de las células NK. En este caso se activaron durante 48-72 horas sólo con la combinación con IL-2 (100 UI/mL) e IL-15 (5 ng/mL), en presencia o ausencia de Pembrolizumab (20 µg/mL) en el cultivo.

3.1.2.3 Obtención de células NK

Para estudiar la actividad antitumoral de las células NK, estas se enriquecieron a partir del conjunto de PBMCs. Se utilizó un protocolo de separación inmunomagnética con el sistema MACS™. Éste se basa en el empleo de un anticuerpo unido a microesferas metálicas dirigido frente a las células de interés (Tabla 3.5). Al hacer pasar una suspensión celular a través de una columna con matriz superparamagnética, colocada en el interior de un campo magnético, sólo las células marcadas con las microesferas quedan retenidas en la columna (Separador inmunomagnético MACS®; Miltenyi Biotec).

Se siguió el protocolo de marcaje del fabricante para los anticuerpos anti-CD56 (separación positiva) o anti-CD3 (separación negativa) unidos a microesferas. De este modo se resuspendieron los PBMCs, purificados de sangre periférica o activados *in vitro*, con una relación de 80 µL del tampón MACS/ 20 µL de anticuerpo por cada 10⁷ células. La suspensión celular se incubó 15 min a 4°C, se lavó con tampón MACS (Anexo 1, Tabla 2), y finalmente se hizo pasar por columnas LS según las instrucciones del fabricante. En el caso de la separación positiva, se

retiró la columna del campo magnético y se eluyeron las células NK con el mismo tampón; mientras que en el caso de la separación negativa se recogió la fracción de células que no había quedado retenida en la columna dentro del campo magnético.

3.1.3 Recuento y viabilidad celular

A partir de cultivos en suspensión monocelular (apartado 3.1.1), se determinó la densidad celular a través de un microscopio óptico (Nikon Eclipse E-100) utilizando una cámara de Neubauer. Se contaron las células de los 4 cuadrantes de la misma y se calculó la densidad (células/mL) dividiendo el recuento entre el número de cuadrantes contabilizados, y multiplicándolo por el factor de dilución de la suspensión y el factor corrector de volumen de la cámara (10^4).

La viabilidad del cultivo se determinó por ensayo de exclusión de Azul de tripano (Anexo 1, Tabla 1), un colorante que sólo puede penetrar en células que han perdido la integridad de la membrana plasmática. Se preparó una dilución 1:1 (suspensión celular:colorante) y se realizó un recuento del número de células viables y no viables, calculando el porcentaje de células viables sobre el total.

3.2 Análisis de viabilidad celular mediante PrestoBlue®

La sensibilidad de las líneas de CCR al agente citotóxico 5-FU (Anexo 1; Tabla 1) se estudió mediante el análisis de la viabilidad celular a través del reactivo PrestoBlue® (Anexo 1; Tabla 1). El reactivo consiste en una solución de resazurina que, al ser reducido en la mitocondria, se convierte en resofurina. Esta transformación permite determinar cuantitativamente la proliferación celular, ya que la resofurina es un compuesto capaz de emitir fluorescencia ($\lambda_{abs}= 535 \text{ nm}$; $\lambda_{em}= 615 \text{ nm}$) con una intensidad proporcional a la concentración del mismo.

Para la realización del ensayo se sembraron 5.000 células de las distintas líneas de CCR en una placa de 96 pocillos de fondo plano, con un volumen de 50 μL de DMEM completo por pocillo. Tras incubar 24 h, a 37°C, se añadieron otros 50 μL de DMEM completo con distintas

concentraciones de 5-FU (0,01-100 μM). En cada experimento, cada concentración se analizó por triplicado. Se dejó incubar 72 h a 37°C y se añadió Prestoblue® a cada pocillo (1/10). La placa se mantuvo durante 1-2 h, a 37°C, y se analizó la emisión de fluorescencia (BioTek Synergy HT).

3.3 Análisis por citometría de flujo

3.3.1 Citotoxicidad mediada por células NK

3.3.1.1 Marcaje de células NK con sonda fluorescente

Los experimentos de citotoxicidad se llevaron a cabo mediante el co-cultivo de las células diana con las células efectoras (NK). Para poder analizar los parámetros de muerte en las células tumorales, mediante citometría de flujo, fue necesario poder distinguir ambas poblaciones. Para ello, se marcaron las células NK con la sonda eFluor 670 (Anexo 1, Tabla 1), que se une covalentemente a las proteínas celulares con aminas primarias y presenta emisión fluorescente en rojo tras su excitación ($\lambda_{\text{abs}} = 633 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 670 \text{ nm}$).

El marcaje con eFluor 670 (3 μM) se realizó en tampón PBS suplementado con 5% SFB decomplementado y con una densidad celular de 1×10^6 células/mL. El procedimiento supuso la resuspensión de las células en la mitad del volumen de marcaje y la dilución de la sonda en la otra mitad de volumen. Tras añadir lentamente la sonda diluida sobre la suspensión celular, se incubó en oscuridad 10 min, a 37°C; y 5 min más, a 4°C. Pasado este tiempo, se lavaron las células con 5 volúmenes de RPMI completo y se dejaron en medio nuevo durante 40 min, a 37°C, antes de realizar un último lavado.

3.3.1.2 Co-cultivo de células NK y células diana

La muerte celular inducida por las células NK se valoró enfrentando las células NK purificadas y marcadas fluorescentemente (apartados 3.1.2.3 y 3.3.1.1, respectivamente) a cultivos de células diana en condiciones 2D y 3D.

Para los experimentos de citotoxicidad en condiciones 2D, se dispusieron las células adherentes en placas de 96 pocillos de fondo plano 24 h antes del experimento. Mientras que para el análisis de células con un crecimiento en suspensión, éstas se dispusieron el mismo día del ensayo en placas de 96 pocillos de fondo redondo. Posteriormente, se añadieron las células

NK a distintos ratios efector:diana y se mantuvo el co-cultivo durante 4 h, a 37°C, en un volumen final de 200 µL de medio completo (100 µL de medio de células NK y otros 100 µL de medio de células tumorales). Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo y se juntaron con las células adherentes, despegadas mediante tripsina-EDTA para tener una suspensión monocelular homogénea.

Para los experimentos de citotoxicidad en condiciones 3D se recogieron 10 esferoides formados (apartado 3.1.1.2) y se dispusieron en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Tras realizar un recuento del número de células/esferoide se añadieron las células NK a distintos ratios efector:diana y se mantuvo el co-cultivo durante 48 h, a 37°C, en un volumen final de 200 µL de medio completo como se ha explicado anteriormente. Pasado este tiempo, se recogieron los sobrenadantes de cada pocillo y se juntaron con las células de los esferoides, previamente disgregados mediante tripsina-EDTA para tener una suspensión monocelular homogénea.

3.3.1.3 Evaluación de las vías de muerte celular implicadas en la citotoxicidad mediada por células NK

Para estudiar qué mecanismos de muerte celular se activaban en las células tumorales, tras el ataque de las células NK, las células diana se pre-incubaron durante 1 h con el inhibidor general de caspasas Q-VD-OPh (30 µM; Anexo 1, Tabla 1). También se valoró si, en ausencia de la vía de las caspasas, la necroptosis adquiría un papel importante en la muerte de las células diana. En estos casos, se combinó el inhibidor de RIP kinasa 1, Nec-1 (30 µM, Anexo 1, Tabla 1), con el inhibidor Q-V-OPh a concentración equimolar. Pasado este tiempo, y sin realizar un lavado de las células en incubación, se añadieron las células NK activadas a ratio efector: diana 1:1 como se ha explicado anteriormente (apartado 3.3.1.2).

3.3.1.4 Citotoxicidad mediada por células NK en combinación con anticuerpos inhibidores de checkpoints

Para valorar la implicación de los *checkpoints* PD-1 y TIM-3 en la actividad de las células NK, éstas se preincubaron durante 30 min, a 4°C, con los respectivos anticuerpos bloqueantes α-PD-1, Pembrolizumab (20 µg/mL) y α-TIM-3 (20 µg/mL; Tabla 3.5). Pasado este tiempo, y sin realizar un lavado de las células en incubación, se enfrentaron a cultivos 2D de células tumorales a un ratio bajo efector:diana, en función de la línea celular.

3.3.1.5 Análisis de los parámetros de muerte celular

La muerte celular supone una alteración en la estructura de la membrana plasmática. Dentro de los eventos que suceden, uno de los primeros signos de apoptosis es la traslocación de fosfatidilserina (PS), desde su localización habitual en la cara citoplasmática hacia la cara externa de esta membrana (532). Así, en condiciones fisiológicas es una señal para que las células apoptóticas sean fagocitadas por los macrófagos. En condiciones *in vitro*, estas células no son eliminadas y evolucionan adquiriendo rasgos de necrosis. En esta situación se permeabiliza la membrana plasmática, permitiendo el paso de moléculas que no atravesarían la membrana de células sanas.

Estos eventos se pueden aprovechar para detectar la muerte celular en ensayos *in vitro*. Así, se analizó la traslocación de PS, utilizando una proteína de unión específica (Anexina-V); y la permeabilización de la membrana, utilizando el fluoróforo 7-AAD (7-Actinomycin D; $\lambda_{\text{abs}}=540 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=654 \text{ nm}$) que presenta afinidad por el DNA.

Para realizar este marcaje, la suspensión celular obtenida tras el ensayo de citotoxicidad con células NK, se centrifugó a 3.000 xg y se resuspendió en 100 μL de ABB 1x (del inglés, *Annexin Binding Buffer*; Anexo 1, Tabla 2) con Anexina-V-FITC (1,5/100; Anexo 1, Tabla 1) y 7-AAD (1/100; Anexo 1, Tabla 1). El marcaje se realizó durante 15 min, a RT y en oscuridad, hasta ser analizado por citometría de flujo (BD FACSCalibur o Beckman Coulter Gallios™).

3.3.2 Ensayo de degranulación de células NK: movilización de CD107a

La actividad de las células NK frente a las células diana tumorales también se determinó a través de experimentos de degranulación. Cuando las células efectoras degranulan expresan transitoriamente en la membrana plasmática la molécula Lamp-1 o CD107a. Para impedir el reciclaje de esta proteína durante el ensayo, y así poder detectarla por un marcaje extracelular, se utilizó un bloqueante del aparato de Golgi (monensina).

En esta ocasión, se realizó una modificación del modelo de co-incubación presentado previamente (apartado 3.3.1.2) debido a las características del ensayo. En primer lugar, al ser necesario favorecer el contacto de todas las células NK con las células diana, se usó un ratio bajo de esta relación celular. En segundo lugar, fue necesario un número suficiente de células NK

MATERIALES Y MÉTODOS

para poder analizar la expresión de CD107a de modo fiable. Finalmente, se consideró el volumen, densidad celular y superficie del área de cultivo. Es por ello que, después de comprobar que la sensibilidad de las líneas seleccionadas de CCR no variaba cuando se presentaban en suspensión a las células NK (Figura 3.3), este tipo de experimento se realizó con las células en suspensión.

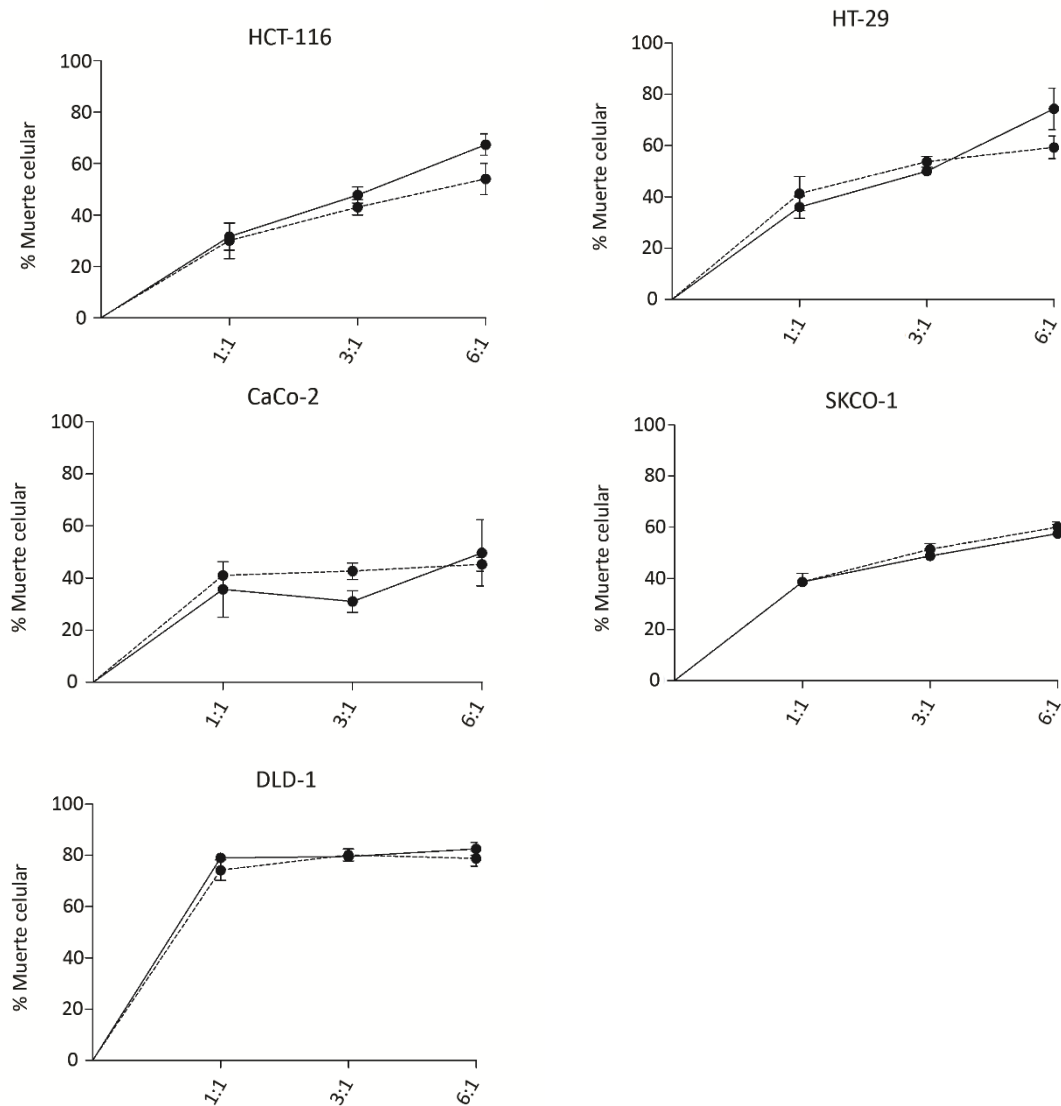


Figura 3.3. Citotoxicidad de células NK activadas frente a líneas de CCR en cultivo en suspensión (línea punteada) o adherente (línea continua). Los PBMCs se activaron en presencia de células R69 durante 5 días. Posteriormente se purificaron las células NK y se enfrentaron a diferentes relaciones efector:diana (1:1; 3:1; 6:1), durante 4 h sobre líneas de CCR. La muerte celular se determinó analizando la exposición en la membrana de PS (Anexina-V-FITC) y la permeabilización de la membrana celular (7-AAD) por citometría de flujo, como se indica en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 donantes independientes, tras restar sus respectivos controles. Se realizó el test ANOVA de dos factores con el post-test de Bonferroni, donde $p > 0,05$ indica diferencias no significativas.

El protocolo del ensayo se basó en una modificación del descrito (Betts et al., 2003) (533). Se incubaron 5×10^4 células NK purificadas (apartado 3.1.2.3) con el mismo número de células tumorales (ratio 1:1) en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Como control se usó un pocillo con las células NK solas. A cada pocillo se añadió el anticuerpo frente a CD107a marcado con APC (1/100; Tabla 3.5) y el bloqueante del aparato de Golgi (1/500; Tabla 3.5), y se mantuvo el co-cultivo durante 5 h, a 37°C, en un volumen final de 200 μ L de medio completo. Pasado ese tiempo se centrifugó la placa a 3.000 xg y se añadieron los anticuerpos: anti-CD56 marcado con PerCP-Vio700 (1/50; Tabla 3.5), anti-CD3 marcado con VioGreen (1/50; Tabla 3.5), anti-CD107a marcado con APC (1/50) y el bloqueante de Fc (1/200; Tabla 3.5) en el tampón PBS suplementado con 5% SFB. Tras incubar 15 min a 4°C se lavó con PBS suplementado con 5% SFB y se analizó por citometría de flujo.

3.3.2.1 Determinación de la degranulación de las células NK en combinación con anticuerpos inhibidores de checkpoints

Se valoró la implicación de los *checkpoints* PD-1 y TIM-3 en el proceso de degranulación de las células NK. Igual que en el estudio de la citotoxicidad (apartado 3.1.3.4), las células NK se preincubaron durante 30 min, a 4°C, con los respectivos anticuerpos bloqueantes α -PD-1, Pembrolizumab (20 μ g/mL) y α -TIM-3 (20 μ g/mL). Pasado este tiempo, y sin realizar un lavado de las células en incubación, se enfrentaron a cultivos en suspensión de células tumorales a un ratio efector:diana 1:1 como se ha explicado anteriormente (apartado 3.3.1.2).

3.3.3 Determinación de la expresión de proteínas

Para caracterizar el fenotipo de las células estudiadas se realizó un marcaje con anticuerpos conjugados con fluorocromos (Tabla 3.5) sobre una suspensión monocelular (apartado 3.1.1.1), de 1×10^5 células cultivadas en condiciones convencionales; o $1-2 \times 10^4$ células cultivadas en condiciones 3D (equivalente aproximadamente a 10 esferoides).

3.3.3.1 Análisis de proteínas de superficie celular

Las suspensiones celulares se incubaron con anticuerpos individuales o combinaciones de ellos (Anexo 2) en tampón PBS suplementado con 5% SFB durante 15 min a 4°C, en oscuridad.

Seguidamente se centrifugó a 3.000 xg durante 2 min para retirar la solución de marcaje y se realizó un lavado con PBS suplementado con 5% SFB. Finalmente se fijó con PFA 1% (Paraformaldehído; Anexo 1, Tabla 1) hasta su posterior análisis por citometría de flujo.

3.3.3.2 Análisis de proteínas intracelulares

El estudio de las proteínas citosólicas requiere la permeabilización de la membrana plasmática. Para ello, las suspensiones celulares primero se fijaron con 100 µL de PFA 4% durante 10 min a 4°C. Seguidamente se lavó dos veces con tampón PBS suplementado con 5% SFB. Las células se resuspendieron en 100 µL del tampón de permeabilización (Anexo 1, Tabla 2) y se mantuvieron durante 5 min a RT. Pasado este tiempo, se centrifugó a 3.000 xg durante 2 min y se incubó con el anticuerpo en tampón de permeabilización durante 15 min a 4°C, en oscuridad. Seguidamente se centrifugó a 3.000 xg durante 2 min para retirar la solución de marcaje y se realizó un lavado con PBS suplementado con 5% SFB. Finalmente se fijó con PFA 1% para su posterior análisis por citometría de flujo.

3.3.4 Tratamiento de datos

Los datos obtenidos se analizaron a través del programa de análisis celular *Weasel* (desarrollado en Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Melbourne). Se obtuvieron resultados de Intensidad Media de Fluorescencia (MFI, del inglés, *Mean Fluorescence Intensity*) y porcentaje celular, positivo o negativo, para un determinado marcaje.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.5 Anticuerpos

Antígeno	Clon	Isotipo	Especie	Casa comercial	Aplicación	Dilución/ concentración	Conjugación
B7H6	875002 (MC)	IgG1	Ratón	R&D	FC	1/50	Alexa Fluor® 647
CD3	BW264/56 (MC)	IgG2ak	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	FITC
CD3	BW264/56 (MC)	IgG2ak	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PerCP
CD3	BW264/56 (MC)	IgG2ak	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	VioGreen
CD3	-	IgG2a	Ratón	Miltenyi	Separación	1/4	Microesferas magnéticas
CD16	REA423 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	FITC
CD16	VEP13 (MC)	IgMk	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	APC
CD54 (ICAM-1)	HA58 (MC)	IgG1k	Ratón	BD	FC	1/50	APC
CD56	AF12-7H3 (MC)	IgG1	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE
CD56	AF12-7H3 (MC)	IgG1	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	APC
CD56	REA196 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PerCP-Vio700
CD56	-	IgG1	Ratón	Miltenyi	Separación	1/4	Microesferas magnéticas
CD66abce (CEACAM-1)	TET2 (MC)	IgG2bk	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE-Vio-770
CD107a (Lamp-1)	REA792 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/100 - 1/50	APC
CD112 (Nectina-2)	R2.525 (MC)	IgG1k	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE
CD152 (CTLA-4)	BNI3 (MC)	IgG2a	Humano	Miltenyi	FC	1/50	APC
CD155 (PVR)	PV404.19 (MC)	IgG1	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE
CD159a (NKG2A)	Z199 (MC)	IgG2b	Ratón	Beckman Coulter	FC	1/50	PE
CD183 (CXCR3)	REA232 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PE
CD223 (LAG-3)	REA351 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	APC
CD273 (PD-L2)	MIH18 (MC)	IgG1k	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE
CD 274 (PD-L1)	MIH1 (MC)	IgG1k	Ratón	eBioscience	FC	1/50	APC
CD279 (PD-1)	PD1.3.1.3 (MC)	IgG2bk	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	VioBright FITC
CD279 (PD-1)	Pembroliz u-mab (MC)	IgG4	Humano	MSD	Bloqueo	20 µg/mL	-
CD336 (NKp44)	2.29 (MC)	IgG1	Ratón	Miltenyi	FC	1/50	PE

MATERIALES Y MÉTODOS

Antígeno	Clon	Isotipo	Especie	Casa comercial	Aplicación	Dilución/concentración	Conjugación
CD366 (TIM-3)	F38-2E2 (MC)	IgG1k	Mouse	Miltenyi	FC	1/50	APC
CD366 (TIM-3)	F38-2E2 (MC)	IgG1k	Mouse	Biologend	Bloqueo	20 µg/mL	-
Galecina-9	REA435 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PE
HLA-ABC	W6/32 (MC)	IgG2ak	Ratón	eBioscience	FC	1/50	FITC
HLA-E	REA1031 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PE
HLA-DP/DQ/DR	REA332 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	APC-Vio770
HLA-G	87G (MC)	IgG2ak	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PerCP-Vio700
MICA/B	REA1076 (MC)	IgG1	Humano	Miltenyi	FC	1/50	VioBright 515
Receptor Fc¹	-	IgG	Humano	BD	FC	1/200	-
ULBP-1	170818 (MC)	IgG2a	Ratón	R&D	FC	1/50	Alexa Fluor® 405
ULBP-2/5/6	165903 (MC)	IgG2a	Ratón	R&D	FC	1/50	Alexa Fluor® 405
Isotipo	MOPC-21	IgG1	Ratón	Biologend	Bloqueo	20 µg/mL	-
Isotipo	-(MC)	IgG1	Humano	Enzo	Bloqueo	5 µg/mL	-
Isotipo	-(MC)	REA	Humano	Miltenyi	FC	1/50	PE
Isotipo	-(MC)	IgG1k	Ratón	BD	FC	1/50	APC
Isotipo	-(MC)	IgG2bk	Ratón	BD	FC	1/50	APC

¹Bloqueante de los receptores Fc, basada en una solución de la fracción constante (Fc) de anticuerpos IgG humanos.

APC: Alofocianina; **CEACAM:** Molécula de Adhesión Celular relacionada con el Antígeno; **CTLA-4:** Antígeno 4 del Linfocito T Citotóxico; **CXCR3:** Receptor de Quimioquina C-X-C tipo 3; **FC:** Citometría de Flujo; **FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína; **HLA:** Antígeno Leucocitario Humano; **ICAM-1:** Molécula de Adhesión Intercelular; **LAG-3:** Gen 3 de activación de linfocitos; **Lamp-1:** proteína de membrana asociada a lisosoma 1; **MC:** Monoclonal; **PE:** Ficoeritrina; **PD-1:** proteína de Muerte celular Programada; **MICA/B:** Proteína relacionada con la cadena A/B de HLA-I; **PerCP:** Proteína Clorofila-Peridina; **PVR:** Receptor de Poliovirus; **TIM-3:** Receptor de células T con dominio de Inmunoglobulina y Mucina 3; **ULBP:** Proteína de Unión UL16

3.4 Ensayos de microscopía de fluorescencia

La interacción entre los esferoides y las células NK, en términos de penetración de las células NK en el esferoide y eliminación del mismo, se analizó a través de microscopía convencional (Nikon Elipse Ti-E C1) o confocal (Leica SP2) de fluorescencia. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio Ochoa, en las instalaciones del Instituto Universitario de Investigación en Ingeniería de Aragón (I3A) y en el CIBA.

3.4.1 Análisis de la eliminación del esferoide por microscopía convencional de fluorescencia.

Para analizar la sensibilidad de las líneas de CCR a la acción de las células NK en un modelo 3D, se generaron esferoides de 1.000 células de la línea celular HCT-116-GFP. Estos esferoides se dispusieron individualmente en una placa de 96 pocillos de fondo redondo de baja adherencia. Las células NK purificadas y marcadas con la sonda eFluor (apartados 3.1.2.3 y 3.3.1.1, respectivamente) se enfrentaron a los esferoides a distintos ratios efector:diana (3:1; 6,1; 9:1), en un volumen de 100 μ L de medio completo. Se realizaron 4 réplicas por condición.

El ensayo se mantuvo durante 96 h, a 37°C, tomando imágenes de los pocillos cada 24 h a través de un microscopio invertido de fluorescencia. Cada imagen se correspondió con una capa de 5 μ m en el eje "Z", a una longitud de 200 μ m desde el centro del esferoide. Se obtuvieron imágenes en campo claro y a distintas longitudes de onda de excitación para la GFP (Proteína Fluorescente verde, del inglés *Green Fluorescent Protein*; λ_{abs} = 488 nm ; λ_{em} = 510 nm) y la sonda eFluor 670 (λ_{abs} = 633 nm ; λ_{em} = 670 nm).

3.4.2 Análisis de la penetración de células NK en el esferoide por microscopía confocal

Para estudiar la penetración de las células NK en el esferoide, como se ha explicado anteriormente (apartado 3.4.1), se generaron esferoides de 1.000 células de la línea celular HCT-116-GFP, que se co-cultivaron con las células NK durante 24, 48, 72 y 96 h, a distintos ratios efector:diana (3:1, 6:1 y 9:1). Posteriormente, los esferoides se fijaron de manera individual, retirando el medio de cultivo y añadiendo 100 μ L de PFA 4%. Se dejó incubar a RT (temperatura ambiente) durante 24 h y se retiró el PFA para conservar los esferoides en etanol 70%.

A través de microscopía confocal, se realizó la medición en capas de los esferoides tomando el centro de cada uno de ellos como punto de partida. Así, se realizaron mediciones cada 5 μm a lo largo de una longitud total de 200 μm .

3.4.3 Tratamiento de datos

Las imágenes de los ensayos de co-cultivo de célula viva se analizaron a través del programa *NIS-Elements Advanced Research*. Se llevó a cabo la superposición de las capas en “Z” en las diferentes longitudes de onda y se determinó el área relativa del esferoide tomando como referencia su tamaño antes de iniciar el co-cultivo.

Las imágenes de microscopía confocal de los esferoides fijados se analizaron a través del programa *Fiji*. Se determinó el área del esferoide y la penetrabilidad de las células efectoras.

3.5 Modelo de xenotrasplante tumoral en ratón y análisis de la actividad antitumoral de células NK expandidas

3.5.1 Modelo animal

La actividad antitumoral *in vivo* de las células NK activadas se valoró utilizando ratones inmunodeprimidos NSGTM (NOD Scid Gamma, The Jackson Laboratory); carentes de células T y B maduras, células NK y sistema del complemento, y deficientes en macrófagos y células dendríticas (534). Se utilizaron animales hembras de 6 semanas de edad. Los experimentos se realizaron de acuerdo a las instrucciones de la Federación de Asociaciones Europeas dedicadas a la Ciencia del Animal de Laboratorio (FELASA) y con la aprobación de la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI 47/18). Los animales se mantuvieron en las instalaciones del CIBA en un ambiente libre de patógenos, con cubetas individualmente ventiladas, y en condiciones estándar de estabulación (temperatura media de 22°C, ciclo de luz/oscuridad de 12 h y comida y agua *ad libidum*).

3.5.2 Terapia adoptiva de células NK alogénicas activadas

3.5.2.1 Evaluación del desarrollo tumoral en modelo ectópico

Se estableció un modelo subcutáneo de CCR mediante la inoculación de 2×10^6 células de la línea HCT-116 en el flanco izquierdo de cada ratón. El seguimiento del desarrollo tumoral se realizó mediante la determinación del volumen en días alternos. Para calcular el volumen se midieron la anchura (A), la largura (L) y la altura (H) y se aplicó la fórmula: $L \cdot A \cdot H$. Se consideró como criterio de punto final un volumen superior a 1000 mm^3 .

3.5.2.2 Evaluación del tratamiento con células NK alogénicas

Para evaluar la acción antitumoral de las células NK *in vivo* se consideraron tres grupos de estudio:

- Control: se administraron $10 \mu\text{g}$ de IL-2 /ratón (equivalente a 5×10^4 UI) en medio RPMI basal por dosis.
- Tratamiento temprano: iniciado cuando el tumor fue detectable por palpación (volumen: $< 50 \text{ mm}^3$). Se administraron $10 \mu\text{g}$ de IL-2/ratón junto con 10×10^6 células NK alogénicas activadas por dosis.

- Tratamiento tardío: iniciado cuando el tumor fue detectable visualmente (volumen: 50-150 mm³). Se administraron 10 µg de IL-2/ratón junto con 10x10⁶ células NK alogénicas activadas por dosis.

En todos los grupos se fijó un mismo esquema de tratamiento, con tres administraciones por vía intraperitoneal (i.p.) en intervalos de 48 h. En cada una de estas administraciones se incluyó la IL-2 ya que se trata de un factor esencial para la supervivencia y proliferación de las células NK expandidas (535-537).

Para la obtención de las células NK expandidas, se partió de PBMCs de diferentes donantes en los que se eliminaron las células CD3⁺ y se estimularon las células NK con la línea celular R69-EBV⁺, en combinación con IL-2 e IL-15, durante 14-21 días (apartado 3.1.2.2.2). Previamente a su administración, se comprobó que la pureza de las células NK en el cultivo era > 90%, a través del marcaje CD3/CD56 (apartado 3.3.3.1).

3.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron con el programa *Prism5.0* (GraphPad Software, Inc., San Diego), según se describa en los respectivos pies de figura.

Para comparar las diferencias entre dos grupos se utilizó la prueba t-student de dos colas, para datos pareados o no pareados en función de la relación entre los grupos experimentales. Para comparar tres o más grupos, se utilizó el ANOVA de un factor, con el *post-test de Bonferroni*. Cuando se consideraron dos fuentes de variación, se utilizó el ANOVA de dos factores, igualmente con el *post-test de Bonferroni*.

En el ensayo de viabilidad celular a través de PrestoBlue[®] se determinó el EC₅₀ (Concentración Efectiva 50; dosis que produce la muerte del 50% de las células), para cada una de las líneas celulares, mediante un análisis de regresión no lineal. En los ensayos *in vivo*, las diferencias en la supervivencia de los grupos se determinaron a través de la curva Kaplan Meier, utilizando el test *Log-rank (Mantel-Cox)*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La significación estadística se estableció como $p < 0,05$; siendo * $< 0,05$, ** $< 0,01$ y *** $< 0,001$. El símbolo ns indica “no significativo”.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.Resultados y discusión

4.1 Caracterización de los cultivos celulares de CCR

El CCR es una enfermedad heterogénea a nivel molecular. Los distintos patrones de mutaciones afectan al perfil inmunológico del tumor, así como al pronóstico y a la respuesta al tratamiento del paciente. Por ello, para estudiar el poder anti-tumoral de un protocolo de ACT basado en células NK alogénicas se estableció una colección de líneas celulares de CCR que representara la diversidad de dichos patrones (Tabla 4.1).

Tabla 4.1 Colección de líneas celulares de CCR. Adaptado de (538, 539)

Línea celular	Inestabilidad en microsatélites	Hiper-metilación	KRAS	BRAF	PIK3	PTEN	P53
CaCo-2	MSS	CIMP -	wt	wt	wt	wt	E204X
CoLo-201	MSS	CIMP +	wt	V600E	wt	wt	Y103F ó Y103pf*37
CoLo-205	MSS	CIMP +	wt	V600E	wt	wt	Y103F ó Y103pf*37
DLD-1	MSI	CIMP +	G13D	wt	E545K D549N	wt	S241F
HCT-116	MSI	CIMP +	G13D	wt	H1047R	wt	wt
HT-29	MSS	CIMP +	wt	V600E	P449T	wt	R273H
LoVo	MSI	CIMP -	G13D A14V	wt	wt	wt	wt
SKCO- 15	-	-	-	-	-	-	-
SW620	MSS	CIMP -	G12V	wt	wt	wt	R273H P309S

CIMP: del inglés, *CpG Island Methylator Phenotype*; **MSI:** del inglés, *Microsatellite Inestability*; **MSS:** del inglés, *Microsatellite Stable*; **wt:** fenotipo silvestre, del inglés *wild type*

Además de las diferencias inherentes a cada tipo tumoral, los tumores pueden desarrollar mutaciones adquiridas por la presión terapéutica. Por ejemplo, son frecuentes las mutaciones que afecten a la vía de la apoptosis. Es por ello que también se estableció el cultivo de una línea de HCT-116 mutada (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Colección de líneas de CCR con deficiencias la vía de la apoptótica

Línea celular	Mutaciones en la vía de la apoptosis
HCT-116	<i>wt</i>
HCT-116 mut	<i>bax/bak^{-/-}</i>

4.1.1 Establecimiento de los cultivos de las líneas celulares de CCR

A partir de los cultivos convencionales en placa (2D), se generaron esferoides (3D) que representaran la arquitectura de un tumor *in vivo* (Figura 4.1). Se utilizó el método de la gota colgante, con la adición de *Methocell* como agente viscosocante y *scaffold* (apartado 3.1.1.3).

La cinética de formación de los esferoides varió entre líneas celulares. Así, CaCo-2, HCT-116, HT-29 y DLD-1 formaron esferoides compactos en un tiempo de 48 h y un porcentaje del 20% de *Methocell*. No obstante, se observaron distintas morfologías: las líneas celulares HCT-116, HT-29 y DLD-1 dieron lugar a esferoides redondos, aunque el nivel de compactación de HCT-116 fue menor. Mientras, la línea CaCo-2 presentó una estructura tipo *cluster*.

Por otro lado, las líneas celulares HCT-116 mut, LoVo, SKCo-15 y SW620 formaron esferoides tras 72 h de incubación y un porcentaje del 30% de *Methocell*. En estas condiciones, todos los esferoides resultaron compactos, salvo los generados por SW620. Esta línea celular formó un agregado fácilmente dissociable que, tras aspiración, dio lugar a una dispersión de agregados de distinto tamaño. En cuanto a la morfología, todas resultaron en una estructura tipo masa donde, a diferencia de los esferoides de las líneas celulares HT-29 y DLD-1, no se observó un perímetro bien definido, lo que se asocia a la menor compactación del esferoide.

Las líneas celulares Colo-201 y Colo-205 no formaron esferoide en ninguna de las condiciones anteriores, ni tampoco aumentando el tiempo de formación o la concentración de *Methocell*. En éstas se obtuvo un agregado celular fácilmente dissociable que, tras aspiración, dio lugar a una suspensión monocelular. Es por ello que se seleccionaron las condiciones de menor tiempo y concentración de *scaffold*.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

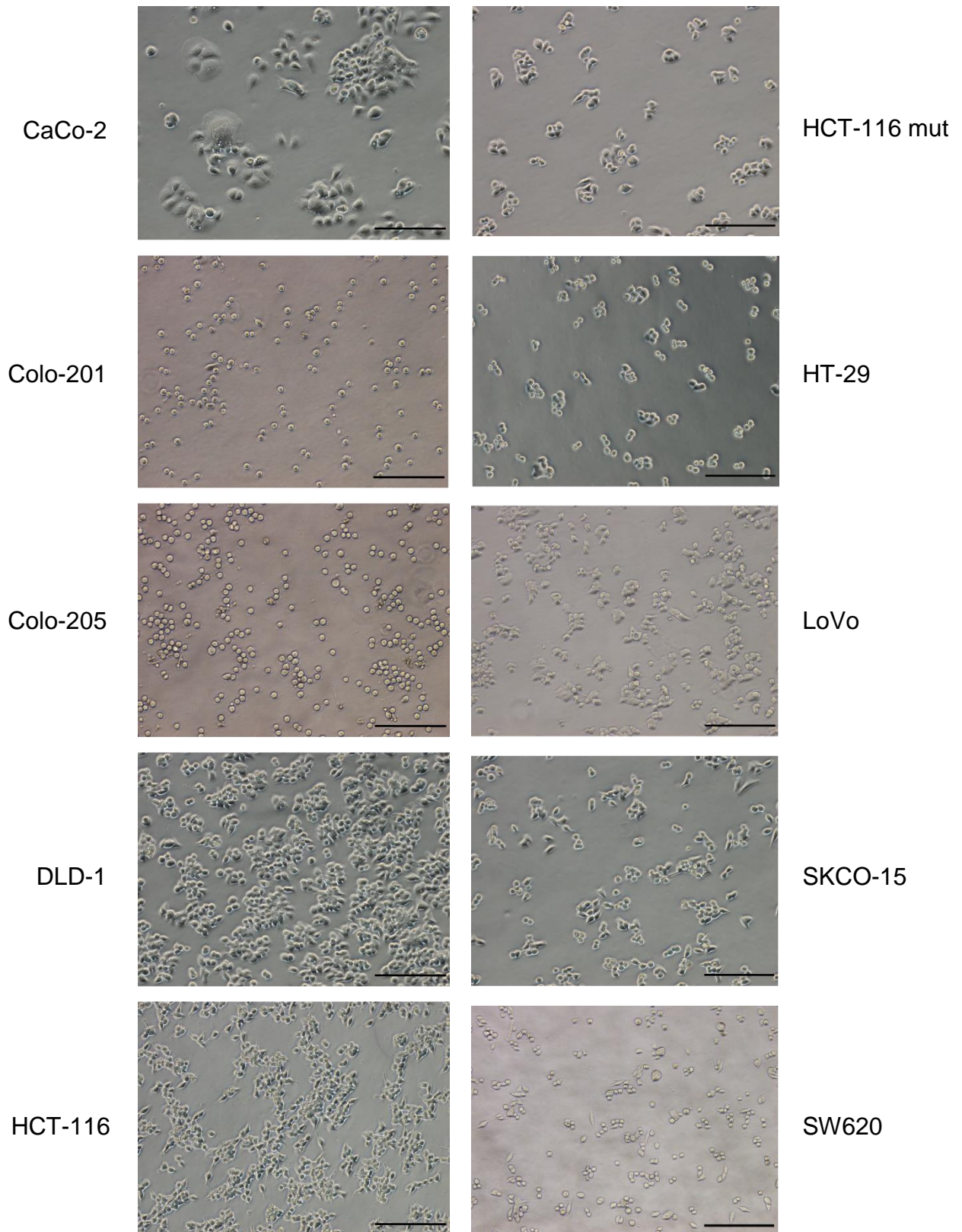


Figura 4.1A Morfología de los cultivos de las líneas de CCR en 2D. Los cultivos en 2D se establecieron de modo convencional en placa. Los cultivos 3D se generaron a partir del método de la gota colgante con unas condiciones definidas para cada línea celular, como se indica en materiales y métodos (apartado 3.1.1.3). Se recogieron las imágenes de los cultivos establecidos a través de un sistema de cámara acoplado a un microscopio invertido. La línea de escala representa una longitud de 200 μm .

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

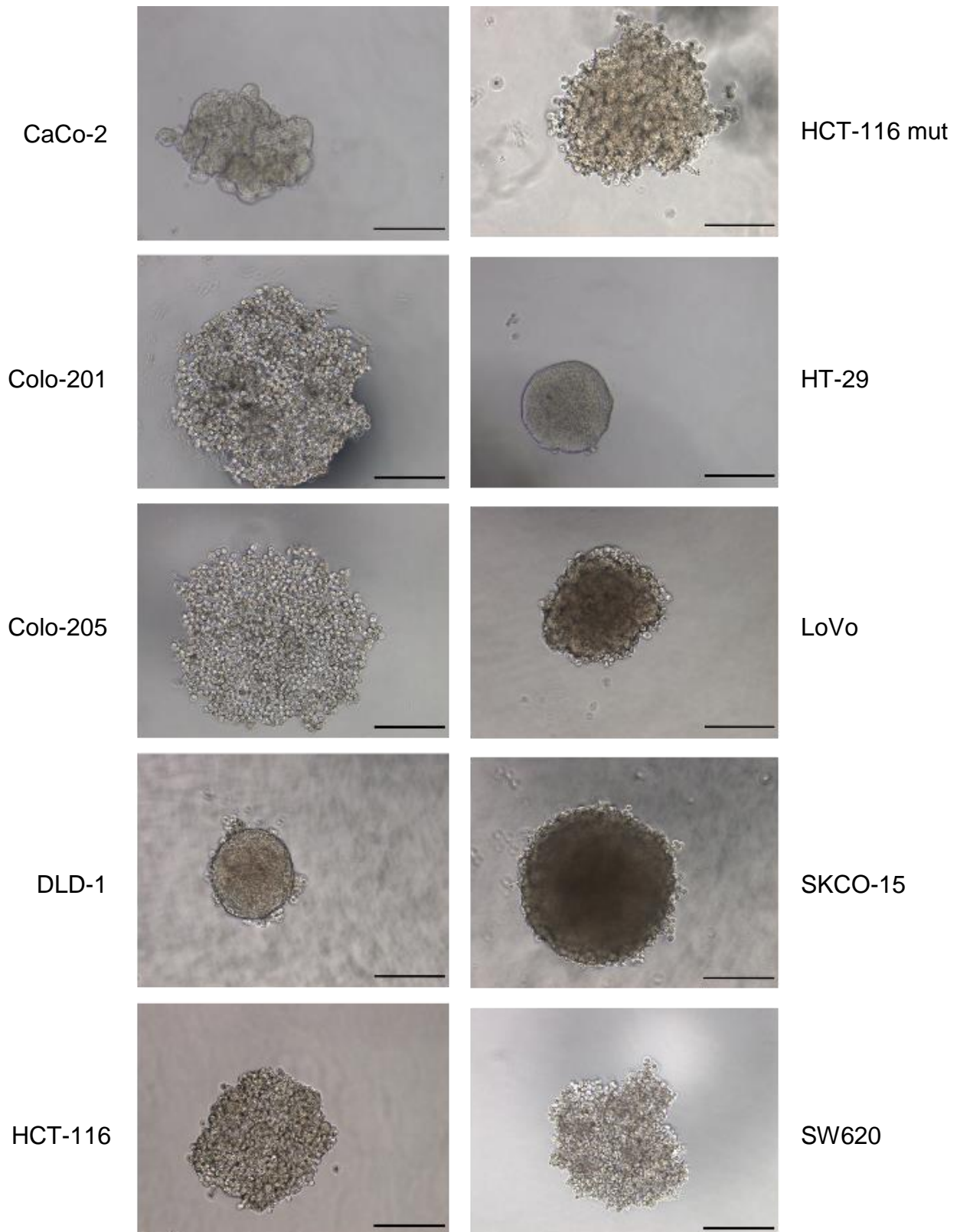


Figura 4.1 B Morfología de los cultivos de las líneas de CCR en 3D. Los cultivos en 2D se establecieron de modo convencional en placa. Los cultivos 3D se generaron a partir del método de la gota colgante con unas condiciones definidas para cada línea celular, como se indica en materiales y métodos (apartado 3.1.1.3). Se recogieron las imágenes de los cultivos establecidos a través de un sistema de cámara acoplado a un microscopio invertido. La línea de escala representa una longitud de 200 μm .

4.1.2 Análisis de los ligandos de células NK en cultivos 2D y 3D

El efecto citotóxico de las células NK depende de la integración de señales a través de sus receptores de superficie. Por ello, diferencias en el patrón de expresión de los ligandos involucrados en la adhesión, activación e inhibición de las células NK se pueden asociar a una mayor o menor sensibilidad de las células tumorales al ataque de estas células efectoras. Además, la expresión de estos ligandos puede verse afectada por las condiciones de cultivo.

Para caracterizar el perfil de expresión de las líneas de CCR se realizó un fenotipado de las suspensiones monocelulares provenientes de cultivos en 2D y 3D, a través de citometría de flujo (Anexo 3). Se compararon las intensidades medias de fluorescencia (MFI; del inglés, *Mean Fluorescence Intensity*) entre las dos condiciones de cultivo y se analizaron las diferencias asociadas a la arquitectura 3D (test t de Student). Posteriormente, se clasificaron las líneas en función del nivel de expresión de los ligandos (alto, medio o bajo; Tabla 4.3 y Tabla 4.4). Debido a la complejidad en la interpretación del análisis estadístico (ANOVA de un factor), se tomó como referencia el mayor MFI para cada ligando. Se consideró que las líneas con MFI inferior al 25% del valor de referencia presentaban una baja expresión. Por el contrario, las líneas con un MFI superior al 75% presentaban una alta expresión. El resto de las líneas se clasificaron en un nivel medio.

En primer lugar, se estudió **ICAM-1** como un **ligando de adhesión** que, al asociarse a LFA-1, permite la formación de la sinapsis inmunológica. En el cultivo en 2D, la línea celular HCT-116 presentó un nivel de expresión alto; mientras que CaCo-2, Colo-201, Colo-205; HCT-116 mut, HT-29 y SW620 presentaron niveles bajos. El cultivo en 3D supuso un incremento significativo en los niveles de ICAM-1 en la línea celular LoVo (Figura 4.2).

Posteriormente, se analizaron los **ligandos de inhibición HLA-ABC y HLA-E**, que se asocian a receptores KIR y NKG2A respectivamente. En cuanto a HLA-ABC, en condiciones de cultivo 2D, la línea celular HCT-116 mut presentó el mayor nivel de expresión; mientras que Caco-2, Colo-201, Colo-205, DLD-1, LoVo y SKCO presentaron niveles bajos. El cultivo en 3D supuso un descenso significativo en el nivel de HLA-ABC en las líneas celulares HCT-116, HCT-116 mut, HT-29 y SW620 (Figura 4.2). En estas condiciones, sólo HCT-116 y HCT-116 mut se incluyeron en el grupo de nivel de expresión medio. En cuanto a HLA-E, todas las líneas celulares mostraron una expresión homogénea en ambas condiciones de cultivo (Figura 4.2).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

El ligando **HLA-G** puede señalar tanto para **activación** como para **inhibición** a través de su unión a NKG2A. También en este caso se observó una expresión homogénea del ligando en ambas condiciones de cultivo (Figura 4.2).

En cuanto a los **ligandos de activación**, se analizó la expresión de **MICA/B** y los **ULBPs**, que señalizan a través de NKG2D (Figura 4.2). El nivel de **MICA/B** se mantuvo bajo en todas las líneas celulares en condiciones de cultivo 2D. La conformación 3D supuso un incremento significativo de su expresión en Colo-201, HCT-116, SKCO-15 y SW620. De este modo, HCT-116 y SKCO presentaron niveles altos de expresión y Colo-201 niveles medios; mientras que el nivel de SW620 se mantuvo en el rango bajo. El análisis de la expresión de los ULBPs se realizó mediante la detección de ULBP1, ULBP2/5/6, o su combinación. Los marcajes independientes revelaron una contribución similar de ambos al nivel total observado con la combinación (Anexo 3). De este modo, la comparación entre líneas se realizó a partir del nivel total observado, donde los resultados mostraron una expresión homogénea entre las líneas celulares.

También se estudió la expresión de **B7-H6**, como ligando del receptor NKp30. En condiciones 2D, la línea celular Colo-201 mostró un nivel de expresión alto; mientras que las DLD-1 y SKCO-15 presentaron niveles bajos. Con el cultivo en 3D, tanto la línea celular HCT-116 como SW620 alcanzaron niveles altos de B7-H6. Sin embargo, este incremento sólo resultó significativo para la línea HCT-116 (Figura 4.2).

Por otro lado, tanto **Nectina-2** como **PVR** se asocian al co-receptor DNAM-1. Por ello, se analizó el nivel de expresión de ambas de manera individual y combinada. Así, se observó que la mayor contribución al nivel de expresión total de los ligandos de DNAM-1 provenía de PVR (Anexo 3). A partir de estos niveles totales, se realizó la comparación entre las líneas celulares y las condiciones de cultivo (Figura 4.2). La línea celular HCT-116 mostró el mayor nivel de expresión; mientras las líneas celulares LoVo y SW620 mostraron niveles bajos. El cultivo en 3D supuso un descenso significativo en el nivel de HCT-116 mut, aunque la expresión se mantuvo dentro del rango medio.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Tabla 4.3 Nivel de expresión de los ligandos para *checkpoints* convencionales de las células NK

Línea celular	ICAM-1		HLA-ABC		HLA-E		HLA-G		MICA/B		ULBPs		Nectina-2/ PVR		B7-H6	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
CaCo-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
CoLo-201	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	++	-
CoLo-205	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
DLD-1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
HCT-116	++	++	+	+	-	-	-	-	-	++	-	-	+	+	+	++
HCT-116 mut	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
HT-29	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	+
LoVo	+	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
SKCO- 15	+	+	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	+	+	-	+
SW620	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++

Símbolo -: nivel de expresión bajo (color gris); **Símbolo +:** nivel de expresión medio (color verde); **Símbolo ++:** nivel de expresión alto (color naranja).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

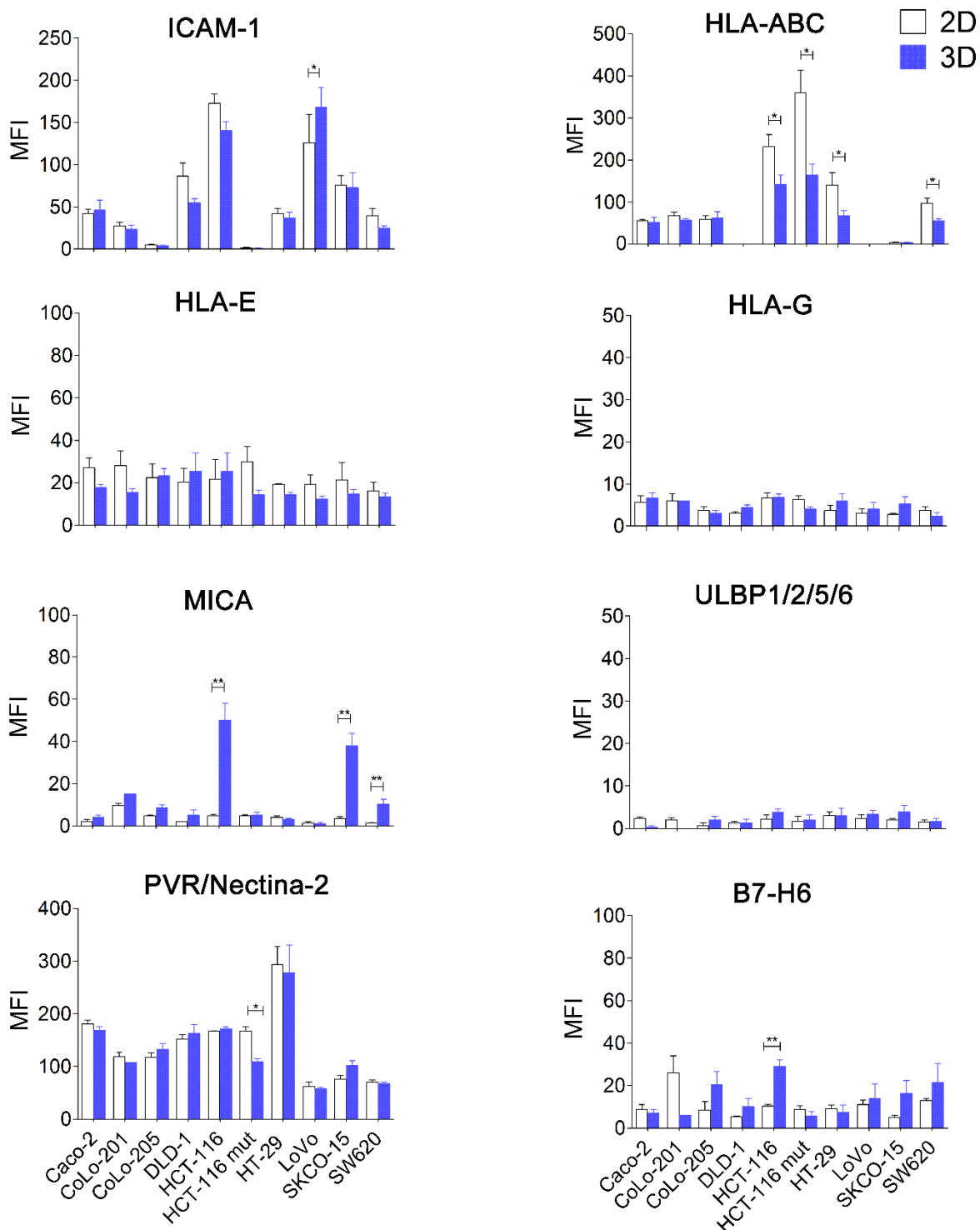


Figura 4.2 Expresión de los ligandos para *checkpoints* convencionales de las células NK. Se obtuvieron suspensiones monocelulares de los cultivos de CCR y se analizó de la expresión de los distintos ligandos mediante citometría de flujo, como se describe en materiales y métodos (apartado 3.3.3.1). En los diagramas de barras se muestra la MFI para los cultivos en 2D (blanco) y 3D (azul). Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico test t de Student, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Finalmente, se analizaron los ligandos de los receptores considerados *checkpoints* emergentes en células NK, dado que su expresión y función se ha asociado tradicionalmente a los linfocitos T: PD-L1, PD-L2, HLA-II, Gal-9, CEACAM-1 y PS.

PD-L1 y PD-L2 se asocian al **receptor PD-1**. La expresión de **PD-L1**, en condiciones de cultivo en 2D, fue media en todas las líneas celulares. El cultivo en condiciones 3D supuso un incremento significativo para CaCo-2 y HT29. La expresión de **PD-L2** fue bastante homogénea en todas las líneas celulares, si bien los mayores valores se observaron en las líneas Colo-201 y SW620 en condiciones 3D. Sin embargo, el establecimiento de la arquitectura 3D supuso un incremento significativo del nivel de PD-L2 en la línea Colo-201 (Figura 4.3).

El eje PD-1/PD-L1 cuenta con mAbs bloqueantes aprobados como una nueva alternativa en el tratamiento del cáncer, incluso ya en primera línea para algunos tipos tumorales (540). Sin embargo, el papel de otros ejes como el de TIM-3 o LAG-3 y sus ligandos están menos estudiados. Por ello, se seleccionaron 5 líneas representativas de CCR para estudiar el perfil de expresión.

La molécula **HLA-II** se asocia al receptor **LAG-3**. Dentro de las líneas seleccionadas, sólo SKCO-15 expresó HLA-II. Para ésta, se observaron una población positiva que varió entre el 45-100% en el cultivo en 2D, y entre el 57-100% en el cultivo en 3D (Figura 4.3). Esta población positiva presentó una expresión dispersa en cuanto al nivel de intensidad.

Por otro lado, las moléculas Gal-9, CEACAM-1 y PS se asocian al receptor **TIM-3**. **Gal-9** es una proteína secretada en forma soluble, por lo que su detección en las líneas de CCR se realizó a nivel intracelular. En los cultivos en 2D, las líneas celulares mostraron niveles de expresión medios. En el cultivo en 3D la línea celular DLD-1 aumentó significativamente la expresión de Gal-9, adquiriendo un nivel alto (Figura 4.3). En cuanto a **CEACAM-1**, el nivel de expresión fue medio en los cultivos en 2D de las líneas celulares CaCo-2 y HT-29. Además, el cultivo en 3D supuso un incremento significativo para ambas líneas, aunque en mayor medida para la línea HT29 (Figura 4.3). Mientras, el resto de las líneas celulares mantuvieron valores bajos. Además, para este ligando, la línea SKCO-15 presentó un patrón de expresión diferente. Independientemente de las condiciones de cultivo, se apreciaron dos poblaciones con mayor (20-40%) o menor (60-80%) intensidad de señal (Figura 4.3). En este caso, la primera de ellas fue

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

la seleccionada en la comparación con las otras líneas. Por último se analizó la expresión de **PS**, que presentó niveles altos en la línea Caco-2 y niveles bajos en la línea DLD-1. El cultivo en condiciones 3D supuso una mayor homogeneidad entre las líneas, con un descenso significativo en la expresión de las líneas CaCo-2 y HT-29 (Figura 4.3).

Tabla 4.4 Nivel de expresión de los ligandos para *checkpoints* emergentes de las células NK

Línea celular	PD-L1		PD-L2		HLA-II		Gal-9		CEACAM		PS	
	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D	2D	3D
CaCo-2	+	++	+	-	-	-	+	++	+	+	++	+
CoLo-201	+	+	+	++								
CoLo-205	+	+	+	+								
DLD-1	+	+	+	+	-	-	+	++	-	-	-	-
HCT-116	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+
HT-29	+	++	+	+	-	-	+	+	+	++	++	+
LoVo	+	+	+	+								
SKCO- 15	+	+	+	+	++	+	+	++	-	-	+	+
SW620	+	+	+	++								

Símbolo -: nivel de expresión bajo (color gris); **Símbolo +:** nivel de expresión medio (color verde); **Símbolo ++:** nivel de expresión alto (color naranja).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

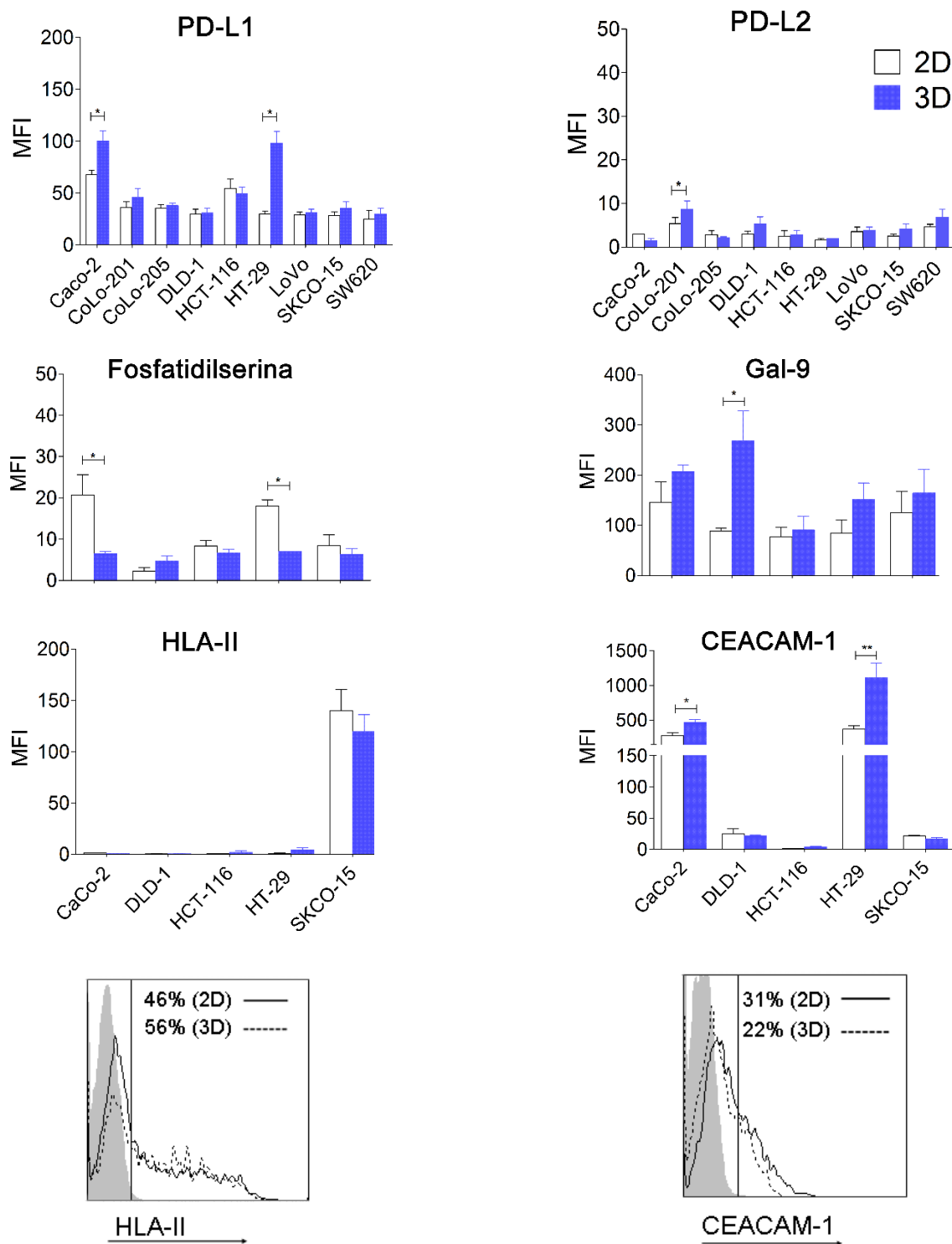


Figura 4.3 Expresión de los ligandos para *checkpoints* emergentes de las células NK. Se obtuvieron suspensiones monocelulares de los cultivos de CCR y se analizó de la expresión de los distintos ligandos mediante citometría de flujo, como se describe en materiales y métodos (apartado 3.3.3.1). En los diagramas de barras se muestra la MFI para los cultivos en 2D (blanco) y 3D (azul). Los datos representan la media±SEM de al menos 3 experimentos independientes. Se realizó el análisis estadístico test t de Student, donde * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Se incluyen también los histogramas que muestran una determinación representativa del patrón de expresión característico de la línea SKCO-15 en 2D (línea continua) y 3D (línea punteada) frente al control FMO (del inglés, *Fluorescence Minus One*; gris).

4.1.3 Análisis de la sensibilidad a tratamientos de quimioterapia

Una de las características que define a los subgrupos de CCR es la presencia de errores en la maquinaria de reparación del DNA. Además, el estado MSI se ha asociado con la resistencia a los tratamientos de quimioterapia (541). El 5-FU es un fármaco que se incluye en la mayoría de los esquemas de quimioterapia frente al CCR, pero la tasa de respuesta en monoterapia es tan sólo de un 20%. Con el objetivo de conocer si la ACT basada en células NK alogénicas activadas es capaz de eliminar tumores con resistencia a los tratamientos convencionales, se determinó la sensibilidad de las líneas de CCR al efecto del 5-FU.

Se seleccionaron las 5 líneas de CCR que ya se han descrito en el (apartado 4.1.2): CaCo-2, DLD-1, HCT-116, HT-29 y SK-CO15. Se expusieron a concentraciones crecientes de 5-FU durante 72 h y se determinó el porcentaje de supervivencia a través de Prestoblu® (Figura 4.4).

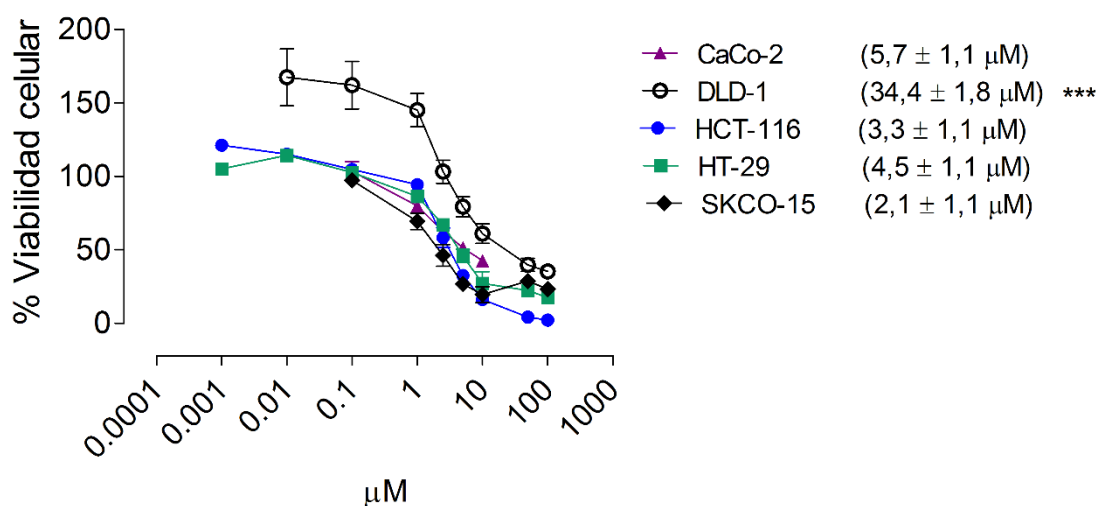


Figura 4.4 Evaluación de la sensibilidad de las líneas de CCR al efecto del 5-FU. Se sembraron 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se añadieron concentraciones crecientes de 5-FU (0; 0,01; 0,1; 1; 2,5; 5; 10; 50 y 100 µM) como se indica en materiales y métodos (apartado 3.2). Tras 72 h se añadió el reactivo Prestoblu® para determinar la viabilidad celular, en base a la fluorescencia emitida respecto a la control. Los datos se integraron con el mejor ajuste de la curva de regresión no lineal y se determinó el IC₅₀. La gráfica representa la media ±SEM de al menos 3 experimentos independientes. Para comparar los IC₅₀ se realizó el análisis estadístico ANOVA de un factor, donde ***p<0,001.

La línea DLD-1 resultó ser la más resistente al tratamiento con 5-FU, cuyo IC₅₀ (34,4 µM) fue estadísticamente superior al del resto de las líneas. Por el contrario, la línea SKCO-15 cuenta con el menor IC₅₀ (2,1 µM). Este valor fue inferior al de las líneas CaCo-2 (5,7 µM; p<0,01) y HT-29 (4,5 µM; p<0,01); pero no al de la línea HCT-116 (3,3 µM; p>0,05).

4.1.4 Discusión

El CCR es una patología compleja, con distintos patrones de mutaciones en base a las que se clasifica en 4 subtipos moleculares: CMS1 o MSI inmune, CMS2 o canónico, CMS3 o metabólico y CMS4 o mesenquimal (apartado 1.4.2). Los **modelos de estudio** del CCR deben tener en cuenta esta heterogeneidad para proporcionar datos representativos de la situación clínica. De este modo, diversos trabajos han definido las características de las líneas celulares que se utilizan como modelo pre-clínico. Como resultado, estos estudios han determinado que las líneas celulares de CCR son capaces de reproducir la diversidad de los tumores primarios (542, 543).

El panel de líneas celulares utilizado en este trabajo se distribuye entre los distintos subgrupos moleculares descritos. No obstante, existen variaciones en la clasificación en función de los estudios, probablemente debido al perfil de expresión génica que considera cada uno de ellos. Una de las clasificaciones se considera que dentro del grupo **CMS1** se encuentran las líneas celulares Colo-201, Colo-205, DLD-1 y LoVo; dentro del grupo **CMS3** se encuentran las línea celular HT-29; y finalmente, dentro del grupo **CMS4** se encuentran las líneas celulares CaCo-2, HCT-116 y SW620 (538, 544). Mientras que otra engloba a la línea celular HCT-116 dentro del grupo CMS1 y deja sin clasificar la SW620, Colo-205 y HT-29 (545). No se dispuso de ninguna línea del subgrupo CMS2, cuyo estudio puede resultar interesante en futuros trabajos con el objetivo de valorar la ACT basada en células NK alogénicas activadas. Por otro lado, este panel también manifiesta la diversidad dentro de cada subgrupo. Por ejemplo, aunque el CMS1 suele estar definido por tumores MSI, las líneas Colo-201 y Colo-205 tienen un estado MSS. Por el contrario, los tumores CMS4 suelen estar definidos por un estado MSS, aunque la línea HCT-116 tiene un estado MSI.

En relación con los subgrupos moleculares, algunos trabajos han establecido una clasificación de las líneas celulares en función del nivel de mutación. Este nivel mutacional se asocia tanto al perfil MSI como a la presencia de otras mutaciones en la DNA polimerasa ϵ (POLE) (538, 542). Dentro del grupo de alta tasa de mutación se sitúan las líneas DLD-1> HCT-116> LoVo; y dentro del grupo de baja tasa de mutación se sitúan las líneas SW620> HT-29> Colo-201> Colo-205. Por su parte, las líneas CaCo-2 y SKCO-15 no fueron incluidas en el estudio (542). Además, los cambios en la expresión génica han permitido agrupar, por sus similitudes, a los tumores CMS1/4 y CMS2/3 (543, 546).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Todos estos cambios a nivel del genoma y del epigenoma son responsables de la sobreexpresión o la disminución de ligandos para los receptores de las células NK. De hecho, como se explicará a continuación, estudios realizados sobre muestras de pacientes han detectado alteraciones asociadas a la zona tumoral respecto a la mucosa normal. No obstante, aunque las características intrínsecas a las líneas celulares puedan reproducir la diversidad de los tumores primarios, constituyen un modelo de estudio limitado a la hora de reproducir la fisiología del tumor. Por ello, se estableció un modelo 3D basado en esferoides a partir de los cultivos convencionales de las líneas de CCR. Este modelo también se ha aplicado en otros estudios recogidos en la literatura para caracterizar la biología o la sensibilidad de los cultivos 3D a distintos tratamientos (501, 547-549). Aunque existe diversidad en cuanto a las metodologías empleadas para su generación, las características morfológicas de los esferoides descritos en los demás estudios reflejan las observadas en este trabajo. En general, se distinguen líneas con buena compactación (como DLD-1 o HT-29) o líneas que generan agregados poco compactos (como SW620 o Colo-205). Pero en realidad se distinguieron una variedad de grados de compactación y de morfologías entre las líneas del panel estudiado. El impacto de esta arquitectura sobre la expresión génica de las células tumorales ya ha sido descrito por en algunos estudios, especialmente en relación con la adquisición de un fenotipo metastásico (550-553). Sin embargo, su efecto sobre la expresión de moléculas que regulan la inmunidad antitumoral, por ejemplo los ligandos de las células NK, es menos conocido.

Dentro de las alteraciones encontradas en los pacientes con CRC se ha observado que se produce un incremento del ligando de adhesión **ICAM-1** en el tejido tumoral frente a la mucosa (434). Además, la presencia de ICAM-1 se ha asociado a la infiltración linfocitaria (554); mientras que su pérdida se correlaciona con un peor pronóstico (555, 556). No obstante, algunos estudios han relacionado la expresión de ICAM-1 con la unión de las células tumorales al endotelio y, con ello, la metástasis (557, 558). En este trabajo, las líneas que tienen un perfil MSI (HCT-116, LoVo y DLD-1) son las que mostraron los mayores niveles de expresión, lo que se podría relacionar con una mayor infiltración inmunitaria, tal y como se ha descrito (554).

En cuanto a los **ligandos de inhibición**, algunos estudios han revelado la disminución de HLA-I en los tumores de CCR, especialmente en los MSI (428). Siguiendo con los cultivos convencionales, las líneas HCT-116 mut, HCT-116, HT-29 y SW620 presentaron una expresión elevada de **HLA-ABC**; tal y como se muestra en Miyagi et al. para la línea HCT-116 (559). Entre ellas, las dos últimas líneas se corresponden con tumores MSS. Por el contrario, las líneas DLD-

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

1, LoVo y SKCO-15 carecieron de HLA-ABC, como también se muestra en Miyagui et al. (559). En este caso, las líneas DLD-1 y LoVo se corresponden con tumores MSI que presentan mutaciones en la cadena β -microglobulina (560). Por otro lado, la sobreexpresión de **HLA-E** y **HLA-G** en los tumores de CRC se correlaciona con un peor pronóstico (apartado 1.4.1.3). Los estudios observacionales han mostrado una mayor expresión de estas moléculas en tumores CMS1, pero también en los demás subgrupos moleculares (421). En este trabajo, e igual que se recoge en otros estudios *in vitro*, los niveles de HLA-E (439) y HLA-G (561) resultaron homogéneos entre las líneas, aunque parece ser bajo en comparación con el HLA-I clásico.

Los ligandos de estrés celular **MICA/B**, que se unen a NKG2D, se han asociado al tejido tumoral de CCR y su expresión se ha correlacionado con un mejor pronóstico. Por otro lado, los **ULBPs**, también ligandos de NKG2D, se han detectado en muestras de CCR, pero su impacto en el pronóstico de los pacientes no está tan claro (562, 563). En relación lo observado por otros estudios sobre líneas de CCR ((562), en este trabajo se encontraron niveles bajos de MICA/B y los ULBPs en comparación con otros ligandos de activación como PVR. Entre ellos, e igual que se ha descrito para muestras de tumores primarios, el nivel de los ULBPs resultó más débil que el de MICA/B (562, 563), cuyo nivel también se vio incrementado con el cultivo en 3D para las líneas celulares HCT-116, SKCO-15 y SW620. Sin embargo, algunos estudios han observado que la localización de MICA/B es predominantemente intracelular (564). A través de vesículas, o por el proceso de *shedding*, estos ligandos pueden ser liberados por las células tumorales como mecanismo de evasión al ataque de las células NK (565). Así, algunos estudios para otros tipos de cáncer han asociado el nivel bajo de ligandos solubles con un mejor pronóstico (432). No obstante, en este trabajo no se ha evaluado el nivel de expresión intracelular o su liberación al medio.

La molécula **B7-H6** también se ha encontrado asociada a los tejidos transformados, mientras que no se ha observado expresada en tejido sano (566). De hecho, se ha relacionado con el desarrollo y progresión tumoral en varios tipos de tumores (567) y se ha valorado como una diana a la que dirigir terapias basadas en CAR (568). En este sentido, distintas publicaciones han mostrado su expresión extracelular en diversas líneas tumorales (566), y en este trabajo se detectó en todo el panel de líneas de CCR.

Por su parte, los ligandos para el receptor de co-estimulación DNAM-1 y el de co-inhibición TIGIT, se han detectado sobreexpresados en varios tipos tumorales como el CCR, y se

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

correlacionan con la progresión tumoral y un peor pronóstico (569, 570). Del mismo modo que reportaron Zhang et al., las líneas celulares de CCR presentan altos niveles de **CD155**, mientras que el nivel de **CD112** suele ser menor. No obstante, en contra a lo observado en este trabajo, identificaron una alta expresión de CD112 en la línea Colo-205 (562). Por otro lado, el cultivo en condiciones 3D supuso una disminución significativa del nivel de estos ligandos en la línea celular HCT-116 mut, apreciándose así diferencias con su homóloga *wt*.

La introducción de nuevos mAbs dirigidos frente a **checkpoints emergentes** ha convertido en un aspecto clave la caracterización de sus ligandos entre los distintos tumores. El CCR, concretamente, presenta distinto inmunofenotipo entre los 4 subgrupos moleculares (546). De hecho, los tumores CMS1 y CMS4 son los que se caracterizan por una mayor infiltración inmune. Pero son los tumores CMS1 los asociados a una respuesta Th1. En ese contexto, se han detectado linfocitos infiltrantes que expresan PD-1 y, por tanto, son susceptibles de ser tratados con los mAbs inhibidores del eje PD-1/PD-L1 (419). En este trabajo, en los cultivos en condiciones 2D, las líneas CaCo-2 y HCT-116 expresaron los mayores niveles de **PD-L1**. Estos resultados concuerdan con lo observado por Grenga et al. (571), donde la línea CaCo-2 superaba el nivel de expresión de las líneas Colo-205, HT-29 y SW620. Por otro lado, el cultivo en condiciones 3D supuso el incremento de PD-L1 en las líneas CaCo-2 y HT-29. En este sentido, algunos estudios basados en muestras de pacientes han correlacionado la expresión de PD-L1 con la infiltración linfocitaria, el estado MSI, las mutaciones en BRAF y tumores con rasgos indiferenciados (CMS1/4) (572, 573). Así, la línea HCT-116 presenta un estado MSI; y la línea HT-29 mutaciones en BRAF. Esta característica de la línea HT-29 resulta interesante ya que se escapa al patrón normal de los tumores CMS3, que cuentan con mutaciones en KRAS. No obstante, existen datos que asocian el genotipo *MSS/BRAF mut* a tumores muy agresivos y con mal pronóstico (574). Por otro lado, se ha visto que el cultivo en 3D genera cambios en la expresión de distintos genes en diversas líneas de CCR (547). Uno de estos cambios implica una mayor señalización a través de la vía MAPK. Si bien la sobreexpresión de PD-L1 está inducida por mutaciones en BRAF (575), esta mayor señalización a través de la vía MAPK en la línea HT-29 podría explicar el aumento de la expresión de PD-L1 en condiciones 3D. Sorprendentemente, la línea CaCo-2 presenta estabilidad cromosómica (*MSS*) y un fenotipo de *KRAS* y *BRAF wt*. Además, el cultivo en condiciones 3D promueve su diferenciación a un fenotipo epitelial, aunque en cultivos de más de 6 días (576, 577). Del mismo modo, ninguna de las líneas clasificadas en el grupo CMS1 expresaron altos niveles de PD-L1. No obstante, la sobreexpresión de PD-L1 en los tumores está regulada por algunos factores del microentorno, como el IFN- γ liberado por los linfocitos

infiltrantes (578, 579). Esto explicaría las diferencias en la expresión de PD-L1 encontradas en los distintos subgrupos de CCR con distinto inmunofenotipo; así como los resultados que se encontraron en los cultivos *in vitro*, en ausencia de otras poblaciones inmunes que modulen a las células tumorales. En cuanto a **PD-L2**, inicialmente las muestras de biopsias asociaron su expresión a macrófagos y DCs más que a las células tumorales. Sin embargo, también se ha encontrado en muestras tumorales de pacientes de CCR, identificando a un grupo de mal pronóstico. Además, su sobreexpresión también se ha asociado al efecto del IFN- γ (579). Por ello, no resulta extraño el perfil homogéneo que se observó en su expresión en las líneas de CCR.

Otro de los ejes propuestos en el campo de la inmunoterapia es el de LAG-3 y sus ligandos, como el HLA-II. El **HLA-II** se ha visto sobreexpresado por algunos tumores de CRC en comparación con los adenomas y la mucosa normal (580). Además, su disminución se ha asociado a escape tumoral y a un peor pronóstico (580, 581). En el estudio de Sconocchia et al. (580) también se caracterizó la expresión de HLA-II en varias líneas celulares de CCR, como HCT-116 y HT-29, que en condiciones basales no mostraron expresión del ligando. Igualmente, en nuestro trabajo, la línea SKCO-15 fue la única que expresó HLA-II. Al estudiar el mecanismo que lleva a la pérdida de HLA-II, especialmente en tumores y líneas celulares MSI, el estudio de Michel et al. identificó la presencia de mutaciones en algunos los genes que regulan su expresión (582).

Finalmente, el eje TIM-3 y sus ligandos también contribuyen a la actividad antitumoral de las células efectoras. Concretamente, **Gal-9** constituye uno de los principales ligandos de este receptor. En el CCR la expresión de Gal-9 se ha asociado a buen pronóstico (583). Sin embargo, también está relacionada con el escape al sistema inmune (584, 585), aunque el efecto que tiene sobre las células NK no está claro. De hecho, se ha encontrado que la interacción de Gal-9 con TIM-3 puede inducir la liberación de IFN- γ (586), pero también disminuir su capacidad citotóxica (587). Por otro lado, existen estudios acerca del patrón de expresión de otras galectinas (1, 3 y 8) en líneas de CCR (588), pero no acerca de Gal-9. En este trabajo se observó una tendencia hacia una mayor expresión de Gal-9 intracelular en los cultivos en 3D, aunque sólo fue significativa para la línea HT-29. Este incremento puede estar debido a una menor liberación de la molécula soluble al medio extracelular y su consiguiente acumulación en el citosol. Por su parte, el marcaje de Gal-9 como proteína de membrana resultó negativo para todas las líneas (Anexo 3).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Otro ligando para el receptor TIM-3 es **CEACAM-1**. Algunos estudios han observado que la expresión de **CEACAM-1** disminuye en el tejido tumoral de pacientes con CRC respecto a la mucosa normal (589). Además, esta proteína actúa como un regulador de la proliferación y progresión tumoral (589). De hecho, su posterior sobreexpresión está asociada a metástasis (590, 591). En este trabajo, los mayores niveles de expresión de CEACAM-1 se correspondieron con las líneas CaCo-2 y HT-29, que también se vieron incrementados con el cultivo en 3D. En el caso de la línea CaCo-2, el cultivo en 3D promueve su diferenciación hacia características epiteliales, por lo que la sobreexpresión de CEACAM-1 puede estar vinculada a este fenómeno. Sin embargo, en el caso de la línea HT-29 puede estar asociado a un fenotipo con mayor capacidad de invasión. De hecho en un estudio realizado por Luca et al. se ha demostrado que los esferoides de la línea HT-29 poseen una capacidad de invasión superior a los de las líneas Colo-205> LoVo> DLD-1> CaCo-2 (501).

También dentro de los ligandos de TIM-3, algunos tumores como el melanoma, neuroblastoma o carcinoma gástrico, han mostrado expresar **PS** en la cara externa de la membrana plasmática debido al entorno de estrés (hipoxia, ROS y acidez) (213, 592, 593). Esta expresión anómala se ha asociado a un aclaramiento defectuoso por parte de los macrófagos, así como a un efecto de inhibición de las células efectoras (213, 594). Los resultados de este trabajo mostraron una expresión homogénea entre las distintas líneas estudiadas. Por otro lado, en la literatura está descrito que la detección de PS es sensible al efecto de la tripsina utilizada para levantar las células adherentes (213). No obstante, el protocolo utilizado para levantar las células adherentes utilizadas para el marcaje de PS fue el mismo que el empleado en los ensayos de citotoxicidad, donde se observó un correcto marcaje tras la unión de la proteína Anexina-V-FITC.

En este sentido conviene puntualizar que, al igual que se ha descrito para la PS, el procedimiento de levantamiento y disgregación celular podría afectar a la detección de los demás ligandos de superficie. Para evitar que el resultado se viera afectado por el efecto de la tripsina, se monitorizó el tiempo de incubación a partir del cual se detectaba una disminución del nivel de expresión. Aunque este tiempo varió en función del ligando, se fijó un tiempo máximo de 10 min para cada incubación.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Ya al margen de los cambios fenotípicos en las células tumorales, el patrón mutacional del CCR tiene una implicación en la **sensibilidad a los tratamientos de quimioterapia**. De hecho, se ha observado que los pacientes con tumores MSI no responden al tratamiento con 5-FU (595). Y estos mismos resultados se han encontrado al analizar *in vitro* distintas líneas de CCR (541, 596). Otro de los factores que se ha evaluado en la literatura como condicionante de la respuesta a 5-FU es el estado de *p53*. Sin embargo, aunque en algunos contextos parece haber una relación entre el fenotipo mutado y una peor respuesta tal tratamiento, existe disparidad en los resultados sin haberse llegado a un consenso (597-599). Finalmente, algunos estudios con líneas celulares también han relacionado la respuesta a la exposición a largo plazo de 5-FU con el estado de *bax*, *Bcl-2* y *Bcl-x_L* (597) pero son unas condiciones que no se han evaluado en este trabajo. Por el contrario, se evaluó la sensibilidad de 5 líneas de CCR expuestas a 5-FU durante 72 h. Según este ensayo, la línea más resistente fue la DLD-1, seguida de la línea CaCo-2, HT-29, HTC-116 y SKCO-15. Tal y como se recoge en el estudio de Bracht et al., las líneas DLD-1, HT-29 y HCT-116 se corresponden con líneas resistentes al tratamiento con 5-FU; observando el mismo patrón de respuesta que en este trabajo. Por su parte, las líneas CaCo-2 y SKCO-15 no fueron evaluadas previamente (541).

Aunque en este trabajo no se evaluó la toxicidad del 5-FU en el modelo esferoide, otros estudios apoyan la hipótesis de que las condiciones de cultivo tienen un impacto en la sensibilidad a los fármacos. De hecho, desde un nivel teórico, la sensibilidad al antimetabolito 5-FU debería disminuir en condiciones 3D. En esta arquitectura disminuye la tasa de replicación y las zonas donde de división celular se restringen a las capas superficiales (548). Así, según estos estudios, mientras que la línea HCT-116 mantuvo un EC_{50} similar, las líneas HT-29, SW620 y su emparejada SW640, aumentaron la resistencia en el modelo 3D (548, 549). Además, también se describe un efecto interesante del 5-FU en la cohesión de los esferoides (549).

Por lo tanto, se ha comprobado que tanto las características moleculares asociadas a cada línea celular, como las condiciones de cultivo, generan diferencias en el fenotipo y la sensibilidad a tratamientos que pueden afectar a la eficacia de la ACT basada en células NK alogénicas activadas.

4.2 Evaluación de la sensibilidad de las líneas celulares de CCR ataque de las células NK alogénicas

4.2.1 Estudio de citotoxicidad frente a cultivos 2D

Con el objetivo de determinar la capacidad anti-tumoral de las células NK alogénicas, se realizó un primer ensayo que comparaba la actividad de las células **NK recién purificadas** o tras una activación “estándar” con la línea estimuladora R69. Se seleccionaron 3 líneas celulares diana en base a sus diferencias en el patrón de mutaciones (CaCo2, HCT-116 y HT-29) y se enfrentaron a un ratio efector:diana bajo (1:1), así como a un ratio alto (6:1). En todos los casos se analizó la muerte basal sin células NK, tal y como se indica en la Figura 4.5.

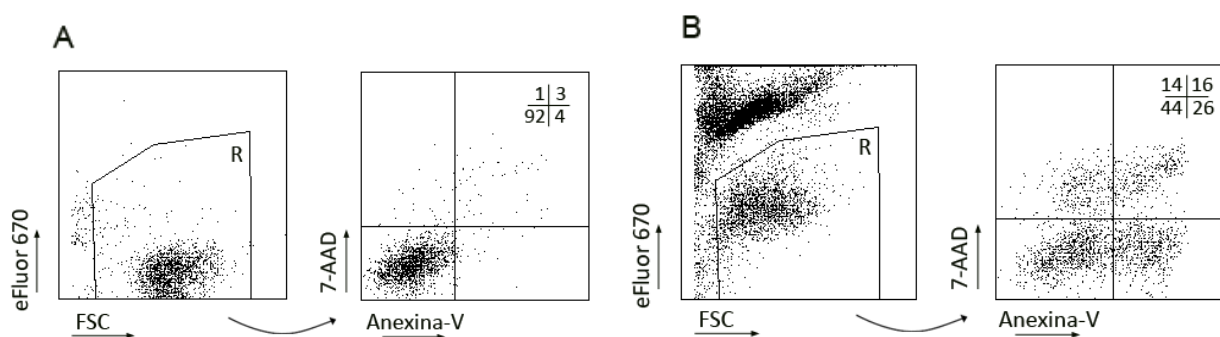


Figura 4.5 Estrategia de selección para un ensayo de citotoxicidad en 2D mediante citometría de flujo. En la figura se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis del ensayo de citotoxicidad de A) las células de CCR solas y B) enfrentadas a células NK previamente marcadas con la sonda fluorescente eFluor 670. Se seleccionó una región (R) con la población de células negativa para el marcaje de la sonda y se analizó su expresión de PS (Anexina-V-FITC⁺) y la permeabilización de la membrana plasmática (7-AAD⁺) a través de citometría de flujo.

Teniendo en cuenta los dos ratios de ensayo considerados, se observó que las células NK que no habían sido activadas no eran capaces de eliminar a las células de CCR (Figura 4.6). Sin embargo, la activación incrementó el potencial citotóxico de las células NK. Así, las células NK activadas fueron capaces de inducir la muerte de las líneas celulares de CCR, incluso a un ratio efector:diana bajo (1:1), con la que se alcanzó un 30-40% de muerte celular. Además, se observó que a un ratio efector:diana alto se alcanzaban mayores niveles de muerte celular, entorno al 50-60%.

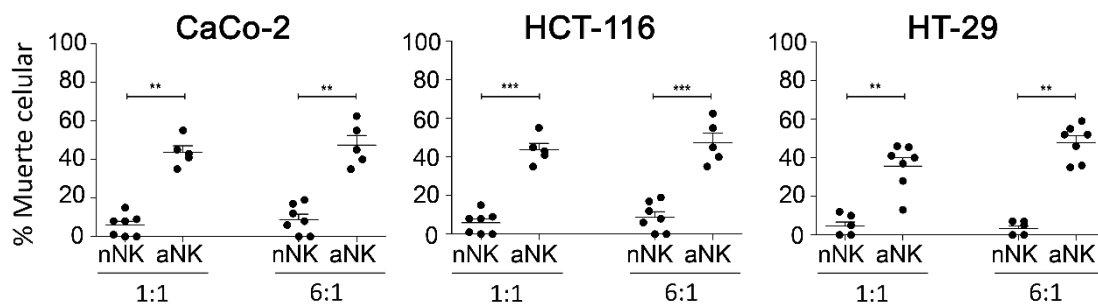


Figura 4.6 Citotoxicidad de células NK allogénicas frente a líneas celulares de CCR en 2D. Se partió de los PBMCs purificados directamente de sangre periférica, o activados mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. Se enriqueció la población de células NK recién aisladas (nNK) o activadas (aNK) a través de MACS, y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente se incubaron con las células de CCR sembradas en 2D durante 4 h, a un ratio efector:diana bajo (1:1) o alto (6:1). La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media±SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico test t de Student, donde ** p<0.01, *** p<0.001.

Posteriormente, las **células NK activadas** se enfrentaron al panel de líneas celulares de CCR a varios ratios efector:diana (0,5:1, 1:1, 3:1 y 6:1). Tras analizar la muerte en la población tumoral, se observaron **distintos patrones** en la sensibilidad (Figura 4.7). Se consideró que un porcentaje de muerte celular <20% era indicador de resistencia.

Según los resultados obtenidos, todas las líneas celulares fueron susceptibles a la actividad citotóxica de las células NK, aunque se observaron diferencias entre ellas. La línea celular **CaCo-2** mostró un perfil prácticamente plano, con un porcentaje de muerte entorno al 35%-45%. Por otro lado, la línea celular **Colo-201** mostró resistencia hasta el ratio efector:diana 3:1. Sin embargo, a partir de esta condición, la sensibilidad aumentó de forma dependiente del ratio hasta alcanza el 45% de muerte. A pesar de ser líneas celulares emparejadas, la línea celular **Colo-205** presentó un patrón distinto. En este caso se observó una buena correlación entre el porcentaje de muerte y el ratio de células NK. De este modo, mostró una mayor sensibilidad a ratios efector:diana bajos (1:1). Y a partir de esta condición, alcanzó los mismos valores de muerte que la línea celular Colo-201. Este mismo patrón se observó para las líneas celulares **SW620, LoVo, SKCO-15, HCT-116 y HT-29**. En el caso de las dos primeras, alcanzaron una muerte entorno al 50-55% al mayor ratio efector:diana considerado. Mientras, la línea celular **SKCO-15** alcanzó una muerte del 60%, y las líneas celulares HCT-116, HT-29 lo superaron. Frente a este

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

perfil, la línea celular **DLD-1** mostró porcentajes de muerte altos (>60%) desde la menor condición efector:diana considerada, alcanzando un plató en la muerte celular entorno al 80%.

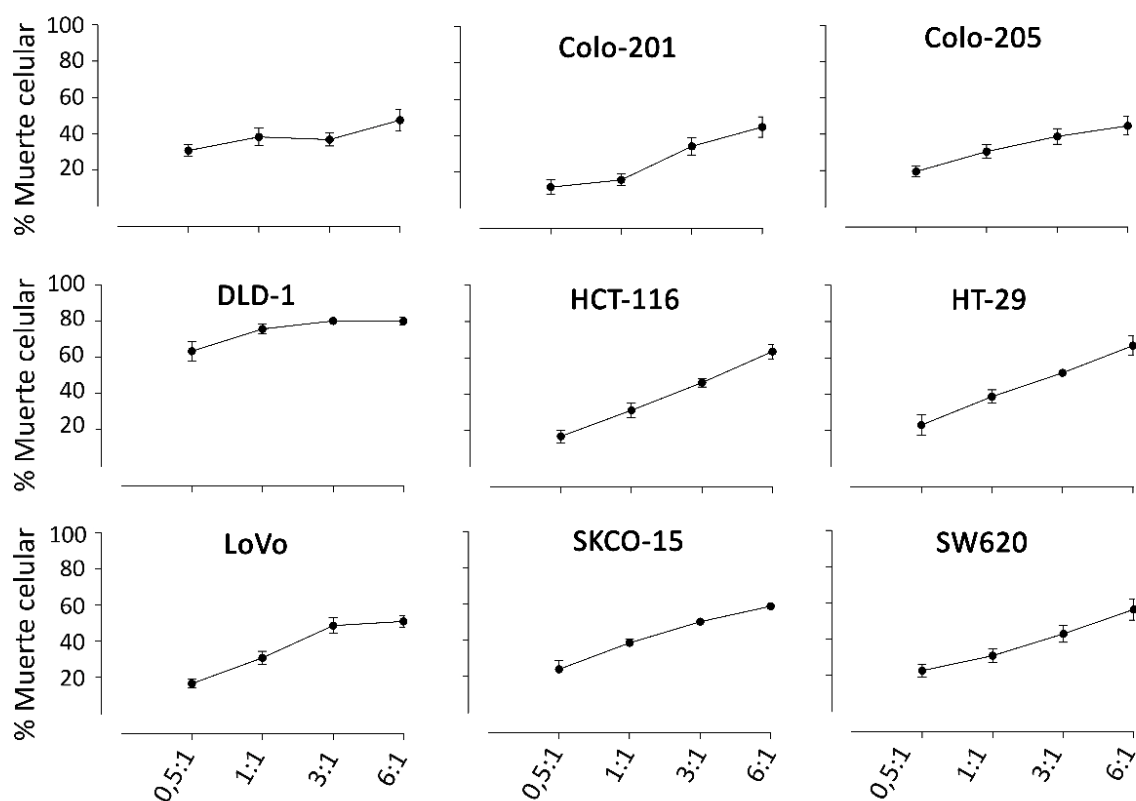


Figura 4.7 Citotoxicidad de células NK allogénicas activadas frente a líneas celulares de CCR en 2D. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. La población de células NK se enriqueció a través de MACS y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente, se incubaron con las células de CCR sembradas en 2D durante 4 h, a distintos ratios efector:diana. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media±SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

A partir de los datos anteriores, las líneas celulares de CRC se ordenaron de menor a mayor sensibilidad en base a tres criterios: el porcentaje de muerte celular medio a ratio efector:diana 1:1; el porcentaje de muerte celular medio a ratio efector:diana 6:1; o del valor EC_{50} , que representa el ratio efector:diana que induciría la muerte del 50% de las células diana del cultivo.

Se observó que las líneas celulares Colo-201 y Colo-205 eran más resistentes en todas las condiciones. Además, la línea CaCo-2 también mostró mayor resistencia a ratios efector:diana mayores de 1:1. Por otro lado, las líneas celulares DLD-1 y HT-29 resultaron las más sensibles. Mientras que SKCO-15, HCT-116, SW620 y LoVo presentaron una sensibilidad media, similar entre ellas. Aun así, las líneas celulares SKCO-15 y HCT-116 resultaron más sensibles que SW620 y LoVo en todas las condiciones (Figura 4.8)

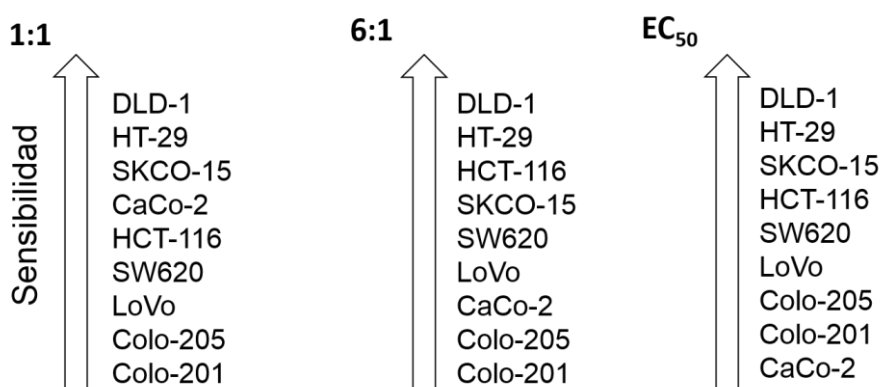


Figura 4.8 Sensibilidad de las líneas de CRC al ataque de las células NK en modelo 2D. Las células NK activadas se enfrentaron a las líneas celulares de CRC a distintos ratios efector:diana y se analizó la muerte celular por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD). Las líneas celulares se ordenaron de menor a mayor sensibilidad en base al porcentaje de muerte medio de cada una de las línea a ratio efector:diana (1:1) y (6:1) o el valor EC_{50} , calculado como el ratio efector:diana que induciría la muerte del 50% de las células diana.

4.2.2 Estudio de citotoxicidad frente a cultivos 3D

Al igual que en el cultivo 2D, la capacidad anti-tumoral de las células NK frente a esferoides de CCR se valoró utilizando **células NK recién purificadas** o tras una activación “estándar” con la línea estimuladora R69. Se estudiaron las mismas líneas celulares que en el caso anterior (CaCo2, HCT-116 y HT-29), y se enfrentaron a un ratio efector:diana bajo (1:1) o alto (6:1). Del mismo modo que en ensayo en 2D, los controles mostraron una muerte basal <15% (Figura 4.9).

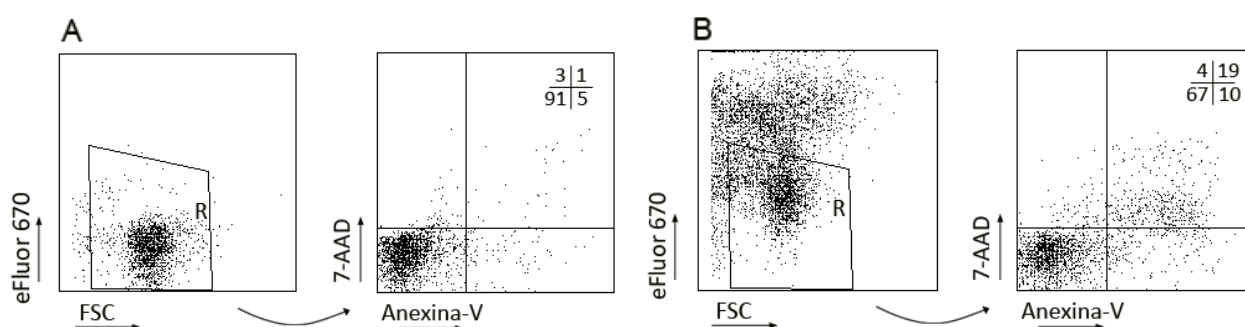


Figura 4.9 Estrategia de selección para un ensayo de citotoxicidad en 3D mediante citometría de flujo.

En la figura se muestra un ejemplo representativo de la estrategia de análisis del ensayo de citotoxicidad de A) las células de CCR solas y B) enfrentadas a células NK previamente marcadas con la sonda fluorescente eFluor 670.. Se seleccionó una región (R) con la población de células negativa para el marcaje de la sonda y se analizó su expresión de PS (Anexina-V-FITC⁺) y su permeabilización de membrana plasmática (7-AAD⁺) a través de citometría de flujo.

En este caso se observó que algunos donantes eran capaces de inducir la muerte de los esferoides de las líneas celulares CaCo-2 y HT-29 tras 48 h de co-incubación, tanto a ratio efector:diana bajo como a ratio alto; mientras que la eliminación de la línea HCT-116 requirió la activación de las células NK. Además, la activación supuso un incremento de capacidad citotóxica de las células NK frente a los esferoides de las tres líneas de CCR. A un ratio efector:diana bajo (1:1), este incremento no fue tan evidente, pero sí se observó una homogeneización en el nivel de muerte celular inducido por las células NK activadas de los distintos donantes. A un ratio efector:diana alto (6:1), los niveles de muerte celular resultaron mayores que los obtenidos con las células NK recién aisladas. Sin embargo, este incremento sólo resultó significativo frente a los esferoides de la línea celular HCT-116, probablemente debido a la dispersión de los datos (Figura 4.10).

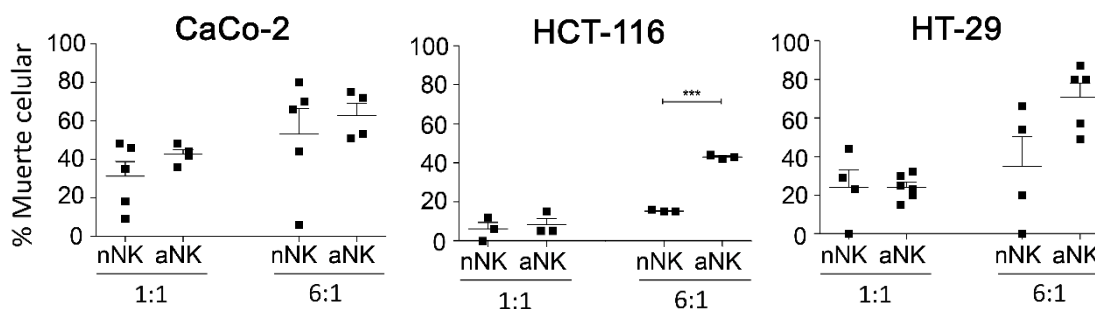


Figura 4.10 Citotoxicidad de células NK alógenas frente a líneas celulares de CCR en 3D. Se partió de los PBMCs purificados directamente de sangre periférica, o activados mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. Se enriqueció la población de células NK recién aisladas (nNK) o activadas (aNK) a través de MACS, y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente se incubaron con esferoides de las líneas celulares de CCR durante 48 h, a un ratio efector:diana bajo (1:1) o alto (6:1). La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en material y métodos. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 donantes independientes tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico test t de Student, donde *** $p < 0.001$.

A continuación, las **células NK activadas** se enfrentaron a los esferoides del panel de líneas celulares de CCR a distintos ratios efector:diana (1:1, 3:1 y 6:1), y se observaron los distintos patrones de sensibilidad al ataque de las células NK (Figura 4.11). De manera paralela a lo observado en condiciones 2D, la línea **CaCo-2** presentó un perfil de muerte bastante homogéneo entre los ratios estudiados, entorno al 40-60%. Por el contrario, el resto de las líneas celulares presentaron mayores diferencias entre ratios. Pese a ser líneas celulares emparejadas, la línea celular **Colo-201** mostró mayor resistencia a ratios bajos de células NK que la línea celular **Colo-205**. No obstante, ambas alcanzaron el 80% de muerte al ratio efector:diana 6:1. Por su parte, la línea celular **DLD-1** mostró un comportamiento similar a la línea celular **Colo-205**, alcanzando un alto porcentaje de muerte (80%) a un ratio efector:diana bajo (1:1). Sin embargo, otras líneas celulares necesitaron mayores ratios de células NK para alcanzar este nivel de muerte. Así, las líneas celulares **SCKO-15** y **SW620** llegaron al 80% de muerte a ratio efector:diana 3:1; mientras que la línea **LoVo** necesitó un ratio 6:1. Por su parte, la línea celular **HT-29** solo alcanzó el 60% de muerte; y la línea celular **HCT-116** el 40%.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

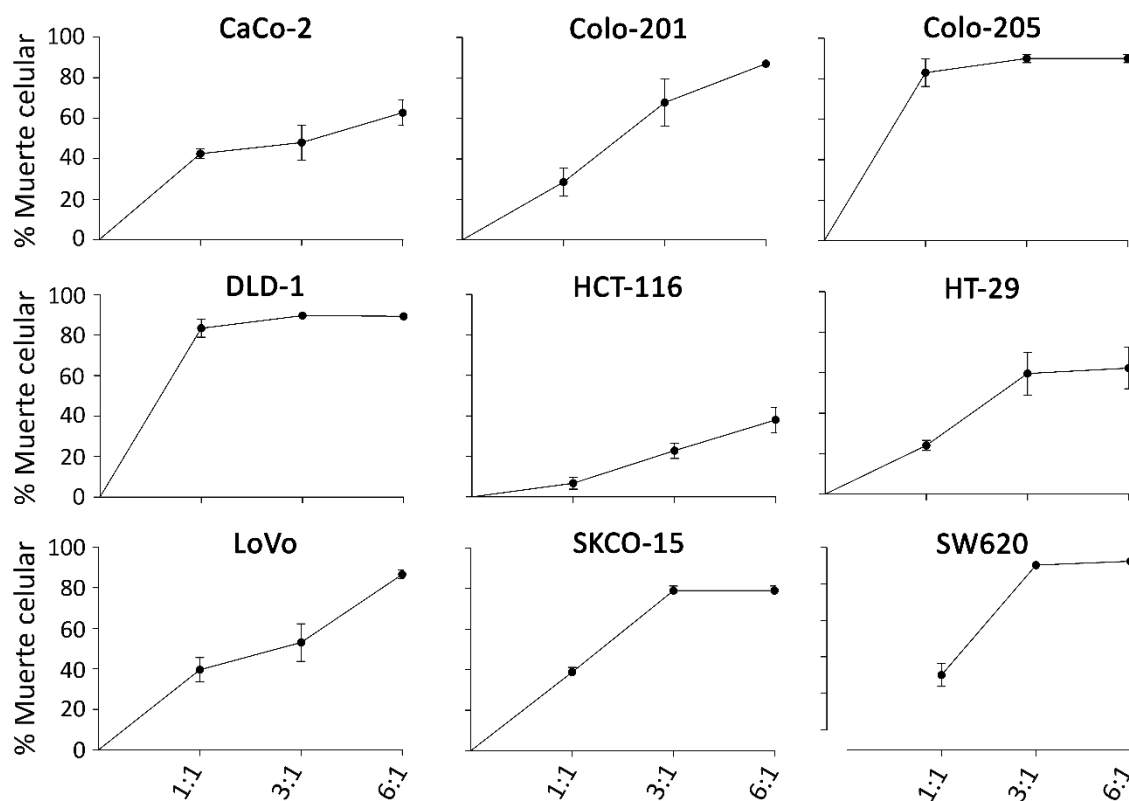


Figura 4.11 Citotoxicidad de células NK alógenicas activadas frente a líneas celulares de CCR en 3D. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. La población de células NK se enriqueció a través de MACS y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente, se incubaron con los esferoides de las células de CCR durante 48 h, a distintos ratios efector:diana. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media±SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Igual que en el modelo 2D, las líneas celulares se ordenaron de menor a mayor sensibilidad en función del porcentaje celular medio a ratio efector diana 1:1 o 6:1, y el valor EC_{50} . Se excluyeron las líneas celulares Colo-201 y Colo-205 por no llegar a formar un esferoide compacto.

En este caso se observó que las líneas celulares HCT-116 y HT-29 eran las más resistentes en todas las condiciones, frente a lo observado anteriormente en 2D. Además, tal y como se ha descrito en el modelo 2D, la línea CaCo-2 mostró mayor resistencia al considerar ratios efector:diana mayores que 1:1. Por otro lado, la línea celular DLD-1 también resultó la más sensible en este modelo. Mientras que las SW620, SKCO-15 y LoVo mostraron una sensibilidad media, similar entre ellas (Figura 4.12).

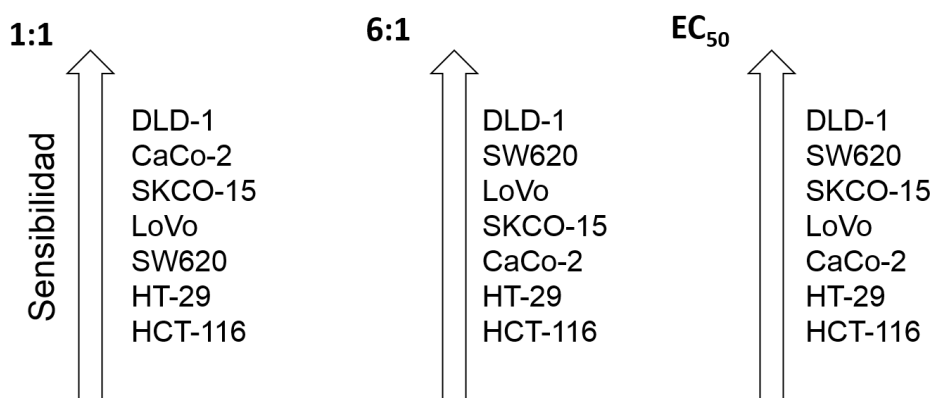


Figura 4.12 Sensibilidad de las líneas de CRC al ataque de las células NK en modelo 3D. Las células NK activadas se enfrentaron a las líneas celulares de CRC a distintos ratios efector:diana y se analizó la muerte celular por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD). Las líneas celulares se ordenaron de menor a mayor sensibilidad en base al porcentaje de muerte medio de cada una de las línea a ratio efector:diana (1:1) y (6:1) o el valor EC_{50} , calculado como el ratio efector:diana que induciría la muerte del 50% de las células diana.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

A la vista de estos resultados, la línea HCT-116 presentó especial interés por su resistencia relativa en el modelo 3D. Por ello, en colaboración con el grupo del Dr. Ignacio Ochoa, se estudió la **interacción** entre los esferoides de esta línea (transfectada con GFP) y las células NK a través de microscopía de fluorescencia (Figura 4.13). Únicamente las células NK activadas disminuyeron drásticamente el tamaño del esferoide tras 96 horas de co-cultivo, a un ratio alto efector:diana 10:1.

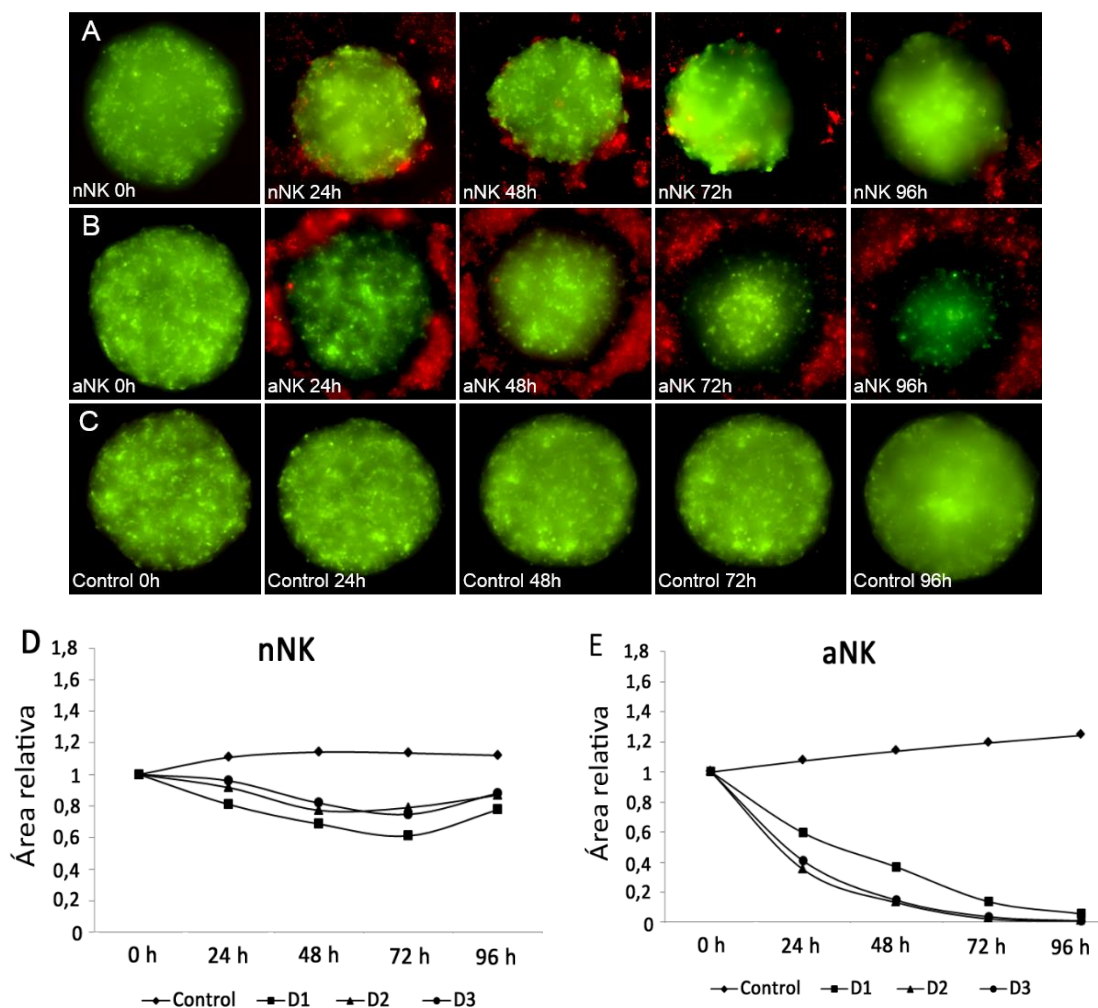


Figura 4.13 Citotoxicidad de células NK alógenas frente a esferoides de HCT-116-GFP. Se partió de los PBMCs purificados directamente de sangre periférica, o activados mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. Se enriqueció la población de células NK recién aisladas (nNK) o activadas (aNK) a través de MACS, y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente se incubaron con esferoides de la línea HCT-116-GFP durante 96 h, a un ratio efector:diana 9:1. Se monitorizó la evolución del área del esferoide mediante microscopía de fluorescencia tras diferentes tiempos. En la figura se observan los esferoides de las células HCT-116 (verdes), (A) frente a células NK (rojas) recién aisladas, (B) células NK activadas y (C) como control sin células NK. Se determinó el área relativa de cada esferoide enfrentado a (D) células NK recién aisladas o (E) activadas. Los datos representan 3 donantes independientes (D1-D3).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Se planteó entonces el estudio de distintos ratios efector:diana, de forma análoga al análisis realizado por citometría de flujo. Así, distintos esferoides individuales se enfrentaron a ratios (3:1, 6:1 y 9:1) de las células NK de un mismo donante (Figura 4.14). Como se ha explicado anteriormente, la incubación con un ratio 9:1 produjo una disminución del área relativa del esferoide en un 40-60% durante las primeras 24 horas. Además, se alcanzó la **eliminación** prácticamente completa del mismo tras 96 horas. Sin embargo, al disminuir el ratio de células NK, se observó sólo una ligera disminución del área relativa en las primeras 24-48 h, especialmente a ratio 6:1. En estas condiciones, y tras 96 h de incubación, los esferoides alcanzaron un tamaño similar al de aquellos cultivados en ausencia de células NK.

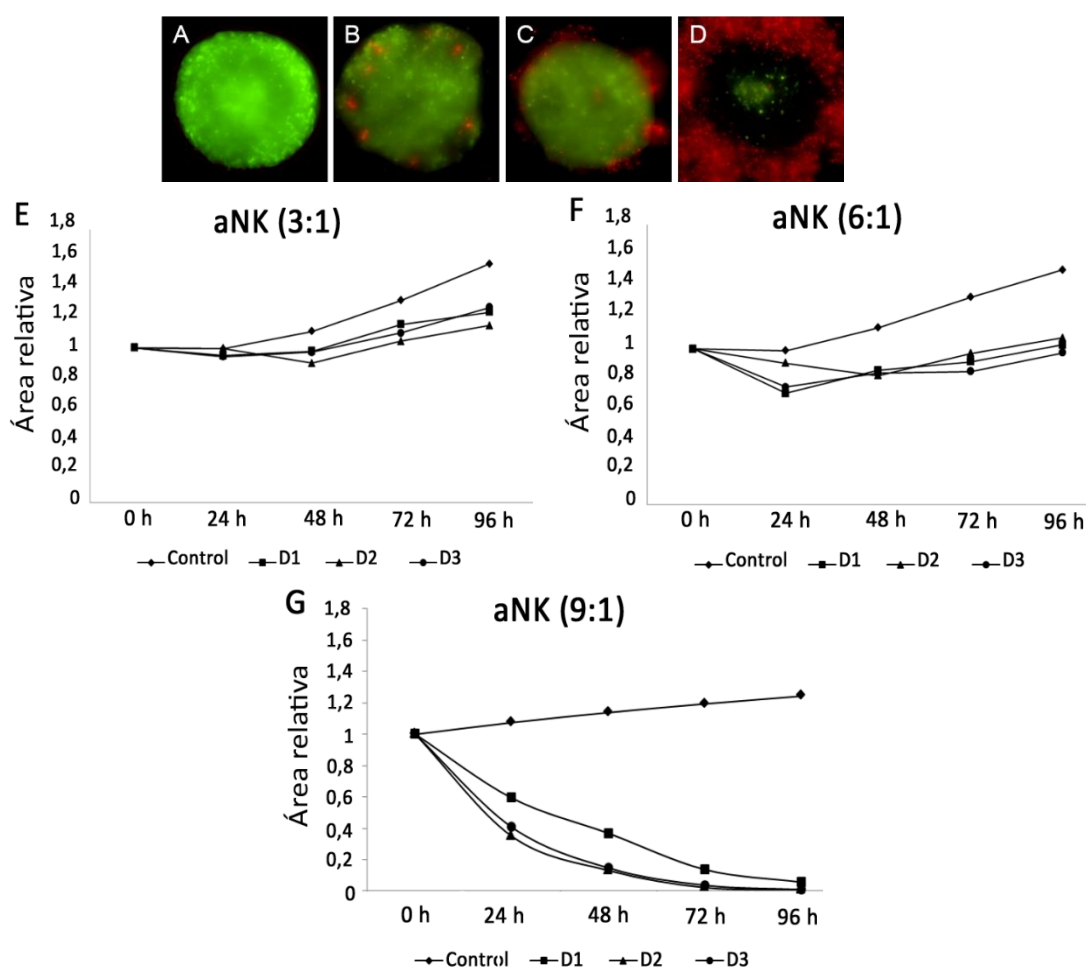


Figura 4.14 Citotoxicidad de células NK alogénicas frente a esferoides de HCT-116-GFP. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. Se enriqueció la población de células NK activadas (aNK) a través de MACS, y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente se incubaron con esferoides de la línea HCT-116-GFP durante 96 h, a distintos ratios ratios efector:diana. Se monitorizó la evolución del área del esferoide mediante microscopía de fluorescencia tras diferentes tiempos. En la figura se observan los esferoides de las células HCT-116 (verdes), (A) en ausencia de células NK (rojas), o en presencia de estas células a ratio (B) 3:1; (C) 6:1 y (D) 9:1, tras 96 h de co-incubación. Se determinó el área relativa de cada esferoide enfrentado a los respectivos ratios (D, E, F). Los datos representan 3 donantes independientes (D1-D3).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Además, en la (Figura 4.15) también se puede observar la presencia de células NK dentro del área del esferoide. No obstante, este fenómeno mostró una relación inversa al ratio efector:diana. Para estudiar la **infiltración** de las células NK, se fijaron varios esferoides a distintos tiempos del co-cultivo, con un ratio efector:diana 3:1. El análisis por microscopía confocal (Figura 4.15) reveló la presencia de células NK infiltrantes tras 24 horas. Aunque estas células también aparecieron a las 48 y 72 horas, su número fue inferior al observado a tiempos cortos. De hecho, tras las 96 h de incubación, la mayoría de las células NK se encontraron en la periferia del esferoide.

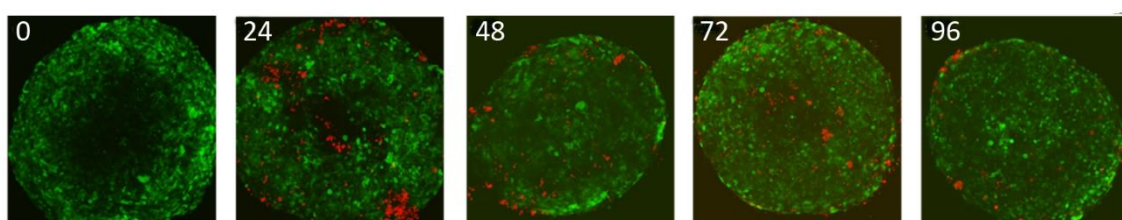


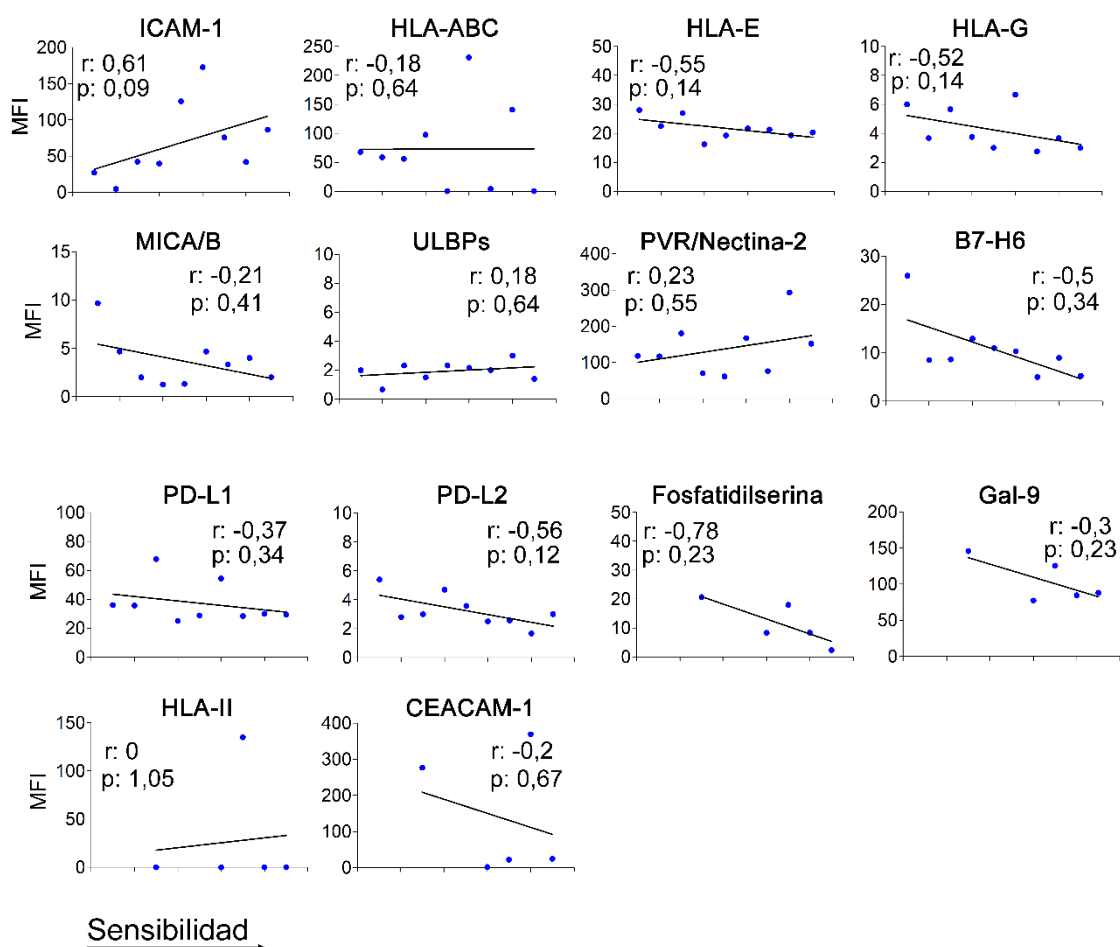
Figura 4.15 Infiltración de células NK activadas en esferoides tumorales. Las células NK activadas y marcadas con la sonda eFluor 670 se incubaron con esferoides de la línea HCT-116-GFP a un ratio bajo 3:1. Se llevó a cabo la monitorización del cultivo durante 96 h a través de microscopía confocal.

4.2.3 Co-relación entre la sensibilidad de las líneas de CCR y la expresión de ligandos

Tras haber clasificado a las líneas celulares de CCR se clasificaron en función de su sensibilidad al ataque de las células NK (Apartados 4.2.1 y 4.2.20), se estudió la **correlación** entre la sensibilidad de las líneas celulares y el nivel de expresión de **ligandos** para las células NK (Figura 4.16 A1; 4.17 B1) o la presencia de **mutaciones** características del CCR (Figura 4.16 A2; 4.17 B2). Los valores positivos del coeficiente r indicaron una correlación directa entre los parámetros; mientras que los valores negativos indicaron una correlación inversa.

Así para el **cultivo en 2D**, el incremento en la expresión ICAM-1, ULBPs y PVR/Nectina-2; o la presencia de mutaciones en MMR, KRAS o PI3K presentaron una correlación directa con la sensibilidad. Por otro lado, incremento de la expresión de HLA-E, HLA-G, MICA/B, B7-H6, PD-L1, PD-L2, PS, Gal-9 y CEACAM-1; o la presencia de mutaciones en BRAF o p53 presentaron una correlación inversa. Mientras tanto, HLA-ABC y HLA-II presentaron un nivel de correlación cercano o igual a cero. No obstante, el análisis estadístico sólo reveló una dependencia de la sensibilidad a las células NK con las mutaciones en **PI3K**.

A1



A2

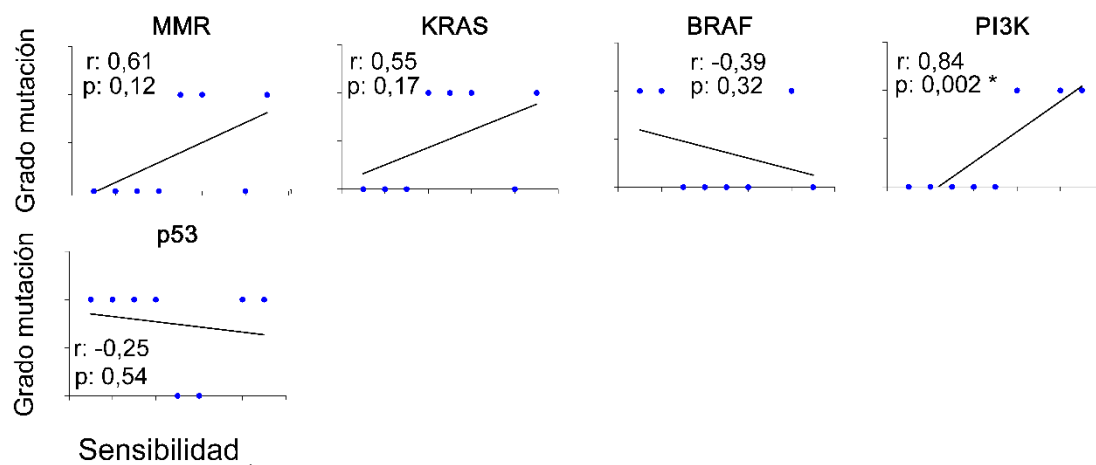


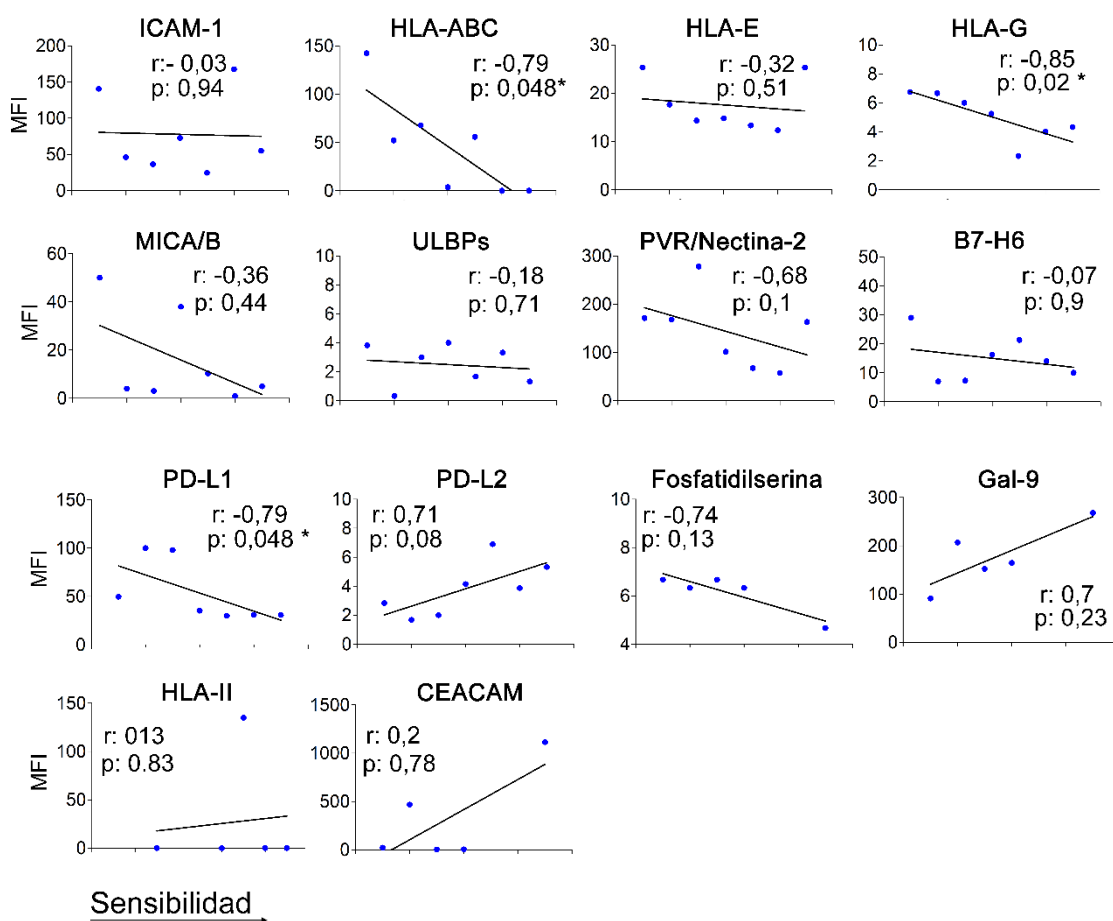
Figura 4.16A. Correlación entre la sensibilidad a las células NK y las características de las líneas de CCR en 2D. Las líneas de CCR se ordenaron en función de su sensibilidad a la citotoxicidad inducida por las células NK y se estudió su correlación con A.1) la expresión de ligandos para estas células o A.2) sus características mutacionales. Los datos indican el nivel de correlación calculado a través del coeficiente de Pearson o Sepearman, donde *p<0,05

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Por su parte, para el cultivo en 3D, el incremento en la expresión de PD-L2, Gal-9, HLA-II y CEACAM-1; o las mutaciones en MMR, KRAS o p53 presentaron una correlación directa con la sensibilidad. Por otro lado, el incremento en la expresión de HLA-ABC, HLA-E, HLA-G, MICA/B, ULBPs, PVR/Nectina-2, PD-L1 y PS; o las mutaciones en BRAF y PI3K presentaron una correlación inversa. Mientras tanto, ICAM-1 presentó un nivel cercano a cero. En este caso, el análisis estadístico reveló una dependencia de la sensibilidad a las células NK con el nivel **HLA-ABC, PD-L1 y HLA-G**.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

B1



B2

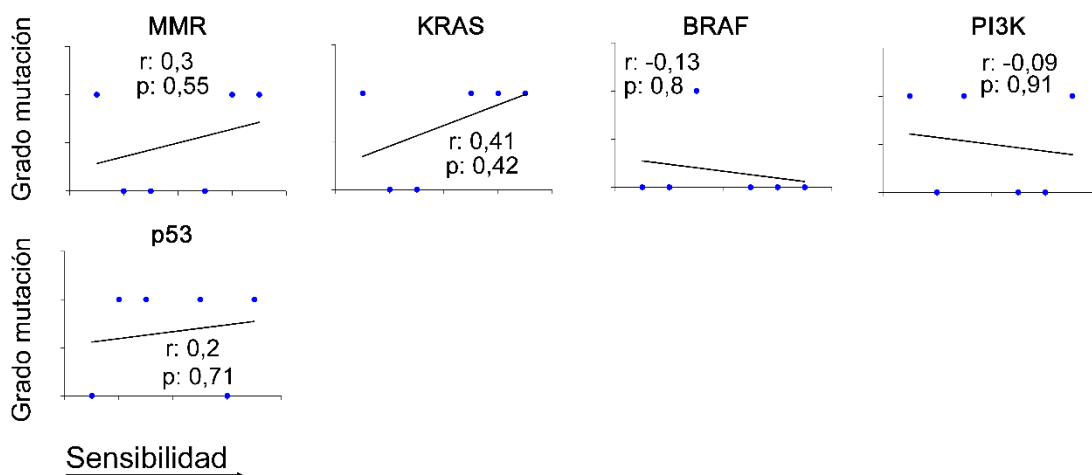


Figura 4.17B. Correlación entre la sensibilidad a las células NK y las características de las líneas de CCR en 3D. Las líneas de CCR se ordenaron en función de su sensibilidad a la citotoxicidad inducida por las células NK y se estudió su correlación con B.1) la expresión de ligandos para estas células o B.2) sus características mutacionales. Los datos indican el nivel de correlación calculado a través del coeficiente de Sepearman, donde *p<0,05.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

4.2.4 Estudio de la degranulación de las células NK

Después de comprobar las diferencias en la citotoxicidad inducida por las células NK, se quiso estudiar su posible relación con el porcentaje de **células NK activadas que degranulan** ante la presencia de las células tumorales. Se seleccionaron las líneas celulares CaCo-2, DLD-1, HCT-116, HT-29 y SKCO-15 como células diana. El análisis de la expresión del marcador lisosomal CD107a, a través de citometría de flujo, reveló porcentajes de degranulación similares frente a todas las líneas celulares (Figura 4.18). Tras restar el porcentaje de degranulación basal, se encontraron valores comprendidos entre el 35-45% de células NK con marcaje para CD107a en la membrana. A pesar de que el porcentaje de células NK activas frente a cada una de las dianas tumorales fue similar, se encontraron diferencias en el nivel de muerte celular inducida por el mismo ratio de células efector:diana que el utilizado en el ensayo de degranulación (Figura 4.18B). De hecho, la línea celular DLD-1 fue significativamente más sensible las demás líneas celulares consideradas.

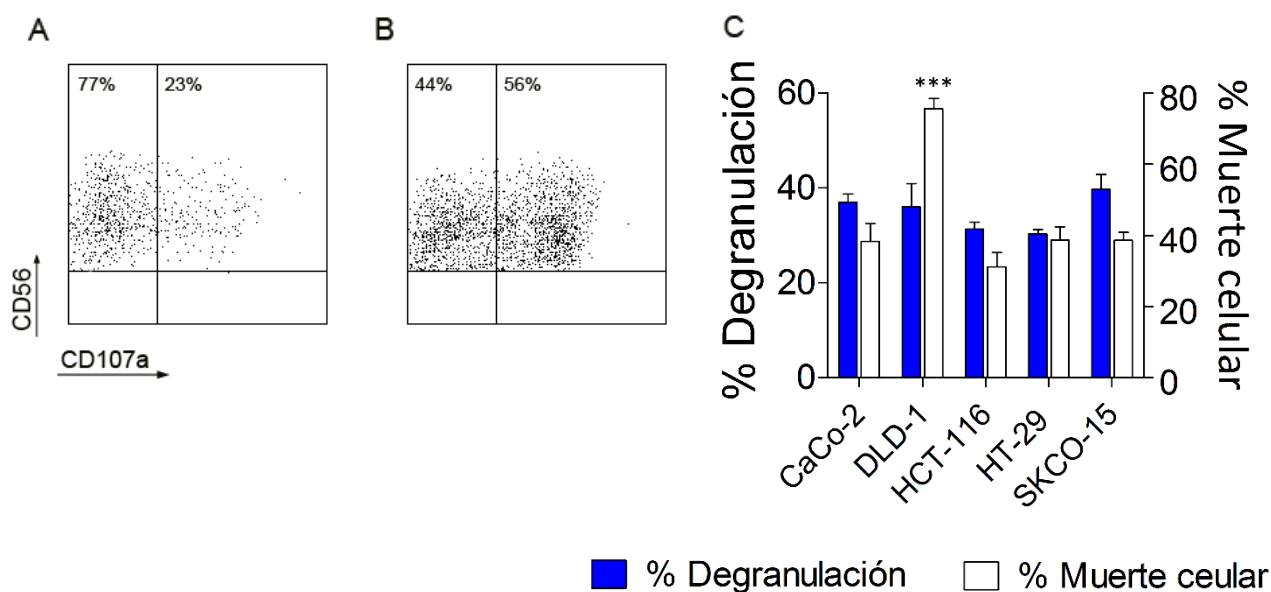


Figura 4.18 Degranulación de las células NK activadas frente a líneas celulares de CCR. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5 días. La población de células NK se enriqueció a través de MACS. Seguidamente, las células NK se incubaron A) solas, como control, o B) con las células de CCR en suspensión, durante 6 h, a un ratio efector:diana 1:1, y en presencia de monensina y el mAb anti-CD107a. La degranulación se determinó por citometría de flujo, analizando el porcentaje de células positivas para CD107a en la población CD3⁺CD56⁺, como se describe en materiales y métodos. C) Los datos representan la media±SEM de la degranulación de las células NK de al menos 3 donantes independientes, tras restar su respectiva degranulación basal (barra azul); frente a la muerte celular inducida por el mismo ratio efector:diana de células NK (barra blanca), tras restar sus respectivos controles. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de un factor en los dos ensayos evaluados.

4.2.5 Estudio de los mecanismos de muerte celular activados por las células NK

El estudio de los mecanismos de muerte celular inducida por las células NK tiene especial importancia para comprender cómo son capaces de eliminar células con resistencia a quimioterapia, o cómo los tumores pueden adquirir resistencia a su ataque.

En primer lugar se valoró el efecto de las **mutaciones** en proteínas implicadas en la **vía mitocondrial de la apoptosis**, como Bax y Bak. Para ello, se utilizaron las células HCT-116 mut, cuya sensibilidad se comparó con la de la línea wt (Figura 4.19). El ensayo en condiciones 2D no ofreció diferencias significativas en cuanto a la citotoxicidad de las células NK. Sin embargo, las células NK alogénicas activadas no fueron capaces de eliminar los esferoides de la línea HCT-116 mut.

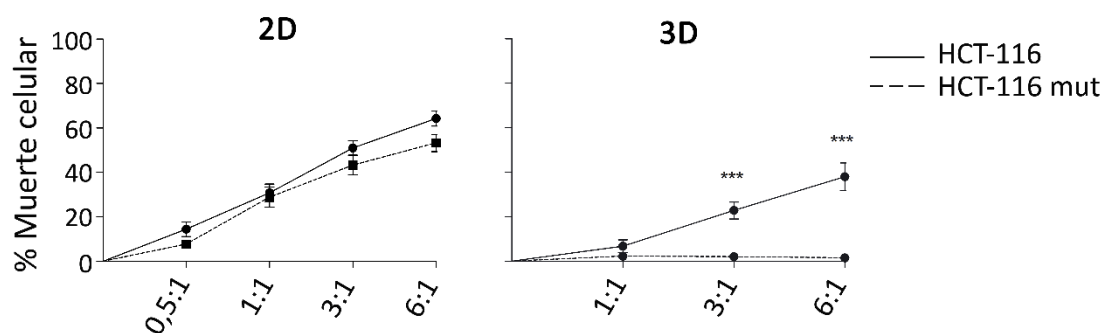


Figura 4.19 Citotoxicidad de células NK alogénicas activadas frente a células con mutaciones en la vía de la apoptosis. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5-7 días. La población de células NK se enriqueció a través de MACS y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente, las células NK se incubaron con las células HCT-116 (línea punteada) o HCT-116 mut (línea completa), durante 4 h (2D) o 48 h (3D) a distintos ratios efector:diana. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar sus respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores, donde *** $p < 0.001$.

Posteriormente, se valoró la implicación de las vías de la **apoptosis** y de la **necroptosis** en la citotoxicidad inducida por las células NK frente a cultivos convencionales de las líneas celulares modelo CaCo-2, HCT-116 y HT-29. Para ello, se añadió al co-cultivo el **inhibidor** general de caspasas Q-VD-OPh solo o combinado con el inhibidor de la RIP kinasa 1 Nec-1 (Figura 4.20). Tanto para la línea celular HCT-116, como para la línea celular HT-29, la adición de Q-VD-OPh supuso un descenso significativo de la muerte celular inducida por las células NK. La adición de Nec-1, no tuvo un efecto adicional al de Q-VD-OPh.

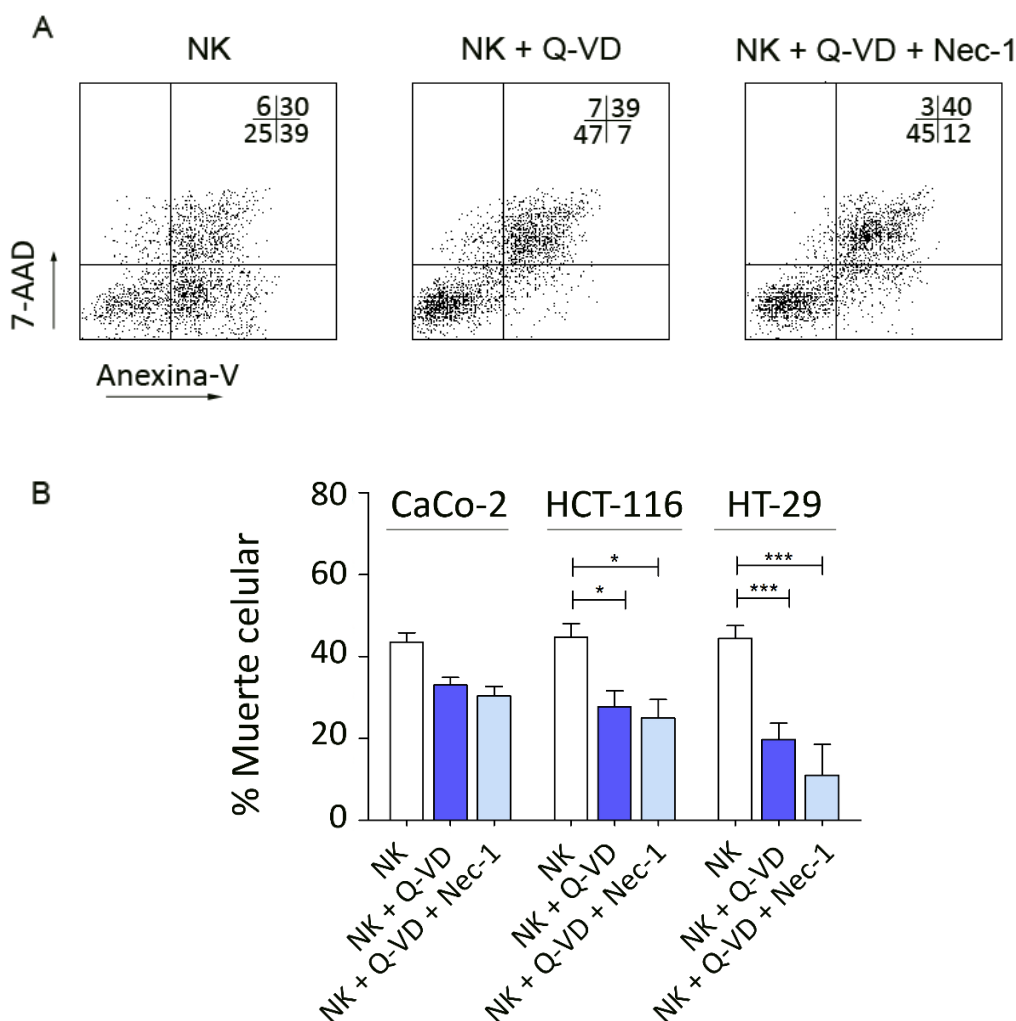


Figura 4.20 Citotoxicidad de las células NK alogénicas activadas en presencia de inhibidores de las vías de apoptosis y necroptosis. Los PBMCs se activaron mediante el co-cultivo con las células estimuladoras R69 durante 5-7 días. La población de células NK se enriqueció a través de MACS y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente, las células NK se incubaron con las células de CCR en cultivo 2D, en presencia o ausencia del inhibidor general de caspas Q-VD-OPh y el inhibidor de RIP kinasa 1 Nec-1, durante 4 h y a un ratio efector:diana 1:1. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan A) un ejemplo representativo de los parámetros de muerte celular de la línea HCT-116, en función de las distintas condiciones de estudio; B) la media \pm SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar sus respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores, donde * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

4.2.6 Discusión

La presencia de **células NK infiltrantes**, como indicador de buen pronóstico en los pacientes de CCR apoya su papel en el control de este tipo de tumores (433, 462). No obstante, se suele encontrar un bajo número de estas células, y preferentemente localizadas en la periferia de los mismos (434). Por lo tanto, se puede pensar que su actividad se ve afectada tanto por las características intrínsecas del tumor y su arquitectura, como por factores del microentorno (apartado 1.4.3).

La aplicación de una **ACT basada en células NK** también presenta **retos** relacionados con la fisiología del tumor. No obstante, se esperaba que la activación de las células NK mejorara sus capacidades funcionales, de modo que pudieran superar estas barreras. Con esta idea, se partió de ensayos que comparaban la capacidad citotóxica, tanto de **células NK aisladas directamente** del conjunto de PBMCs como de células NK activadas, frente a cultivos convencionales y en modelo 3D de líneas celulares de CRC. La citotoxicidad inducida por las células NK recién aisladas fue baja en los cultivos en 2D, independientemente del ratio efector:diana considerado. Mientras que las células NK activadas fueron capaces de inducir la muerte celular de las líneas de CCR en este modelo de manera dependiente del ratio. Por el contrario, en el modelo en 3D, las células NK recién aisladas de algunos donantes fueron capaces de inducir cierto grado de muerte celular tras las 48 horas de incubación, independientemente del ratio, en las líneas celulares CaCo-2 y HT-29. Además de a las condiciones de alogenicidad del estudio, estos resultados se pueden deber tanto al largo tiempo de incubación, como a cambios que se produjeran en las células diana en la conformación esferoide, del mismo modo que se observaron cambios en la expresión de ligandos para las células NK. Sin embargo, al comparar la citotoxicidad de las células NK recién aisladas con las de las células NK activadas, se observó una citotoxicidad mayor y más homogénea en estas últimas.

Las **células NK activadas *ex vivo***, a través de las células estimuladoras R69, ya mostraron la capacidad de eliminar células de neoplasias hematológicas en estudios previos, incluso en presencia de mutaciones que confieren resistencia a la apoptosis (195, 522). En este trabajo se evaluó su actividad citotóxica frente a un **panel de líneas celulares de CCR** con distintos estados mutacionales. Tras un análisis estadístico por ANOVA de dos vías, y la posterior interpretación de la comparación entre todas las curvas, se determinó un **perfil de sensibilidad** en el modelo 2D y otro en el modelo 3D. Para el primero de estos modelos, las líneas celulares se clasificaron de mayor a menor sensibilidad del siguiente modo: DLD-1 y HT-29 > HCT-116, SKCO-15, LoVo y

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

SW620 > Colo-205 y Colo-201, con la línea CaCo-2 variando de una mayor a una menor sensibilidad al aumentar el ratio de células efector:diana. Para la clasificación del modelo 3D se descartaron las líneas celulares Colo-201 y Colo-205, ya que no llegaron a formar un esferoide compacto. Por lo tanto, su nivel de muerte fue reflejo de la sensibilidad de cada una de ellas a una incubación durante 48 horas con las células NK activadas. Así, la sensibilidad en el modelo 3D se definió: DLD-1 > LoVo, SW620 y SKCO-15 > HT-29 y HCT-116, viéndose en la línea celular CaCo-2 el mismo patrón que el descrito en 2D. En este caso, la línea celular HCT-116 fue significativamente más resistente que las demás, evidenciando el cambio de sensibilidad en función del modelo de cultivo. Estas diferencias pueden deberse tanto al grado de compactación de cada una de las líneas celulares, como a los cambios en el perfil de ligandos para los receptores de las células NK (apartado 4.1.1). De hecho, las líneas celulares clasificadas en 3D como más resistentes (HT-29 y HCT-116) o más sensibles (DLD-1) fueron las que generaron esferoides de mayor grado de compactación. Además, como se comentará más adelante, la presencia de mutaciones en las proteínas implicadas en la vía de la apoptosis, también indujo una mayor resistencia de la línea HCT-116 mut frente a su homóloga *wt* en el modelo 3D.

En vista a los resultados anteriores, se estudió la **correlación** entre la sensibilidad de las líneas, el nivel de expresión de los **ligandos** para las células NK y el perfil de **mutaciones**. En el **modelo 2D** se observó una correlación entre el estado MSI y las mutaciones en PI3K, y la sensibilidad a las células NK. La línea HT-29, con un estado MSS, fue la única que no siguió esta correlación. Por otro lado, aunque en este modelo la correlación no llegó a ser estadísticamente significativa, otros estudios basados en experimentos bloqueo han descrito el papel de algunos de estos receptores en la citotoxicidad de las células NK. Por ejemplo, la interacción entre LFA-1 e ICAM-1 se ha visto necesaria para la correcta citotoxicidad de las células NK (600, 601). Y un estudio basado en líneas celulares de CCR observó la implicación de MICA/B, PVR y Nectina-2 en la señalización a través de los receptores de activación (562). Por su parte, en el **modelo 3D** se observó una correlación entre los bajos niveles de HLA-ABC, o la sobreexpresión de PD-L1 y HLA-G, y la sensibilidad a las células NK. El efecto de las HLA-ABC como ligando de inhibición de las células NK ha sido ampliamente descrito; igualmente algunos estudios con muestras primarias de CCR han implicado al HLA-G en la inhibición de las células NK (435). Por otro lado, el papel de PD-L1 es más controvertido. En un principio, PD-1 no parece estar implicado en la tolerancia de las células NK endógenas y, además, como se explicará más adelante (apartado 4.3.4) las células NK alogénicas activadas expresan muy bajos niveles del receptor. No obstante, tal y como se explica anteriormente y teniendo en cuenta que la citotoxicidad de las células NK depende del

balance de un conjunto de señales, la implicación de los distintos ligandos en su función debería estudiarse a través de estudios de bloqueo o sobreexpresión de éstos.

Otros estudios también han evaluado la citotoxicidad de las células NK frente a CRC. Por ejemplo, Veluchamy et al. mostraron una mayor sensibilidad de las líneas celulares CaCo-2, SW-620 y Colo-320 frente a SW-480 y HT-29. Además, la correlacionaron con la expresión de HLA-E. Las diferencias con los resultados mostrados anteriormente pueden deberse a la activación de las células NK, basada en IL-2, y la consideración únicamente del ratio efector:diana 1:1 para determinar la sensibilidad (602). Por su parte, Bhat et al. también demostraron la sensibilidad de las líneas celulares de CCR a las células NK activadas con IL-2, y de un modo dependiente de la interacción a través de los NCR (603). Mientras que Talerico et al. mostraron una mayor sensibilidad de las CSC frente a las células tumorales diferenciadas empleando células NK directamente purificadas de sangre periférica (604). En este sentido conviene señalar que estudios previos en el grupo mostraron que la actividad de las células NK depende del estímulo empleado en su activación (195, 521), por lo que las células NK de cada uno de estos ejemplos están definidas por un potencial citotóxico particular.

A partir de los resultados mostrados, la línea celular HCT-116 presentó especial interés al resultar significativamente más resistente en el modelo 3D. Por ello se estudió la **interacción** de los esferoides de esta línea celular con las células NK a través de microscopía de fluorescencia y confocal. En correlación con lo observado a través de la técnica de citometría de flujo, las células NK purificadas directamente del conjunto de PBMCs de sangre periférica no consiguieron eliminar el esferoide tras 96 horas de co-cultivo. De hecho, se apreció una ligera disminución del tamaño del mismo durante las primeras 48-72 horas, pero el esferoide fue capaz de seguir creciendo a pesar de la presión de ejercida por las células NK. Este patrón se observó también a ratios bajos efector:diana (3:1 y 6:1) de las células NK activadas. Especialmente a ratio 6:1, se observó una disminución del tamaño del esferoide durante las primeras 24 horas. Sin embargo, sólo a ratio efector:diana 9:1 las células NK pudieron controlar el crecimiento tumoral. En estas condiciones, la mayor reducción del área del esferoide también se produjo durante las primeras 24 horas y, a tiempos posteriores, las células NK acabaron por eliminar el esferoide prácticamente por completo. Así, esta técnica aportó información adicional al estudio de citometría, donde la población de células muertas se habría perdido para su análisis a las 48 horas, subestimando el porcentaje de muerte (como se describe más adelante). Por otro lado, al analizar la **infiltración** de las células NK en el esferoide se observó una relación indirecta con

el ratio efector:diana. De hecho, la mayor tasa de infiltración se observó a un ratio 3:1 y en las primeras 24 horas de ensayo. Mientras, la menor infiltración observada a un ratio efector:diana alto (9:1) se puede deber a que el proceso de destrucción del esferoide es más rápido que el fenómeno de infiltración. Estudios anteriores con las células NK activadas células R69 mostraron una sobreexpresión de los receptores de quimiocinas, que puede estar relacionada con una mayor capacidad de migración e infiltración frente a las células NK de los pacientes de cáncer (521). De hecho, estas células fueron capaces de migrar hacia esferoides de líneas celulares de CCR localizados en un dispositivo de microfluídica (525). Otros estudios también ha evaluado la infiltración de las células NK activadas en esferoides tumorales. En el trabajo de Giannattasio et al. utilizaron células NK activadas con IL-2 frente a esferoides carcinoma de cérvix, y demostraron la infiltración de un bajo porcentaje de células NK que permanecieron durante todo el tiempo de ensayo (605). Por el contrario, en este trabajo se ha descrito un proceso dinámico en la interacción entre el esferoide tumoral y las células NK. Por otro lado, en el trabajo de Ayuso et al. demostraron la capacidad de migración e infiltración de las células NK en esferoides de cáncer de mama, pero utilizando la línea celular modelo NK-92, la cual puede presentar un patrón diferente de receptores implicados en la adhesión y la migración (524).

Tras estos estudios, se analizó la correlación entre la sensibilidad de las células tumorales y su reconocimiento por las células NK, determinada a través del ensayo de degranulación. Sin embargo, a pesar de lo referenciado por otros trabajos (606), no se observó una relación entre ambos parámetros. En este caso, la explicación podría ser que las células NK que ya hubieran actuado frente a las células tumorales habrían continuado atacando en serie (607, 608), sin observarse un mayor porcentaje de células degranulando. De hecho, pese a utilizarse como marcador de citotoxicidad, la degranulación medida por CD107a únicamente indica que la célula NK ha formado una sinapsis activadora con la diana.

Una vez analizada la sensibilidad de las células de CRC al efecto de las células NK, el estudio se enfocó en los mecanismos de inducción de muerte. En este punto es necesario recordar que las células NK cuentan con la vía de la exocitosis granular y la vía de los ligandos de muerte como principales mecanismos citotóxicos. En este sentido, se ha descrito que las células NK activan distintas vías (como apoptosis, necrosis, necroptosis o autofagia) que conducen a la muerte celular en las dianas tumorales (609, 610).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

En trabajos anteriores con las células NK alogénicas activadas con las células R69, se demostró que el mecanismo de exocitosis granular era esencial en la eliminación de líneas celulares de neoplasias hematológicas (195). En este trabajo no se ha podido evaluar la implicación de otros mecanismos de muerte celular ya que no se dispone de datos suficientes. Y aunque algunos estudios hayan mostrado la sensibilidad de las líneas celulares HCT-116, HT-29 y CaCo-2 a la acción de los ligandos mortales (611), se desconoce su impacto global sobre la citotoxicidad de las células NK. Además, otros estudios han revelado una citotoxicidad dependiente de perforina en un modelo xenograft de la línea celular HT-29 (612). Sin embargo, este estudio se llevó a cabo utilizando células de distintas especies; células NK no activadas de ratones KO (del inglés, *knockout*) de perforina y la línea celular humana HT-29.

En cuanto a la vía de muerte celular inducida, al contrario que en las líneas celulares hematológicas (195), los resultados de este trabajo parecen indicar que la citotoxicidad mediada por las células NK depende de la **apoptosis**. De hecho, mutaciones en las proteínas **pro-apoptóticas Bax y Bak**, o la inhibición de las **caspasas**, disminuyeron la actividad anti-tumoral de las células NK. No obstante, esta dependencia varió en función de la línea celular y las condiciones de cultivo. Así, las mutaciones en Bax/Bak incrementaron la resistencia de la línea celular HCT-116 mut solo en el modelo 3D. Además, la adición del inhibidor general de caspasas (Q-VD-OPh) en el ensayo de citotoxicidad tuvo un efecto en la resistencia de las líneas celulares HCT-116 y HT-29, pero no de las CaCo-2. Por lo tanto, estos resultados concuerdan parcialmente con los trabajos anteriores del grupo (195). En ellos se comprobó que las células NK alogénicas activadas eran capaces de eliminar líneas celulares de leucemia con mutaciones en proteínas de la familia Bcl-2, incluso en presencia de un inhibidor de las caspasas 3 y 7 (Z-DEVD-fmk) (195). Sin embargo, los resultados de este trabajo se pueden explicar con el modelo de muerte en serie o *serial killing* observado por Prager et al. En su estudio demostraron que durante la muerte en serie inducida por células NK se producía un cambio de los mecanismos citotóxicos, de modo que empezarían matando a las células diana a través de la vía de la exocitosis granular y, tras 4 contactos, cambiarían a la vía de los ligandos de muerte (608). De este modo, la inhibición del efecto de las caspasas, que están implicadas en la vía extrínseca de la apoptosis, protegió en parte de la muerte a las líneas celulares de CCR. Por otro lado, la resistencia observada en el modelo 3D de la línea celular **HCT-116 mut**, se pudo deber a tanto a la arquitectura del tumor como a características propias de esta línea. Así, la línea celular HCT-116 representaba el modelo más resistente de CCR en 3D, por lo que la formación de una arquitectura más compleja, junto con las mutaciones en la vía de la apoptosis, pudo haber contribuir a acrecentar la resistencia.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Por otro lado, y a falta de estudios adicionales, la vía de la necroptosis parece no estar implicada en la muerte celular de las líneas celulares de CRC, ya que no se observaron cambios significativos tras su inhibición en los ensayos en 2D. No obstante, serían necesarios experimentos adicionales para comprobar que la disminución de la muerte celular no se debió a un fallo en la función de las células NK en presencia de los inhibidores. Aunque este efecto no debería ser muy pronunciado ya que dichos inhibidores sólo afectaron ligeramente a la actividad de las células NK en la línea CaCo-2.

Por último, es necesario considerar que el método utilizado para el análisis de la muerte celular por citometría de flujo, basado en la detección de PS en la cara externa de la membrana y la permeabilización de la misma, presenta limitaciones. A medida que transcurre el tiempo de ensayo, las células que han entrado en el proceso de muerte celular tienden a desaparecer como tales, convirtiéndose en restos celulares no detectables en citometría de flujo. Como resultado, se puede infraestimar el porcentaje de muerte, o incluso perderse el resultado si llega a desaparecer toda la población. Por ello es necesario optimizar las condiciones de estudio. En consecuencia, no se valoraron ratios efector:diana superiores al 6:1, donde la muerte es muy elevada. Otro factor que también influye en este sesgo es el tiempo de ensayo. Para este trabajo, el condicionante del tiempo fue especialmente relevante en los ensayos a 48 horas del modelo 3D. En estas condiciones, y a ratio efector:diana alto, se observó frecuentemente la desaparición de la población diana. No obstante, la interpretación de los resultados del modelo 3D requirió especial cuidado. Se observó que en los ensayos realizados a tiempos largos, la población diana era capaz de captar la sonda de marcaje de las células NK, de manera proporcional al ratio efector:diana. Este fenómeno se atribuyó esencialmente al proceso de trogocitosis durante interacción de ambas poblaciones celulares (613), ya que en los casos en que las células NK no indujeron la muerte de las dianas tumorales tampoco se observó un incremento de la fluorescencia de éstas. Para futuros estudios se han considerado otros métodos de detección de la muerte celular; por ejemplo, a través de la liberación de LDH (614) o europio (615) o incluso técnicas de microscopía y bioimpedancia (616). No obstante, estas técnicas tendrán que demostrar ser válidas para las condiciones de cultivo 2D y 3D, así como para los largos tiempos de ensayo.

4.3 Evaluación de protocolos de activación y expansión de las células NK alogénicas

4.3.1 Identificación del mejor protocolo de expansión

La aplicación de un ACT basada en células NK alogénicas activadas requiere la obtención de un **número de células NK** suficiente para la administración a un paciente. Por ello, se estudiaron distintos protocolos de **expansión** en un conjunto de donantes sanos (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Esquema de los protocolos de expansión ensayados en un banco de donantes sanos

	IL-2	IL-2 + IL-15	R69	R69 + IL-2	R69 + IL-2 + IL-15	721.221	721.221 + IL-2 + IL-15
Donante 01	•	•	•	•	•		
Donante 02	•	•	•	•	•		
Donante 03			•	•	•		
Donante 04			•	•	•		
Donante 05			•	•	•		
Donante 06			•	•	•	•	
Donante 07			•	•	•	•	
Donante 08			•	•	•	•	
Donante 09			•	•	•		•
Donante 10			•	•	•		•
Donante 11			•	•	•		•
Donante 12					•		•
Donante 13					•		•
Donante 14					•		•
Donante 15			•	•	•		•
Donante 16			•	•	•		•

Los cultivos se mantuvieron durante 21 días y, semanalmente, se determinó el número total, la tasa de expansión y el porcentaje de células NK en el cultivo (Figura 4.21).

Se observó que la estimulación únicamente con **ILs** no era capaz de sostener la expansión de las células NK, deteniéndose el cultivo a día 14 (Figura 4.21A). Por otro lado, el empleo **de células estimuladoras LCL-EBV⁺** (R69 o 721.221) solas mejoró los resultados frente a la estimulación con ILs. En este caso, con las dos LCL-EBV⁺, el mayor porcentaje de células NK en cultivo se observó a día 14 de ensayo (Figura 4.21B). Además, las células 721.221 proporcionaron un enriquecimiento significativamente superior. Sin embargo, a partir de día 14, el porcentaje de células NK disminuyó hasta unos valores similares a los iniciales. Así, mientras que las células estimuladoras R69 pudieron mantener los 21 de cultivo, con una tasa media de expansión 20 (± 5) veces, las células NK activadas con las células 721.221 empezaron a morir a partir de día 14.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Finalmente, la expansión con **células estimuladoras en combinación con ILs** ofreció los mejores resultados (Figura 4.21C). Con las células R69 en combinación con ILs, la evolución del porcentaje de células NK en cultivo fue similar al descrito anteriormente con las células solas. Sin embargo, la combinación de las células 721.221 con ILs fue capaz de proporcionar mayores porcentajes de células NK, y de manera sostenida el tiempo. Por otro lado, el mayor incremento (en número) tuvo lugar durante la última semana de ensayo, con los tres estímulos. Se encontraron tasas de expansión similares para las condiciones R69 + IL-2 y R69 + IL-2 + IL-15, con valores de 115 (± 36) veces y 123 (± 32) veces respectivamente. En el caso de la estimulación con 721.221 + IL-2 + IL-015 se alcanzó una tasa media de 143(± 43) veces.

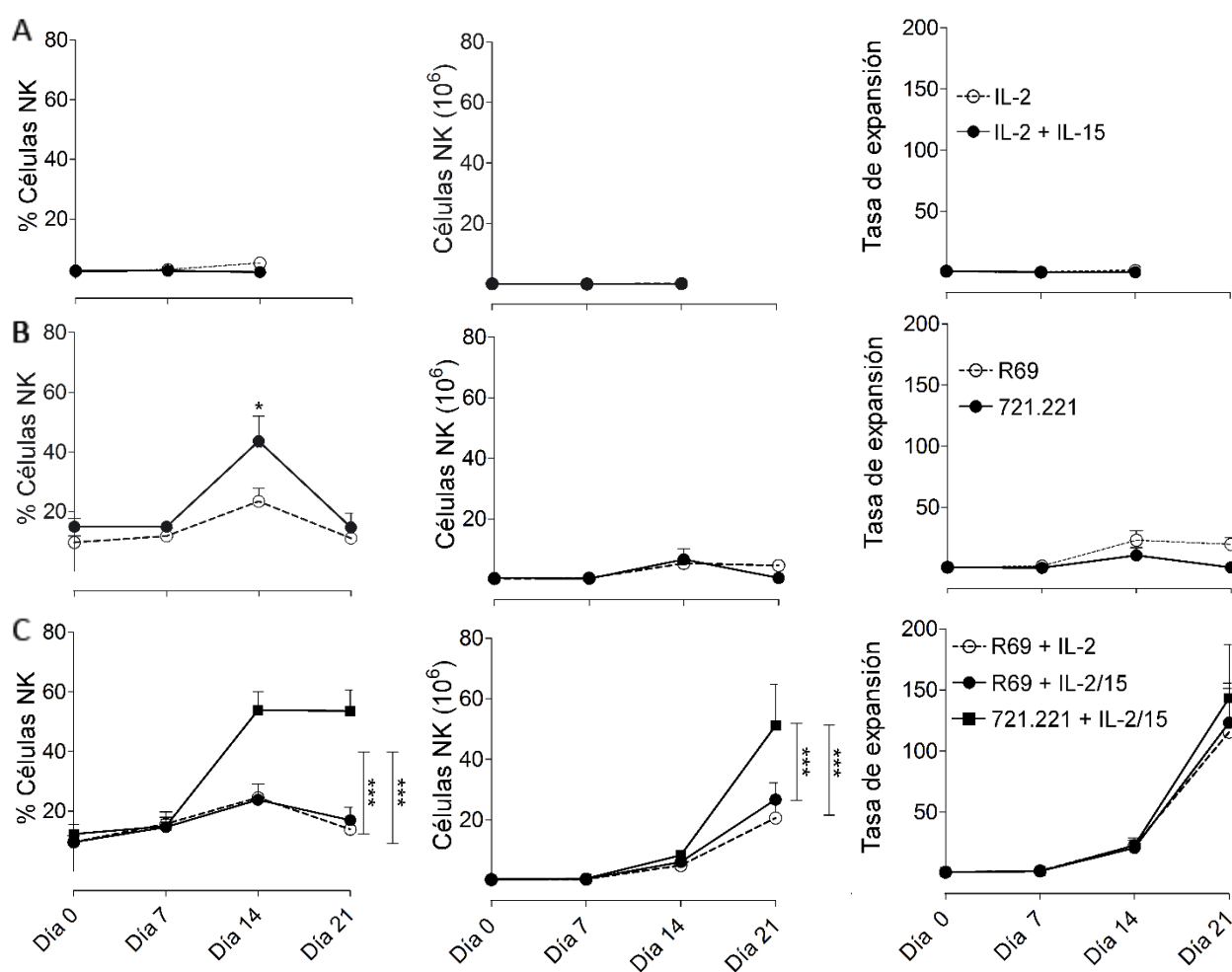


Figura 4.21 Evaluación de la expansión de las células NK alogénicas. Los PBMCs se activaron mediante distintos estímulos durante 21 días. Se partió de un total de 3×10^6 de células, que se mantuvieron 7 días en cultivo antes de comenzar las reactivaciones. Cada 2-3 días se renovaron tanto el medio como los estímulos y se ajustó la densidad celular. A distintos tiempos de expansión (0, 7, 14 y 21 días) se determinó el porcentaje de células $CD3^+CD56^+$ a través de citometría de flujo, tal y como se explica en materiales y métodos. Se calcularon el número total de células NK y la tasa de expansión. Los datos representan la media \pm SEM de 2-16 donantes. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores.

4.3.2 Caracterización de las células NK expandidas

4.3.2.1 Análisis del fenotipo de las células NK expandidas

Las células NK de sangre periférica agrupan a un conjunto de **subpoblaciones** con distintas características en sus marcadores superficiales. La clasificación más común diferencia dos subpoblaciones definidas por la expresión de CD56^{dim}/CD16^{bright} o CD56^{bright}/CD16^{dim}. La primera de ellas, con un perfil más citotóxico que la segunda, es la predominante en sangre periférica. A partir de las expansiones descritas anteriormente (apartado 4.3.1), se analizó la evolución de estas poblaciones en el cultivo.

Los datos obtenidos para la activación basada en ILs no se analizaron estadísticamente debido al bajo número de muestra. Aún así, se observó un enriquecimiento en la población CD56^{bright} y una pérdida de CD16 (Figura 4.22A). Para los demás estímulos, también se observó un enriquecimiento en una población **CD56^{bright}** desde la primera semana de expansión (Figura 4.22A). Con las combinaciones R69 + IL-2 y 721.221 + IL-2 + IL-15 este enriquecimiento fue progresivo con los días de cultivo. De hecho, este último estímulo proporcionó el mayor porcentaje de células CD56^{bright} tras los 21 días de ensayo, con diferencias significativas frente a la expansión con las células R69 solas o en combinación con IL-2 + IL-15. Por el contrario, la población **CD16^{bright}** disminuyó significativamente en la primera semana de cultivo en todas las expansiones, excepto con la línea estimuladora 721.221 sola (Figura 4.22A). Sin embargo, esta disminución dejó de ser significativa, respecto a día 0, en el transcurso de la expansión, exceptuando la activación con R69 + IL-2. Analizando conjuntamente la evolución del perfil de CD56 y CD16, se observó la aparición de una población de células NK con una **alta expresión de ambos** marcadores tras la expansión (Figura 4.22B).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

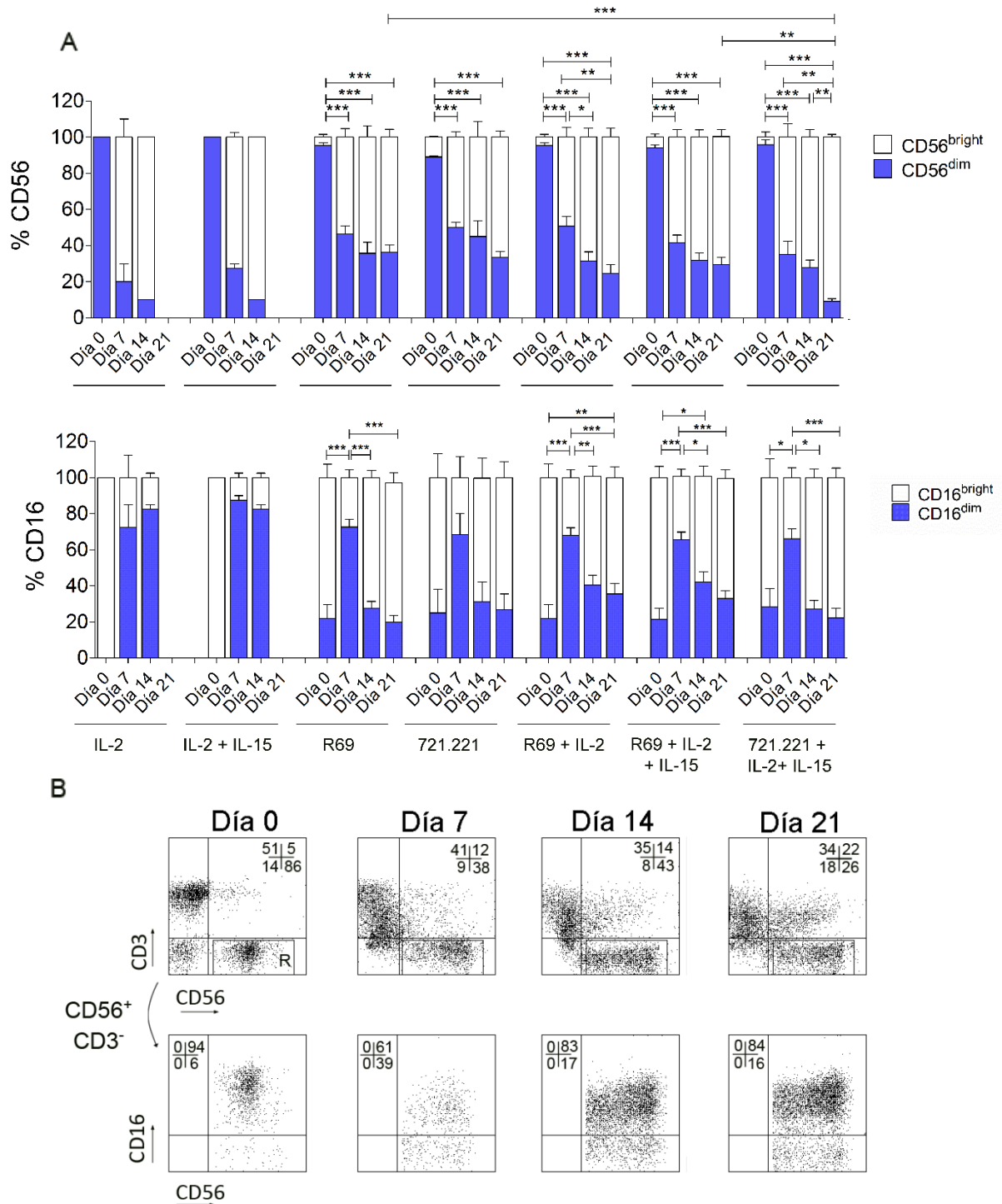


Figura 4.22 Evaluación de la expresión de CD56 y CD16 en las células NK alógenas durante su expansión. Los PBMCs se activaron mediante distintos estímulos durante 21 días. Tras 7 días en cultivo se comenzaron las reactivaciones. Cada 2-3 días se renovaron tanto el medio como los estímulos y se ajustó la densidad celular. A distintos tiempos de expansión (0, 7, 14 y 21 días) se analizó la expresión de CD3, CD56 y CD16 mediante citometría de flujo, tal y como se explica en materiales y métodos. En la figura se muestra A) la evolución de los marcadores CD56 y CD16 para cada estímulo a lo largo del tiempo de expansión; B) el análisis de un donante representativo activado con R69 + IL-2 + IL-15. Los datos representan la media \pm SEM de al menos 3 donantes. Los números en la esquina superior muestran el porcentaje de células correspondiente a cada cuadrante del diagrama. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.2.2 Análisis de la citotoxicidad de las células NK expandidas

La expansión de las células NK puede implicar no sólo cambios en su fenotipo, sino también en su capacidad funcional. Por ello se estudió la **citotoxicidad** de las células NK a lo largo de los 21 días de cultivo. El ensayo se realizó con las células NK activadas con los estímulos que eran capaces de mantener su crecimiento y viabilidad (R69, R69 + IL2, R69 + IL-2 + IL-15 y 721.221 + IL-2 + IL-15), y se utilizó como diana la línea celular modelo HCT-116.

Se observó que no existían cambios significativos derivados de la expansión de las células NK a lo largo del cultivo para ninguna de las condiciones estudiadas (Figura 4.23).

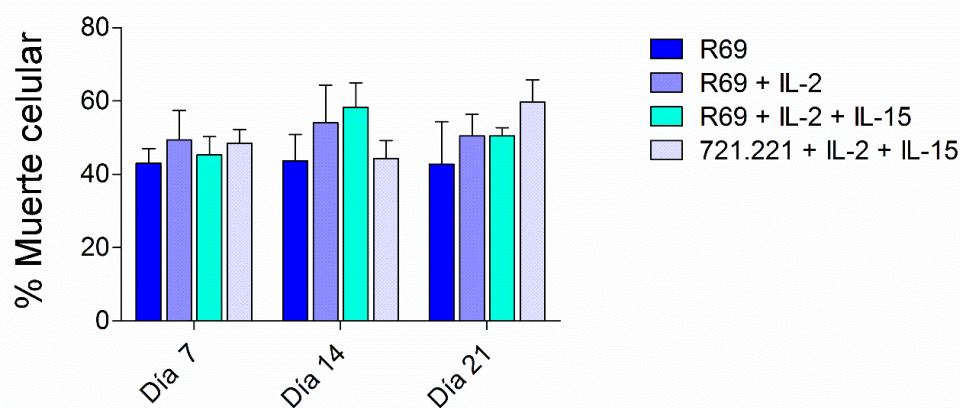


Figura 4.23 Evaluación de la citotoxicidad de las células NK expandidas frente a la línea celular HCT-116. Los PBMCs se activaron con distintos estímulos durante 21 días. A distintos tiempos de expansión (días 7, 14 y 21) la población de células NK se enriqueció a través de MACS, y se enfrentó a la línea celular HCT-116 sembrada en 2D durante 4 h, a un ratio efector:diana 3:1. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD), como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media±SEM de al menos 4 donantes independientes, tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico test ANOVA de dos factores.

A partir de estos resultados, y dada la experiencia previa en la activación de células NK con las células estimuladoras R69, se seleccionó el protocolo basado en la combinación de R69 + IL-2 + IL-15 para llevar a cabo las expansiones de los siguientes ensayos.

4.3.3 Evaluación de la expansión de células NK en ausencia de linfocitos T

Los protocolos de expansión aplicados en clínica requieren la obtención de una alta pureza de las células NK para su transferencia. Por ello, muchos de estos protocolos parten de la purificación de esta población antes de su expansión. Así, una vez seleccionado el mejor protocolo de expansión, se evaluó la posibilidad de eliminar la población de linfocitos T (CD3⁺) para incrementar la pureza de células NK al inicio del cultivo. Se analizaron los parámetros descritos previamente: número total, tasa de expansión y porcentaje de células NK; así como su fenotipo y capacidad citotóxica.

En primer lugar, se observó que la **tasa de expansión** de células NK era inferior en los cultivos en ausencia de linfocitos CD3⁺ (Figura 4.24A). Y aunque se encontró un patrón similar al que se ha descrito previamente, con un crecimiento exponencial a partir de día 14, la viabilidad celular de los cultivos sin linfocitos T, en el análisis a día 7, resultó altamente comprometida. Por otro lado, el **porcentaje de células NK** en estos cultivos fue superior a lo largo del ensayo (Figura 4.24A). De este modo, se obtuvieron porcentajes finales entorno al 60-80%, frente al 10-15% de los cultivos con linfocitos T. El perfil de evolución de este porcentaje de células NK también varió en función de las condiciones estudiadas. Se repitió el perfil observado anteriormente en los cultivos en presencia de linfocitos T, con un máximo a día 14 de expansión. Por el contrario, en ausencia de linfocitos T el porcentaje se vio incrementado gradualmente. No obstante, a pesar de las diferencias encontradas en los parámetros de tasa de expansión y porcentaje de células NK, se comprobó que el **número total de células NK acumuladas** en la expansión era muy similar a pesar de las diferentes condiciones, alrededor de 30×10^6 para el primer donante y de 105×10^6 para el segundo (Figura 4.24B).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

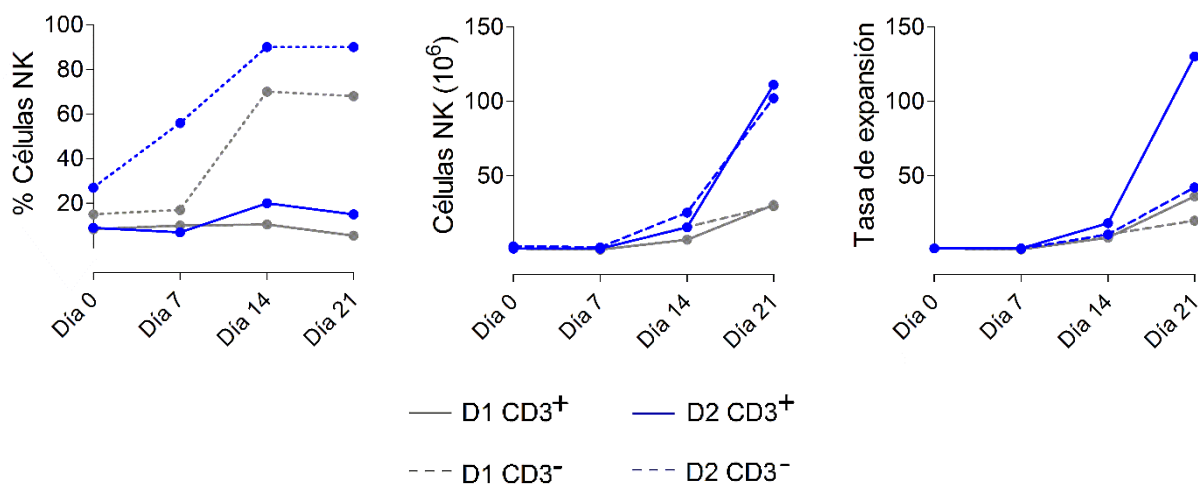


Figura 4.24. Evaluación de la expansión de las células NK en ausencia de linfocitos T. Los PBMCs se activaron mediante la combinación de R69 + IL-2 + IL-15, en presencia o ausencia de linfocitos T, durante 21 días. Se partió de un total de 10×10^6 de células, que se mantuvieron 7 días en cultivo antes de comenzar las reactivaciones. Cada 2-3 días se renovaron tanto el medio como los estímulos y se ajustó la densidad celular. A distintos tiempos de expansión (0, 7, 14 y 21 días) se determinó el porcentaje de células CD3⁻ CD56⁺ mediante citometría de flujo, tal y como se explica en materiales y métodos. Se determinó el número total de células NK, a cada tiempo de ensayo; el enriquecimiento en el cultivo (porcentaje); y la tasa de expansión, calculada a partir de los parámetros anteriores. Los datos representan dos donantes individuales (D1, D2).

A continuación, se determinó el **fenotipo** de las células NK expandidas. Del mismo modo que se ha descrito anteriormente, se encontró un enriquecimiento de la población CD56^{bright} y CD16^{bright} (Figura 4.25). No obstante, hay que señalar que, en este análisis, el porcentaje de población CD56^{bright}/CD16^{dim} de origen fue superior al encontrado en las expansiones anteriores (apartado 4.3.2.1).

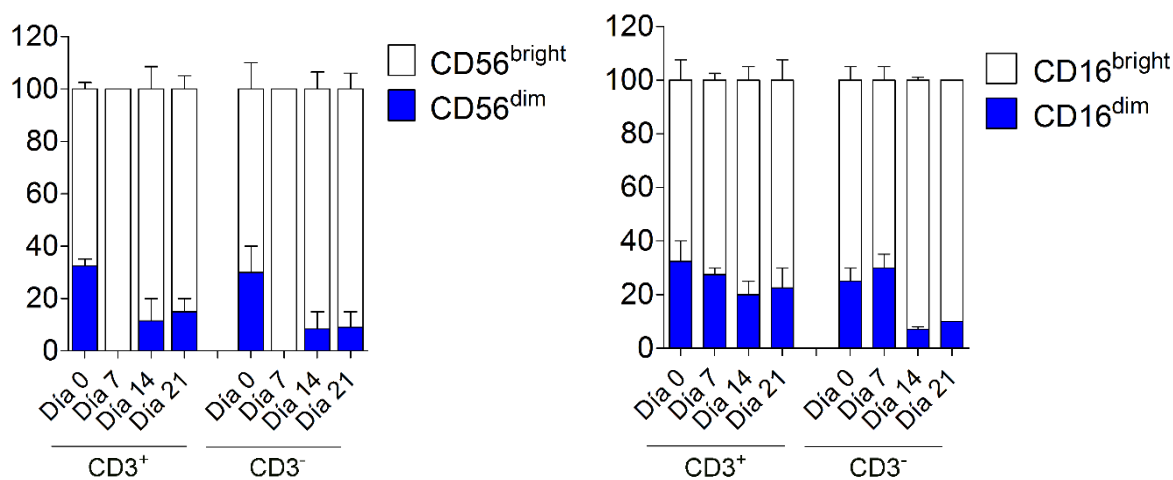


Figura 4.25 Evaluación de la expresión de CD56 y CD16 en las células NK alogénicas durante su expansión en ausencia de linfocitos T. Los PBMCs se activaron mediante la combinación de R69 + IL-2 +

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

IL-15, en presencia o ausencia de linfocitos T, durante 21 días. Tras 7 días en cultivo se comenzaron las reactivaciones. Cada 2-3 días se renovaron tanto el medio como los estímulos y se ajustó la densidad celular. A distintos tiempos de expansión (0, 7, 14 y 21 días) se analizó la expresión de CD3, CD56 y CD16 a través de citometría de flujo, tal y como se explica en materiales y métodos. En la figura se muestra la evolución de los marcadores CD56 y CD16 para cada estímulo a lo largo del tiempo de expansión.

Finalmente, se valoró la **capacidad citotóxica** de las células NK expandidas en ausencia de linfocitos T. Debido a la baja viabilidad celular de los cultivos en ausencia de linfocitos T a día 7, el ensayo de citotoxicidad sólo llevó a cabo a día 14 y día 21. Se observó que el cultivo en ausencia de linfocitos T no afectaba a la funcionalidad de las células NK expandidas (Figura 4.26)

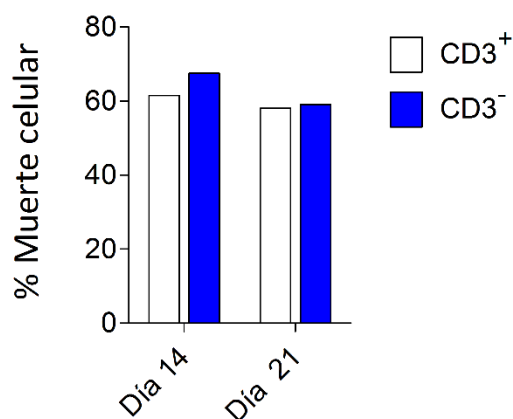


Figura 4.26 Evaluación de la citotoxicidad de las células NK expandidas en ausencia de linfocitos T. Los PBMCs se activaron mediante la combinación de R69 + IL-2 + IL-15, en presencia o ausencia de linfocitos T, durante 21 días. A distintos tiempos de expansión (días 14 y 21) la población de células NK se enriqueció a través de MACS, y se enfrentó a la línea celular HCT-116 sembrada en 2D durante 4 h, a un ratio efector:diana 3:1. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD), como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media±SEM de 2 donantes independientes, tras restar los respectivos controles de muerte celular sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%.

4.3.4 Evaluación de la expresión de receptores en las células NK expandidas

La activación de las células NK implica cambios en el patrón de expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo, la interacción celular, o los mecanismos efectores, entre otros. Además, en las condiciones de expansión, la presencia de un estímulo permanente también puede alterar esta expresión a lo largo del tiempo. Para estudiar cómo afectan la activación y expansión de las células NK en su función anti-tumoral, se analizó la expresión de varios **receptores de superficie**. Entre ellos, receptores de quimiocinas implicados en la migración hacia el tumor (CXCR3) y *checkpoints* convencionales de activación (NKp44) o inhibición (NKG2A) (Figura 4.27); así como *checkpoints* emergentes (CTLA-4, PD-1 TIM-3 y LAG-3) (Figura 4.28). Se compararon los estímulos basados en las células estimuladoras R69 solas o en la combinación R69 + IL-2 + IL-15.

El receptor de inhibición **NKG2A** presentó un nivel de expresión basal bajo en alrededor de un 40% de las células NK recién aisladas. Tras la activación, prácticamente todas las células NK expresaron el receptor. Además, su nivel de expresión también se vio incrementado hasta 10 veces tanto en la activación con R69 como con R69 + IL-2 + IL-15.

Por otro lado, el receptor de activación **NKp44** no fue observado en las células NK recién aisladas, pero sí en las activadas. No obstante, un porcentaje variable de estas células NK activadas (10-40%) no expresaron NKp44. En este caso, su nivel de expresión se vio incrementado gradualmente con el tiempo de expansión, sin encontrarse diferencias entre los estímulos.

Finalmente, el receptor de quimiocinas **CXCR3** mostró un nivel de expresión basal bajo en las células NK recién aisladas. La activación, en cualquiera de las condiciones estudiadas, supuso un incremento significativo en su expresión, sin encontrarse diferencias entre los estímulos.

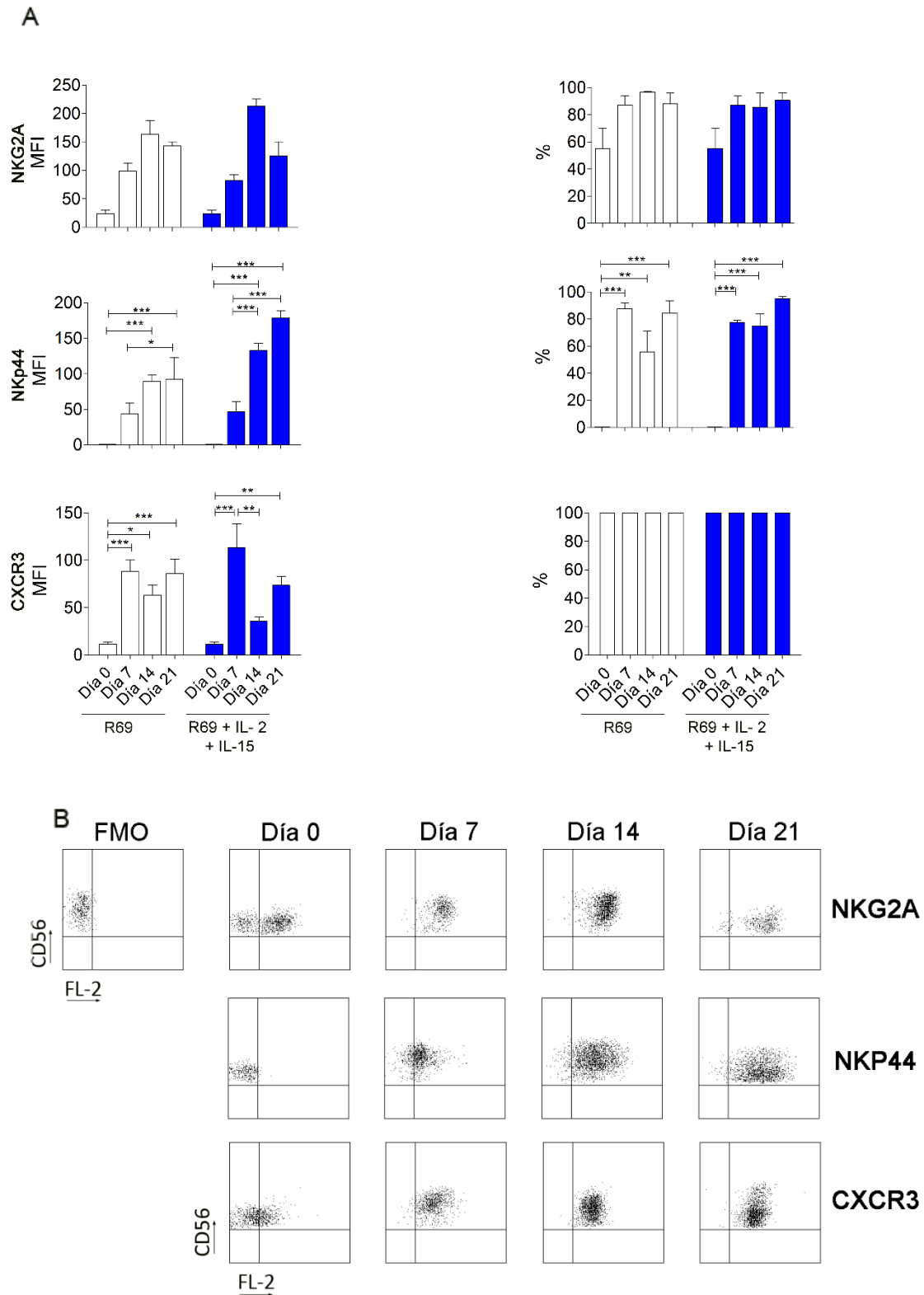


Figura 4.27 Expresión de los receptores de las células NK activadas con distintos estímulos. Los PBMCs se purificaron directamente de sangre periférica o se activaron mediante las células estimuladoras R69 o la combinación de R69 + IL-2 + IL-15, durante 21 días. A distintos tiempos de expansión (días 0, 7, 14 y 21) se estudió la expresión de los receptores de superficie mediante citometría de flujo, como se indica en materiales y métodos. Los datos representan A) la MFI de 2-4 donantes independientes. B) Se indica un ejemplo representativo de los marcajes para cada receptor a los distintos tiempos de expansión. Se realizó el análisis estadístico test ANOVA de dos factores, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

En cuanto a los *checkpoints* considerados emergentes en la regulación de las células NK, se observó una influencia variable de la activación para cada uno de ellos.

Así, el receptor **PD-1** presentó niveles de expresión bajos antes y después de la activación. Se observaron diferencias significativas (respecto a las células NK recién aisladas) a día 7 y a día 21, para la estimulación con las células R69 solas o en combinación con ILs respectivamente. La comparación entre estímulos no mostró diferencias significativas.

El receptor **CTLA-4** también mostró una expresión baja tanto en las células NK recién aisladas como en las activadas. En este caso, sólo se observó un incremento significativo a día 7 de expansión en la estimulación con las células estimuladoras R69 + IL-2 + IL-15, aunque los resultados presentaron una alta variabilidad y el nivel de expresión continuó siendo bajo.

Por otro lado, el receptor **TIM-3** contó un nivel de expresión basal variable en las células NK recién aisladas. La activación, con cualquiera de los estímulos, implicó un incremento en su nivel de expresión. Sin embargo, este incremento sólo resultó significativo para la combinación de R69 + IL-2 + IL-15.

Finalmente, mientras que las células NK recién aisladas prácticamente no mostraron expresión del receptor **LAG-3**, la activación supuso la aparición de una población con un nivel de expresión alto. Este nivel fue significativamente superior al basal a día tanto a 7 como a día 14 de la activación con las células R69. La expansión con las células R69 + IL-2 + IL-15 también fue capaz de aumetnar el porcentaje de células con una expresión alta de LAG-3. Mientras que la comparación entre estímulos, del mismo modo que en los casos anteriores, no mostró diferencias significativas.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

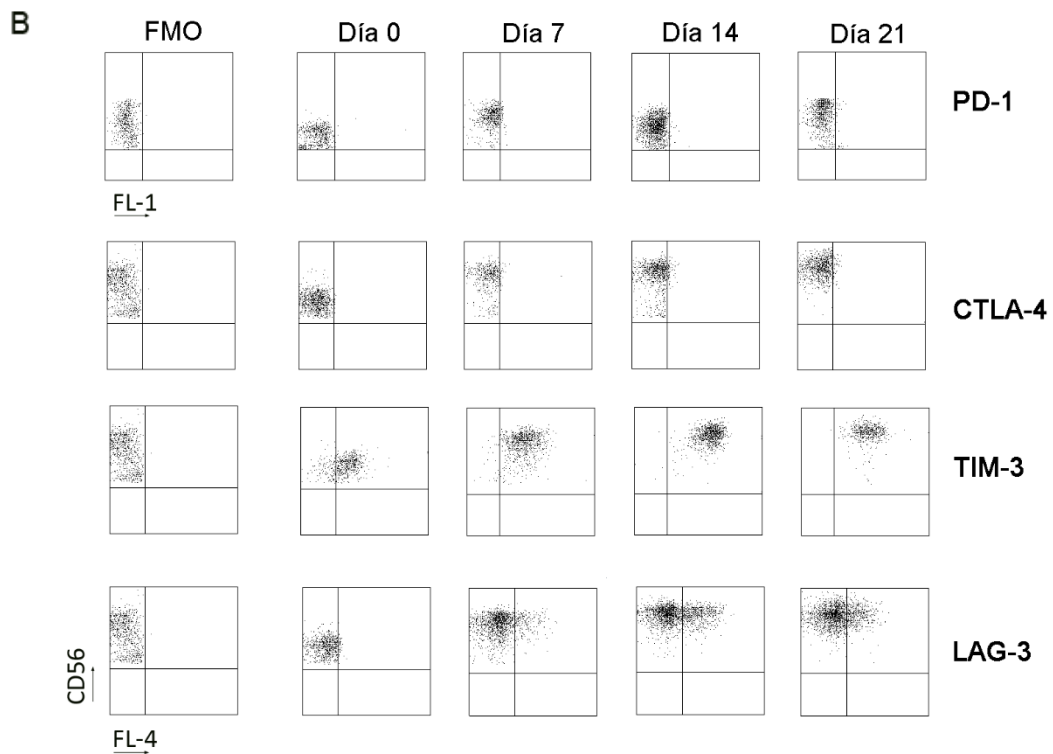
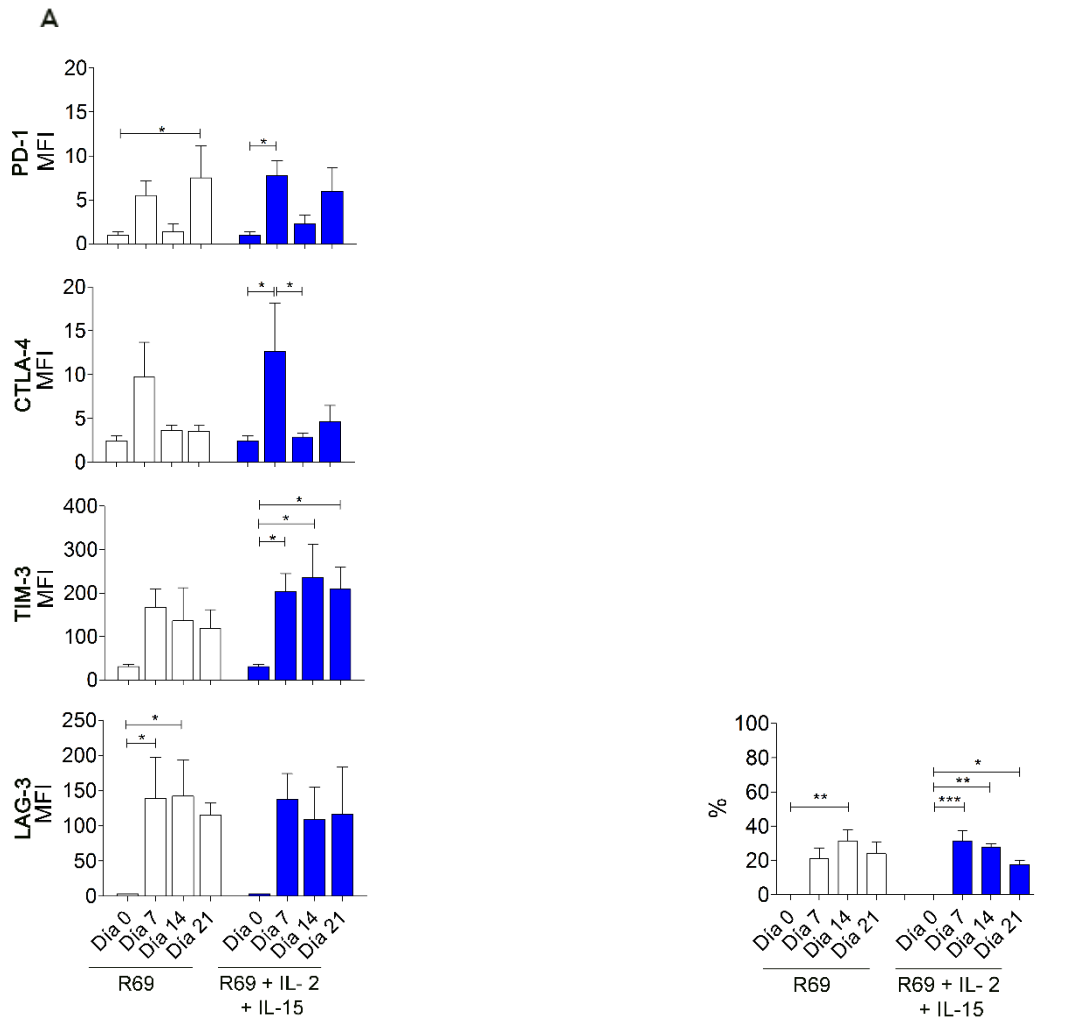


Figura 4.28 Expresión de los *checkpoints* emergentes en las células NK activadas con distintos estímulos.

Los PBMCs se purificaron directamente de sangre periférica o se activaron mediante las células estimuladoras R69 o la combinación de R69 + IL-2 + IL-15, durante 21 días. A distintos tiempos de expansión (días 0, 7, 14 y 21) se estudió la expresión de los receptores de superficie mediante citometría de flujo, como se indica en materiales y métodos. Los datos representan A) la MFI de 2-4 donantes independientes- B) Se muestra un ejemplo representativo de los marcajes para cada receptor a los distintos tiempos de expansión. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores, donde * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.3.5 Efecto del bloqueo de *checkpoints* con mAbs sobre la actividad de células NK de donantes sanos

4.3.5.1 Evaluación de la citotoxicidad de las células NK alogénicas activadas en combinación con bloqueantes de *checkpoints*

La expresión de *checkpoints* por parte de las células NK activadas presenta ciertas diferencias respecto a las células NK recién aisladas. Así, mientras que el nivel de PD-1 presenta una ligera variación, se produce una sobreexpresión de TIM-3. Para valorar la posible implicación de estos receptores en la función de las células NK activadas se realizaron ensayos bloqueo con mAbs anti-PD-1 (Pembrolizumab) y anti-TIM-3 (clon F38-2E2). Para estos ensayos se llevó a cabo la activación “estándar” de las células NK, con la línea estimuladora R69 y durante 5 días. Según los resultados mostrados anteriormente (Figuras 4.23 y Figura 4.28) no existían diferencias en la capacidad citotóxica de las células NK, o el nivel de expresión de PD-1 y TIM-3, en función de su activación con células R69 solas o en combinación con ILs; ni tampoco a los distintos tiempos de expansión.

Inicialmente, se comprobó la capacidad de estos mAbs de unirse a sus respectivas dianas mediante un ensayo de competitividad por citometría. De este modo, los PBMCs activados se pre-incubaron con el mAb bloqueante anti-PD-1 o anti-TIM-3 y, a continuación, se analizó la expresión de PD-1 o TIM-3 mediante citometría de flujo. Se observó que en ambos casos se producía un bloqueo de la unión del mAb utilizado para citometría de flujo (Figura 4.29). Además, la unión del mAb bloqueante anti-TIM-3 también se detectó a través de un marcaje con un mAb secundario. Aunque en esta ocasión no se analizó la expresión del marcador CD56, se observó que el porcentaje de población positiva para TIM-3 se correspondía al valor encontrado en el marcaje con el mAb marcado con fluorescencia en la caracterización fenotípica de los PBMCs.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

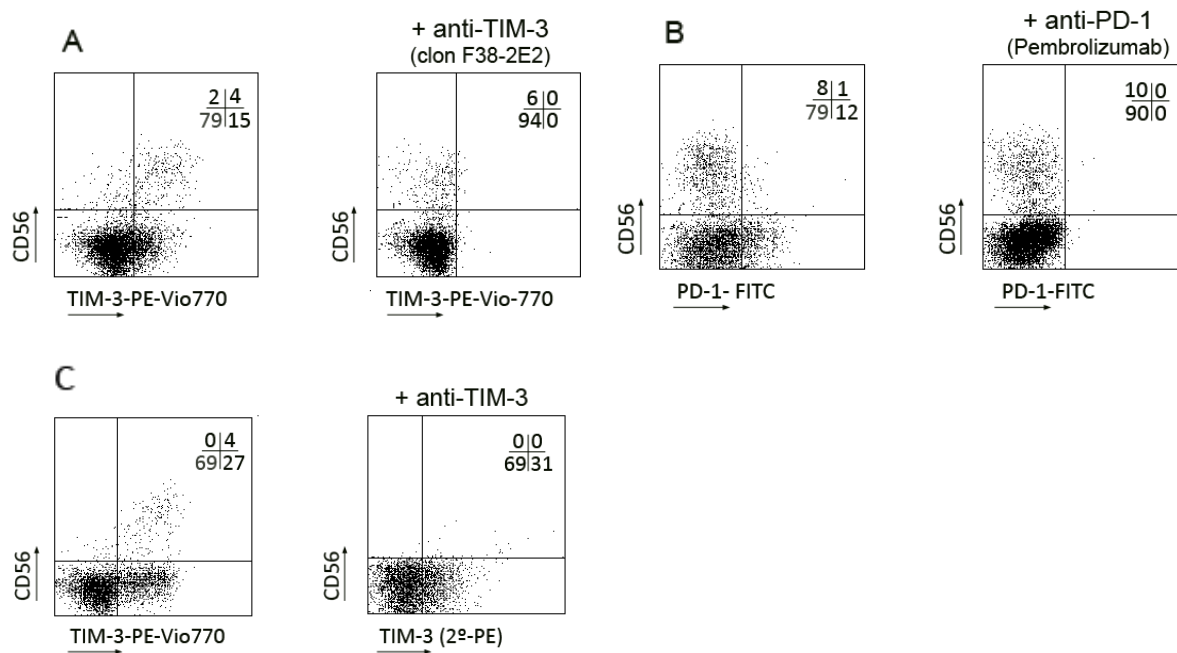
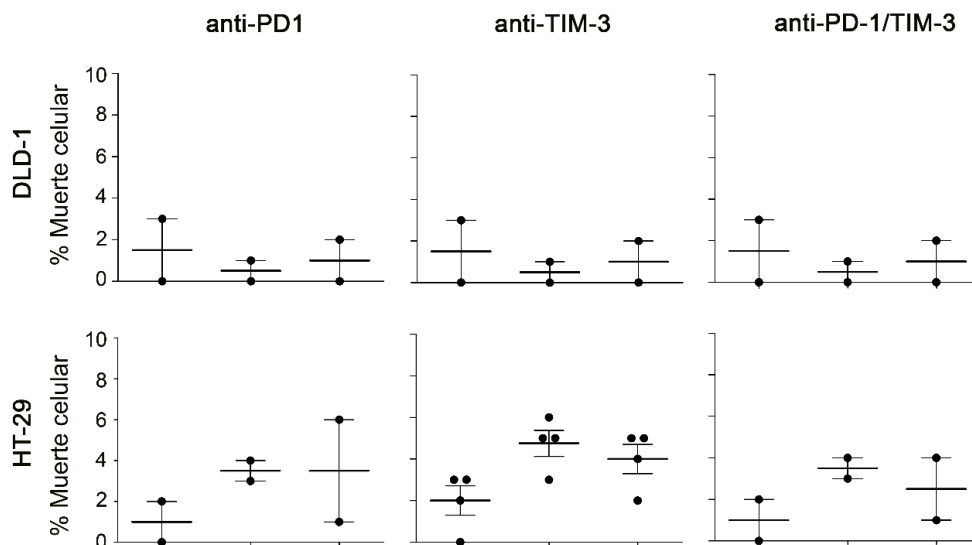


Figura 4.29 Análisis del bloqueo de los receptores PD-1 y TIM-3 mediante mAbs. Se partió de los PBMCs activados mediante la línea estimuladora R69 durante 5 días. Estos PBMCs se incubaron con los mAbs bloqueantes frente a PD-1 (Pembrolizumab) o TIM-3 (clon F38-2E2) durante 20 min a 4°C. Posteriormente, se añadió un anticuerpo comercial marcado con un fluoróforo frente A) TIM-3 o B) PD1. C) Se añadió un anticuerpo secundario que reconociera al bloqueante de TIM-3 y se comparó el marcaje con el de un anticuerpo primario comercial (izquierda). Los marcajes se analizaron a través de citometría de flujo, como se indica en materiales y métodos.

Posteriormente, se estudió la implicación de los ejes de PD-1 y TIM-3 en la función de las células NK recién aisladas y activadas. Para el primer caso, se seleccionaron como diana las líneas celulares HT-29 y DLD-1. La línea celular HT-29 ya había mostrado una alta expresión de los ligandos para los dos *checkpoints* considerados; mientras que la línea celular DLD-1 había resultado ser la más sensible a la acción de las células NK activadas. Para el caso de las células NK activadas se consideró también la línea celular HCT-116, ya que se ha establecido como modelo de CCR en los ensayos *in vivo*.

Aunque los datos obtenidos hasta el momento no cuentan con la suficiente potencia estadística, no se observó ningún efecto de los isotipos o los mAbs bloqueantes en la citotoxicidad de las células NK recién aisladas sobre la línea celular DLD-1 (Figura 4.30). Al utilizar como diana la línea celular HT-29 se observó una tendencia hacia una mayor capacidad citotóxica en combinación con los isotipos o los mAbs bloqueantes, pero el análisis estadístico en los ensayos con anti-TIM-3 no resultó significativo (Figura 4.30). La combinación de ambos tampoco aumentó la actividad citotóxica de las células NK recién aisladas.

A Recién aisladas



B Activadas

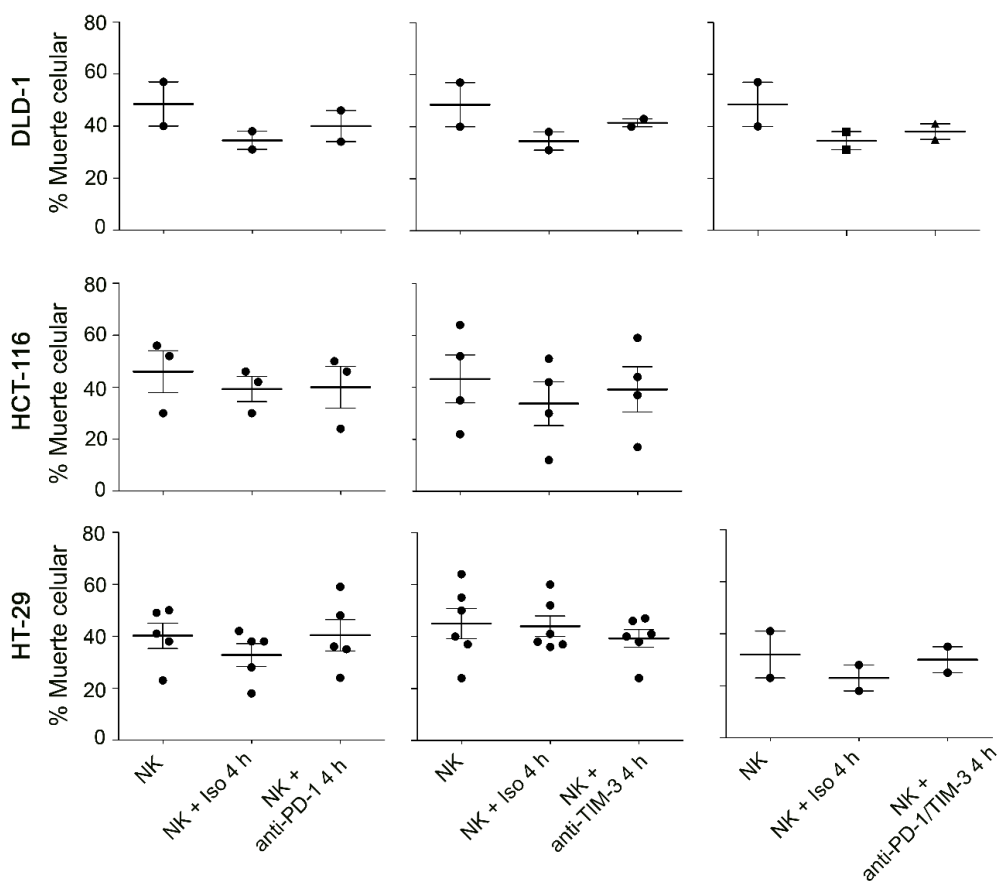


Figura 4.30 Citotoxicidad de células NK alogénicas, en combinación con anti-checkpoints, frente a líneas celulares de CCR en 2D. Se partió de los PBMCs A) recién purificados de sangre periférica, o B) activados mediante el co-cultivo con la línea estimuladora R69 durante 5 días. Se enriqueció la población de células NK a través de MACS y se llevó a cabo su marcaje con la sonda eFluor 670. Seguidamente, se incubaron solas, o en presencia de los mAb bloqueante frente a PD-1 y/o TIM-3 o sus respectivos isotipos, con las células de CCR durante 4 horas. Se utilizó un ratio efector: diana 3:1 para las células NK recién

aisladas; 1:1 para las células NK activadas frente a HCT-116 y HT-29; y 0,5:1 para las células NK activadas frente a DLD-1. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD) en la población negativa para el marcaje de eFluor 670, como se describe en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm SEM de 2-4 donantes independientes tras restar los respectivos controles sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico test t de Student, donde ** p<0.01, *** p<0.001.

Al estudiar el bloqueo de estos ejes de regulación en las células NK activadas, se observó una tendencia hacia una menor capacidad citotóxica en presencia de los respectivos isotipos. Sin embargo, en las condiciones en las que se pudo realizar el análisis estadístico, estas diferencias no resultaron significativas. Por su parte, el empleo de mAbs bloqueantes tampoco ofreció cambios respecto al control con células NK solas, o en presencia de isotipo.

4.3.5.2 Evaluación de la citotoxicidad de las células NK alogénicas activadas en presencia de un mAb bloqueante del eje PD-1/PD-L1 (Pembrolizumab).

Después de comprobar que el bloqueo del receptor PD-1 durante la interacción de las células NK con las células diana no era capaz de mejorar su capacidad citotóxica, se valoró la acción de Pembrolizumab durante la activación de las mismas.

En primer lugar, se analizó la expresión de PD-1 en las células NK y después de la activación (Figura 4.31A). Tanto en el conjunto de PBMCs recién purificados, como activados con el protocolo “estándar” con la línea estimuladora R69, se observó la presencia de una población positiva en PD-1. La mayor parte de esta población se correspondió con las células CD56⁺. Por el contrario, los PBMCs activados en presencia de Pembrolizumab no expresaban PD-1. Seguidamente, las células NK activadas en ambas condiciones se enfrentaron a las líneas celulares HT-29 y DLD-1 (Figura 4.31B). En este caso, aunque los resultados fueron variables en función del donante, no se observó un efecto significativo del bloqueo de PD-1 en la citotoxicidad de las células NK sobre estas líneas celulares. Sin embargo, sí se apreció un ligero aumento de la capacidad citotóxica de las células NK cultivadas con Pembrolizumab frente a la línea DLD-1. Al igual que en ensayo anterior, Pembrolizumab no tuvo efecto cuando únicamente se incluyó durante el ensayo de citotoxicidad a 4 horas.

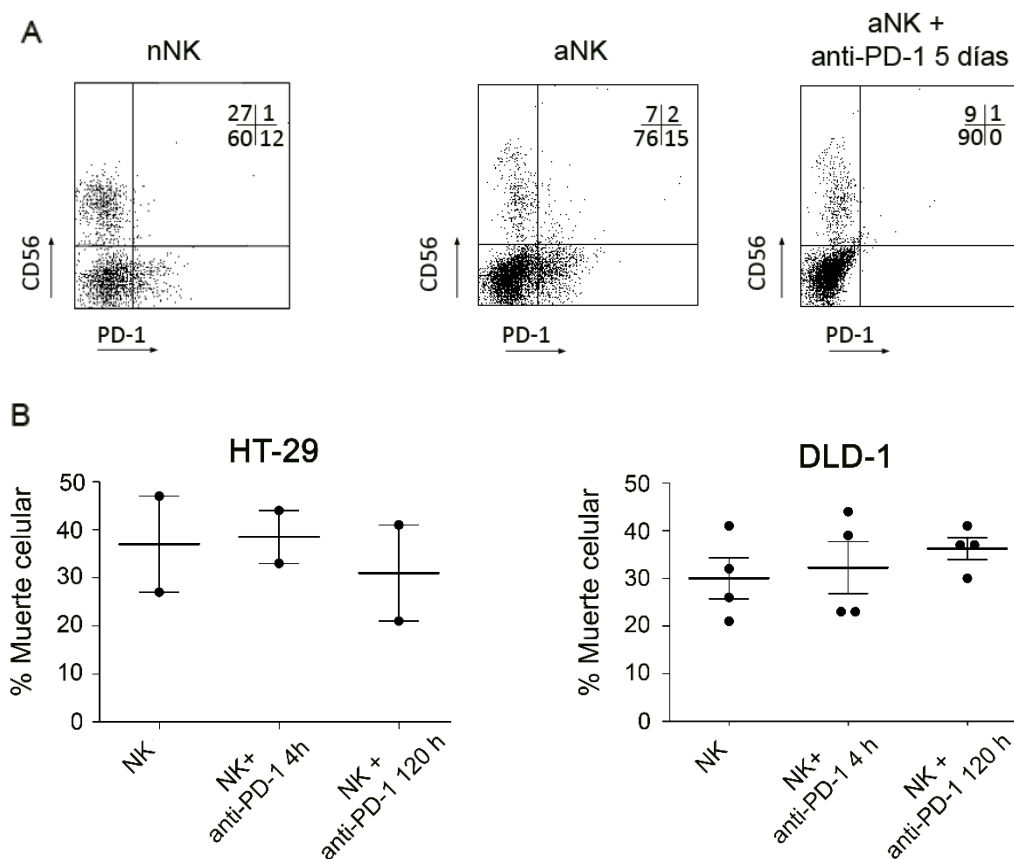


Figura 4.31. Expresión de PD-1 y citotoxicidad de células NK alogénicas activadas en presencia de un mAb bloqueante de PD-1. A) Se analizó la expresión de PD-1 en los PBMCs provenientes de donantes sanos recién purificados, o activados durante 5 días con la línea estimuladora R69 en presencia o ausencia del mAb Pembrolizumab. Los números en la esquina superior izquierda muestran el porcentaje de células correspondiente a cada cuadrante del diagrama. B) La población de células NK activadas se enriqueció a través de MACS, y se enfrentó a cultivos 2D de las líneas celulares HT-29 y DLD-1, durante 4 h, a un ratio efector:diana 1:1 y 0,5:1 respectivamente. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD), como se describe en materiales y métodos. Los datos muestran la media±SEM de la citotoxicidad de 2-4 donantes independientes tras restar los respectivos controles sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de un factor.

4.3.6 Bloqueo del eje PD-1/PD-L1 en células NK de pacientes con CCR

A pesar de que las células NK de sangre periférica han mostrado un bajo nivel de expresión de PD-1, estudios previos en pacientes con cáncer han encontrado una sobreexpresión de este receptor en estas células (617-619). Por ello que se analizó el fenotipo y la funcionalidad de las células NK provenientes de pacientes con CCR, así como el efecto del bloqueo del eje PD-1/PD-L1 sobre su capacidad citotóxica.

Al contrario que lo observado en las células NK de los donantes sanos (Figura 4.31), toda la población de células NK de pacientes con CCR expresó PD-1 (Figura 4.32A). De este modo, se analizó la capacidad citotóxica de estas células en presencia o ausencia de Pembrolizumab. Al igual que los resultados obtenidos con las células NK recién aisladas de los donantes sanos, se observó que éstas no tenían la capacidad de eliminar a la línea celular DLD-1 (Figura 4.32B). Además, el bloqueo de PD-1 no fue suficiente para incrementar su capacidad citotóxica.

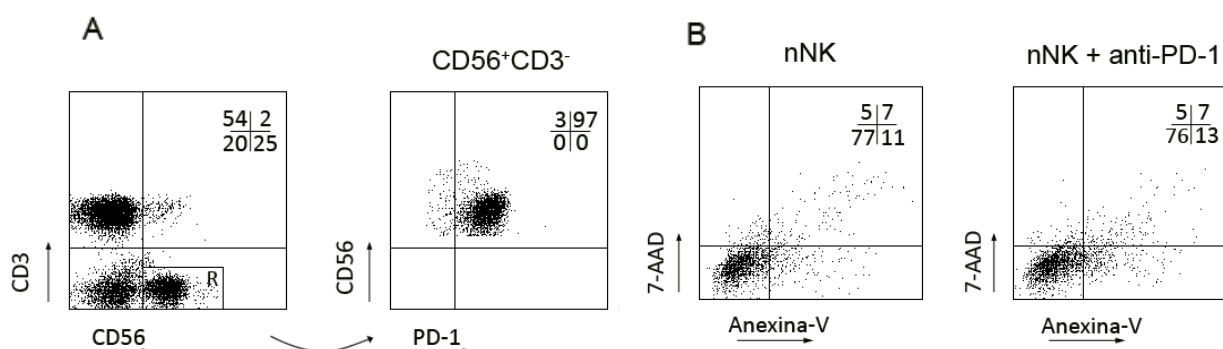


Figura 4.32 Expresión de PD-1 y caracterización de las células NK recién aisladas de pacientes con CCR.

A) Se analizó la expresión de PD1 en las células NK ($CD56^+CD3^-$) de pacientes de CCR. B) Se enriqueció la población de células NK a través de MACS, y se enfrentó a cultivos 2D de la línea celular DLD-1 durante 4h, a un ratio efector:diana 1:1, en presencia o ausencia del mAb Pembrolizumab. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD), como se describe en materiales y métodos. Los datos muestran un ejemplo representativo de los marcajes indicados. Los números en la esquina superior izquierda muestran el porcentaje de células correspondiente a cada cuadrante del diagrama.

Posteriormente, para activar a las células NK, los PBMCs se cultivaron durante 72 horas con IL-2 e IL-15, en presencia o ausencia de Pembrolizumab. Tras la activación con ILs solas, se observó que la intensidad de PD-1 disminuía en intensidad en las células positivas para el receptor (Figura 4.33A). También se comprobó que la incubación con este mAb era capaz de unirse al receptor PD-1, aunque preferentemente sobre la población $CD56^-$ (Figura 4.33A).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Además, en esta ocasión, se valoró la capacidad citotóxica de las células NK activadas solas, incubadas con Pembrolizumab durante el periodo de activación, o durante el tiempo del ensayo de citotoxicidad. A pesar de la variabilidad en los resultados, se observó una tendencia hacia una mayor capacidad citotóxica frente a la línea celular DLD-1 en presencia del anticuerpo Pembrolizumab (Figura 4.33B).

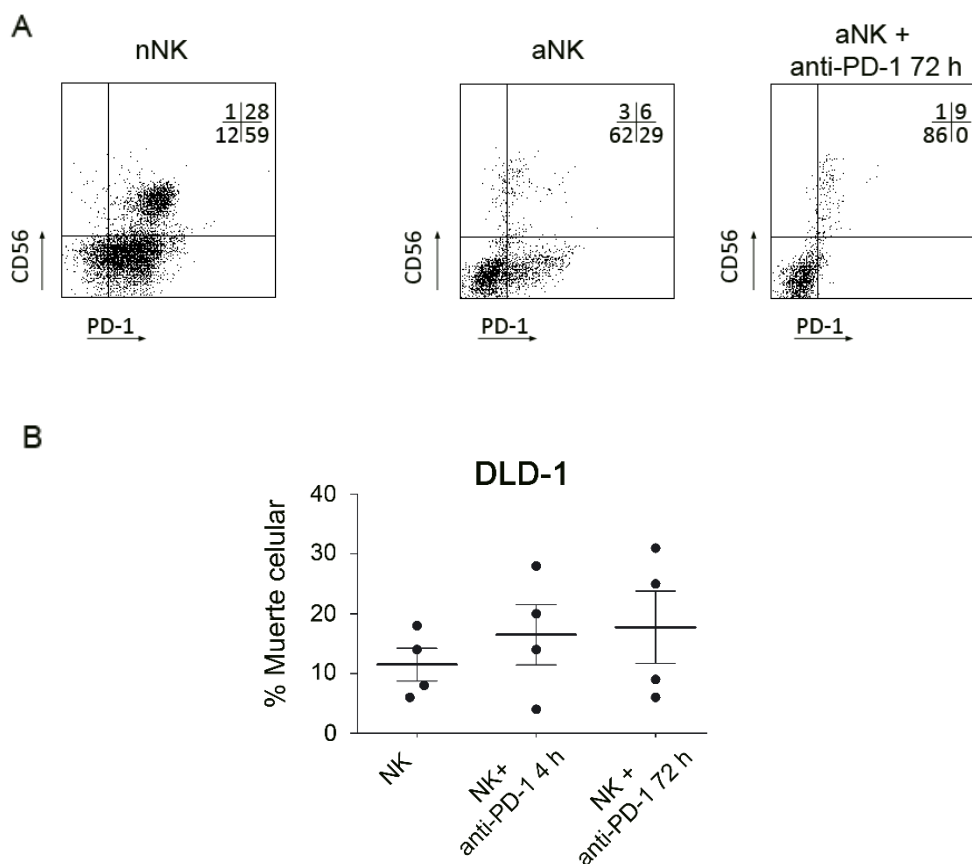


Figura 4.33 Expresión de PD-1 y citotoxicidad de células NK derivadas de pacientes con CCR activadas en presencia de un mAb bloqueante de PD-1. A) Se analizó la expresión de PD1 en las células NK ($CD56^+CD3^+$) de pacientes de CCR recién aisladas, o activadas durante 72 h con ILs solas o en combinación con Pembrolizumab. Los números en la esquina superior izquierda muestran el porcentaje de células correspondiente a cada cuadrante del diagrama. B) La población de células NK activadas se enriqueció a través de MACS, y se enfrentó a cultivos 2D de la línea celular DLD-1, durante 4 h, a un ratio efector:diana 1:1. La muerte celular se analizó por citometría de flujo, determinando la exposición de PS en la membrana externa (Anexina-V) y la permeabilización de la membrana (7-AAD), como se describe en materiales y métodos. Los datos muestran A) un ejemplo representativo de la evolución del receptor PD-1 con la activación; B) la media \pm SEM de la citotoxicidad de 4 donantes independientes tras restar los respectivos controles sin células NK, donde la muerte celular fue siempre <15%. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de un factor.

4.3.7 Discusión

La generación de **protocolos** que permitan la **activación y expansión** de las células NK es un requisito esencial para su aplicación como inmunoterapia contra el cáncer. Por lo tanto, durante los últimos años se han ido estudiando distintos **estímulos** basados principalmente en ILs, moléculas y células estimuladoras. La selección de un determinado estímulo conlleva **diferencias en la activación** de las células NK, tal y como se ha descrito previamente (566); y también puede tener un impacto en la proliferación y supervivencia de estas células durante la expansión. En este trabajo se ha valorado el empleo de ILs solas, células estimuladoras LCL-EBV⁺ solas, o la combinación de ambas.

En primer lugar, la **IL-2** y la **IL-15** han mostrado un papel esencial en la activación, proliferación y supervivencia de las células NK (659). Pero, del mismo modo que se ha descrito en la literatura, el empleo de estas ILs no proporcionó grandes tasas de expansión, ni fue capaz de mantener el cultivo durante un tiempo prolongado (346). Cabe destacar que en estos estudios se utilizó una dosis alta de IL-2 (1000 UI/mL), frente a la dosis utilizada en este trabajo (100 UI/mL) (187, 391). Por otro lado, también se ha encontrado que la respuesta a la estimulación con ILs depende de si las células NK son cultivadas como población purificada o dentro del conjunto de PBMCs (con o sin la eliminación de las células CD3⁺), con resultados más favorables para la segunda opción. No obstante, los mayores incrementos en la tasa de expansión de las células NK, mediante la estimulación con ILs, se han relacionado con el empleo combinado de moléculas estimuladoras como los mAb, alemtuzumab (anti-CD52) o anti-CD16 (187).

En este sentido, diversas publicaciones han mostrado que las **células estimuladoras** son capaces de mejorar los resultados obtenidos a través del cultivo con ILs solas. Tanto la estimulación con **PBMCs alogénicos**, como con **líneas celulares** inactivadas, han conseguido altas tasas de expansión, variando en función del protocolo entre 100 - >1.000 veces (187). No obstante, estos protocolos suelen combinar las células estimuladoras con ILs y otros compuestos (OKT3, concavalina A, ionomicina) (187, 660); e incluso se han generado líneas celulares modificadas genéticamente que expresan moléculas de co-estimulación (4-1BBL, CD86, OX40-L, etc.) o ILs ancladas a la membrana (IL-15 e IL-21) (406, 661, 662). Dentro de las líneas celulares más comúnmente utilizadas en la expansión de las células NK se encuentran la K562, derivada de leucemia mieloide crónica, y las LCL. En este trabajo se descartó el empleo de la línea celular

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

K562, ya que estudios previos Del grupo demostraron una mejor activación de las células NK con la LCL-EBV⁺ R69 que con la combinación K562 + IL-2 (242, 566). De este modo, se compararon las LCL-EBV⁺ R69 y 721.221.

El potencial que presentan las **LCL-EBV⁺** en la activación y proliferación de las células NK ya fue descrito anteriormente (409). Después, otros estudios han utilizado estas células estimuladoras para desarrollar diversos protocolos de expansión (410, 663). La línea celular R69 se caracteriza por expresar tanto HLA-I, con todos los epítomos conocidos de los KIR, como HLA-II. Mientras que la línea celular 721.221 es deficiente en HLA-I, pero mantiene la expresión de HLA-II (664, 665). Trabajos anteriores en el grupo demostraron que ambas líneas celulares eran capaces de activar a las células NK sin necesidad de ILs. Por ello se propuso que la activación no estaba restringida por HLA-I. Además, tampoco observaron cambios en el patrón de expresión de receptores de las células NK tras su activación con la línea celular R69 o K562 (deficiente en HLA-I) (242, 566, 567). Sin embargo, en este trabajo se ha observado que únicamente la línea celular R69 sola era capaz de mantener la expansión a lo largo de los 21 días de cultivo; mientras que el cultivo con la línea celular 721.221 sola comprometió la viabilidad de las células NK en la última semana de ensayo. No obstante, los resultados para la estimulación con la línea 721.221 se obtuvieron a través de una expansión simultánea de los donantes, por lo que éstos se podrían contrastar con un ensayo independiente.

Por otro lado, la combinación de estas **células estimuladoras con ILs** proporcionó un estímulo más fuerte y ofreció los mejores resultados de expansión. En esta ocasión se observaron tasas muy variables en función de los donantes. Pero, en línea con los datos anteriores, tampoco se asoció a una restricción de HLA-I. De este modo, podría considerarse la implicación de otras señales en la respuesta de las células NK. De hecho, Tremly-McLea et al. observaron que las células estimuladoras deficientes en HLA-I conferían distintas características a las células NK en función del patrón de ligandos de activación que expresaban (666). Además, también como un condicionante en la activación y expansión, otros estudios han valorado el impacto de las interacciones entre las líneas celulares estimuladoras, las células NK y otras poblaciones accesorias de los PBMCs (667, 668); así como las citoquinas liberadas por las propias LCL-EBV⁺, especialmente IL-12 e IFN- γ (669, 670).

Este trabajo se ha centrado en el desarrollo de un protocolo de activación a partir de muestras de sangre periférica. Sin embargo, distintos estudios han utilizado una variedad de

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

fuentes de células NK, como cordón umbilical, células pluripotentes, o incluso líneas celulares. No obstante, más del 90% de los ensayos clínicos están basados en la expansión de células NK derivadas de sangre periférica (187). Aun así, protocolos de expansión similares a los utilizados en estos ensayos, se han aplicado a la expansión de células NK provenientes de otras fuentes. En el trabajo de Sánchez-Martínez et al obtuvieron tasas de expansión superiores a 50 veces tras 10 días de cultivo de los PBMCs provenientes de cordón umbilical con la línea linfoblastoide PLH en combinación con IL-2 e IL-12 (387).

El empleo de células NK derivadas de sangre periférica implica, de partida, una población heterogénea, con diferentes fenotipos y funciones. Sin embargo, la división principal se basa en la mayor o menor expresión del marcador CD56. Además, las dos poblaciones resultantes de esta división también se caracterizan por una expresión diferencial del receptor CD16. Así se definen las células NK $CD56^{dim}CD16^{bright}$ y $CD56^{bright}CD56^{dim}$. Las primeras representan alrededor del 90% de las células NK circulantes, con una función principalmente citotóxica (671); mientras que las segundas son predominantemente productoras de citoquinas (672). No obstante, se ha descrito que estas poblaciones, y sus funciones, se ven alteradas tras la activación con distintos estímulos. De hecho, se ha demostrado que las células $CD56^{bright}$ son capaces de responder a IL-2 e IL-12 e incrementar su capacidad citotóxica hasta los niveles característicos de las células $CD56^{dim}$ (672, 673).

En este trabajo se observó que la activación basada en ILs (IL-2 e IL-15) producía un enriquecimiento de la población $CD56^{bright}$ y una pérdida de CD16, tal y como se había descrito previamente (620). Por otro lado, se observó que la activación con células estimuladoras (LCL-EBV⁺) solas o combinadas con ILs conllevaba un enriquecimiento de la población $CD56^{bright}$. En cuanto a CD16, durante la primera semana hubo un incremento de la población $CD16^{dim}$, pero posteriormente el cultivo se volvió a enriquecer en una población $CD16^{bright}$. Probablemente, esto se deba a una mayor proliferación de este último subgrupo de células NK. Además, surgió una nueva población caracterizada por la expresión de $CD56^{bright}/CD16^{bright}$. Estos resultados son acordes a los descritos por otros estudios en los que la activación con algunas citoquinas (674), o con las células estimuladoras R69 (242), daba lugar al desarrollo de células NK con una alta expresión de ambos marcadores. Funcionalmente, ambos estudios encontraron que estas células NK tenían un potencial citotóxico alto, tanto frente a líneas de neoplasias hematológicas como derivadas de tumores sólidos (242, 566). De hecho, en el trabajo de nuestro grupo se observó un incremento en la expresión intracelular de granzima B en esta población (242).

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Tanto en estudios previos como en este trabajo se ha observado un aumento de la capacidad citotóxica de las células NK activadas a través de LCL-EBV+ (667, 675). Sin embargo, en estos casos, las condiciones de activación se limitaban a tiempos cortos de alrededor de una semana. Por el contrario, la activación de las células NK a largo plazo puede implicar cambios relacionados con una estimulación crónica. De hecho, se ha observado que el tratamiento continuado con IL-15 es capaz de mejorar la proliferación de las células NK, pero a expensas de su agotamiento funcional (676). En este trabajo, tanto el empleo de la línea estimuladora R69 (sola o en combinación con ILs), como el empleo de la línea celular 721.221+ IL-2 + IL-15, fueron capaces de mantener la proliferación y la capacidad citotóxica de las células NK a lo largo de los 21 días de cultivo. Como se ha descrito, estas dos líneas celulares presentan diferencias en la expresión de HLA-I. Y en trabajos anteriores se propuso que la activación inducida por las LCL-EBV⁺ era independiente de la expresión de HLA-I (242). En línea con ello, en nuestro estudio la falta de expresión de HLA-I no indujo anergia en las células NK en el cultivo a largo plazo, frente a lo que podría esperarse como un mecanismo de *tuning*. De hecho, otros estudios han observado que una estimulación constante a través del receptor de activación NKG2D compromete la actividad anti-tumoral de las células NK (677). Y aunque podría pensarse que las ILs usadas en este trabajo podrían revertir la anergia de las células NK, el estudio de Courdet et al. también se llevó a cabo en presencia de IL-2; por lo que no está claro el mecanismo que induce la activación a largo plazo de las células NK. En este sentido, otros estudios que han utilizado la línea estimuladora K562 (carente de HLA-I y HLA-II), modificada para expresar en la membrana moléculas co-estimuladoras como OX40-L o 4-1BB e ILs como IL-15 o IL-21, también han descrito una alta tasa de expansión de las células NK sin comprometer su citotoxicidad (406, 661). Puede ser que las líneas celulares K562, R69 y 721.221 no expresen los suficientes ligandos de NKG2A (621).

Finalmente, y a partir de los datos expuestos, se seleccionó el protocolo basado en la combinación de células R69 + IL-2 + IL-15 para futuros ensayos de expansión de las células NK. No obstante, su adaptación en la clínica en condiciones GMP requerirá modificaciones de las condiciones y medios de cultivo utilizados en este trabajo, por lo que habrá que asegurar que no se produzca un impacto negativo en la activación y proliferación de las células NK.

Por otro lado, uno de los factores de calidad de ACT basada en células NK es la pureza de las células transferidas. En un contexto de alo-reactividad, la presencia de linfocitos T generaría GvHD. Además, se ha descrito que las células B de los donantes pueden dar lugar a

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

desórdenes linfoproliferativos, si se reactivan ciertas infecciones virales (EBV), o anemia debida al síndrome del linfocito pasajero (187, 678). Es por ello que en los protocolos clínicos se suelen hacer varias rondas de purificación de las células NK; por ejemplo, mediante la eliminación de los linfocitos T (CD3⁺) y la selección de las células NK (CD56⁺). De hecho, estudios acerca del desarrollo de protocolos para la aplicación clínica han propuesto la purificación de las células NK antes de comenzar su expansión (391).

No obstante, otras poblaciones presentes en el conjunto de los PBMCs pueden colaborar en la activación y expansión de las células NK. Como ya se ha descrito, los PBMCs autólogos o alogénicos actúan como células estimuladoras, mejorando las tasas de expansión de las células NK purificadas y cultivadas sólo en presencia de ILs (187). De hecho, se ha comprobado que los monocitos intervienen en la expansión de las células NK (187, 391, 679). Además, estudios previos en el grupo mostraron que la eliminación de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺, durante la activación con las células estimuladoras R69, no tenía un efecto negativo sobre la citotoxicidad de las células NK. Sin embargo, cuando estas células se activaban como población purificada (CD56⁺) sí veían disminuida su capacidad citotóxica frente a líneas celulares de neoplasias hematológicas más resistentes, como el linfoma RAJI o el mieloma múltiple U2937.

En este trabajo se evaluó el efecto de la eliminación de la población CD3⁺ sobre la activación y la expansión de las células NK. Para ello, se utilizó como estímulo la combinación de las células estimuladoras R69 + IL-2 + IL-15. Aunque el número de pacientes analizado no es representativo estadísticamente, no se observaron variaciones en la tasa de expansión o la capacidad citotóxica de las células NK en función de la presencia de linfocitos T. Sin embargo, sí se obtuvo una mayor pureza del cultivo, alcanzando un 60-90% de células NK a partir de la segunda semana de expansión. Por lo tanto, la eliminación previa de la población de linfocitos T puede resultar beneficiosa en la implementación del protocolo a nivel clínico.

A un nivel posterior, la eficacia clínica de la ACT basada en células NK en CCR dependerá de la capacidad de estas células de migrar hasta el tumor y ejercer allí sus funciones citotóxicas. Por ello, se analizaron un conjunto de receptores que pueden definir su direccionamiento y respuesta anti-tumoral.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar se estudió el **receptor de quimiocinas CXCR3**, que reconoce CXCL-4, CXCL-9, CXCL-10 y CXCL-11 (622). En este trabajo se detectó en las células NK recién aisladas, y su nivel incrementó significativamente tras la activación. Otros estudios han descrito que este receptor se encuentra expresado por las células NK circulantes, pero que su nivel disminuye al adquirir el fenotipo maduro CD56^{dim} (189). Además, se ha caracterizado como un receptor esencial para la infiltración de las células NK en los tumores sólidos (680). En cuanto al efecto de la activación sobre este receptor, existen discrepancias entre una disminución (681) o un aumento (682, 683) de su expresión tras la exposición a IL-2. Probablemente esto se deba a la dosis utilizada para la activación, de manera que dosis altas de IL-2 indujeron su sobreexpresión. De hecho, otros estudios del grupo revelaron la sobreexpresión del receptor mediante la activación con las células R69, pero no con IL-2 (521).

Posteriormente, se estudiaron algunos de los **receptores de activación (NKp44) e inhibición (NKG2A)** de las células NK. La expresión de **NKp44** constituye una prueba del estado de activación de estas células. El receptor NKp44 no se encuentra en las células NK recién aisladas y, se ha observado que se expone en la superficie tras la activación *in vitro* con ILs (684) o células estimuladoras (242). Consecuentemente, en este trabajo se encontró un incremento del nivel de NKp44 en prácticamente toda la población de células NK activadas. Además, este incremento fue progresivo con el tiempo de expansión. El papel de este receptor en la eliminación de los tumores de CCR, y más específicamente en el contexto de las células NK activadas, todavía tiene que ser evaluado. Sin embargo, otros estudios han demostrado su efecto anti-tumoral tras la unión a sus respectivos ligandos (684-686). Por otro lado, el receptor de inhibición **NKG2A** se ha establecido como un *checkpoint* inhibitorio de la regulación de la inmunidad anti-tumoral de las células NK (142, 484). Además, estudios histopatológicos han revelado la presencia de células NK NKG2A⁺, y una alta expresión de su ligando HLA-E, en tumores de CCR, entre otros (484). Por ello, se ha propuesto como una diana para los tratamientos de inmunoterapia con mAb, y se ha desarrollado el mAb bloqueante Monalizumab (484). En este trabajo, y en relación con lo observado anteriormente (242, 410), se produjo un incremento en los niveles del receptor con la activación. Probablemente, este hecho se deba a un mecanismo de compensación en la señalización de los receptores de activación e inhibición para asegurar la tolerancia hacia las células sanas.

Finalmente, se analizó la expresión de otros *checkpoints* que han mostrado estar implicados en la regulación de los linfocitos T pero cuyo papel en la actividad de las células NK

no está tan claro. Además, la activación de las células NK *in vitro* podría suponer diferencias en su patrón de expresión o su papel en el balance de señales. Concretamente, se estudiaron los receptores CTLA-4, PD-1, TIM-3 y LAG-3.

El *checkpoint* **CTLA-4** es uno de los principales reguladores de tolerancia periférica de los linfocitos T tras su activación. Su exposición permanente a nivel extracelular es un signo de agotamiento, y su bloqueo a través de mAbs ha sido capaz de restaurar la respuesta anti-tumoral de los linfocitos T (687). Sin embargo, ha sido poco estudiado en el contexto de las células NK. Inicialmente, fue descrito en células NK de ratón activadas con IL-2, con un papel inhibitor en la producción de IFN- γ (688). En humanos, tras la estimulación con ILs, Lougaris et al. (689) encontraron una fuerte sobreexpresión del receptor a nivel intracelular; mientras que Hirakawa et al. (690) encontraron niveles bajos a nivel extracelular aunque significativamente superiores al control sin estimular; y Choi et al. no observaron diferencias respecto a las células NK recién aisladas (691). En este trabajo, la expresión de CTLA-4 a nivel extracelular sólo resultó significativa en la activación con las células R69 + IL-2 + IL-15 a día 7 de expansión, con un nivel bajo y con una gran variabilidad en los resultados. Es por ello, que el aumento del número de muestra estudiado, así como su detección a nivel intracelular, contribuirían a aclarar la evolución de este receptor durante la activación. Mientras tanto, su implicación en la actividad de las células NK debería comprobarse a través de ensayos funcionales, como el bloqueo de esta vía de señalización. En este sentido, Lang et al. mostraron que las células NK no muestran expresión de CTLA-4 y que su bloqueo no aumenta la actividad de las células NK (692).

Otro de los *checkpoints* que cuenta con pocos estudios en células NK es **LAG-3**. Este receptor fue inicialmente descrito en linfocitos T y células NK activadas ((171). Dado que se conoce su implicación en el agotamiento de los linfocitos T, se han desarrollado mAbs para bloquear su señalización; y se ha observado un efecto sinérgico con PD-1. De hecho, Zhou et al. determinaron que el bloqueo de LAG-3 era capaz de devolver la función de los linfocitos T CD8⁺ derivados de muestras de CCR (627). Sin embargo, existe poca información acerca de su implicación en la actividad anti-tumoral de las células NK, y no está claro si tiene un efecto sobre su capacidad citotóxica (158, 173, 693). No obstante, algunos estudios han encontrado células NK LAG3⁺ en los linfocitos infiltrantes de algunos tumores (172). En este trabajo, se ha observado el incremento de la expresión de LAG-3 en un porcentaje variable de las células NK activadas, llegando a alcanzar el 40% para algunos donantes y condiciones. Por ello, en futuros estudios, puede resultar interesante valorar el efecto de este eje sobre las células NK activadas.

Por su parte, **TIM-3** se ha descrito en las células NK recién aisladas de donantes sanos, especialmente en la población CD56^{dim}, y regula ciertos estados de tolerancia a nivel fisiológico (158, 173). Ensayos *in vitro* han mostrado un incremento de su expresión tras la estimulación con ILs (158, 168). De manera análoga, en este estudio se observó este mismo efecto con los protocolos de activación analizados, aunque sólo resultó significativo en el caso de la combinación de R69 + IL-2 + IL-15, probablemente debido al pequeño tamaño de la muestra. Por otro lado, la función de este receptor en las células NK es controvertida, habiéndose implicado en procesos de activación e inhibición. Por ejemplo, su unión con Gal-9 ha mostrado inducir la liberación de IFN- γ (168). Mientras que en un contexto tumoral *in vivo*, su expresión se ha correlacionado con peor pronóstico y una pérdida de función de las células NK (145, 158, 173, 694); aunque un trabajo centrado en el CCR lo ha asociado a estadios menos avanzados (695). Además, algunos estudios han demostrado que el bloqueo de este receptor es capaz de recuperar dicha función (169, 630). Opuestamente, otros han descrito que el bloqueo de TIM-3 reduce la citotoxicidad de las células NK frente a líneas de cáncer de páncreas (696). Es por ello que en este trabajo se evaluó el efecto de un mAb anti-TIM-3 sobre la capacidad citotóxica de células NK recién aisladas y NK activadas frente a líneas de CCR. Dicho anticuerpo bloquea los sitios de unión de CEACAM-1 y fosfatidilserina (697). Sin embargo, ni en los ensayos con células NK recién aisladas, ni con células NK activadas, se observó un efecto del bloqueo frente a las líneas celulares DLD-1, HCT-116 y HT-29. Además, esta última línea celular había mostrado previamente una alta expresión del ligando de TIM-3, CEACAM-1 (apartado 4.1.2).

Por último, el *checkpoint* **PD-1** ha sido uno de los más estudiados en el campo de la inmunoterapia. Se ha descrito en linfocitos T activados, regulando tolerancia periférica, pero también en linfocitos T anérgicos en tumores e infecciones crónicas (698). De hecho, los mAbs dirigidos a su bloqueo han proporcionado buenos resultados en el tratamiento de tumores con infiltración de linfocitos T. En cuanto a las células NK, su papel es más controvertido. El estudio de **donantes sanos** ha revelado, en general, niveles bajos de expresión (146), y no parece estar implicado en la tolerancia de estas células. Sin embargo, se ha encontrado sobreexpresado en las células NK de **pacientes con cáncer**, relacionándose con un peor pronóstico y una inhibición de la respuesta anti-tumoral (147, 174, 699, 700). Además, diversos estudios *in vitro* han mostrado que los mAbs frente al eje PD-1/PD-L1 son capaces de devolver la respuesta de las células NK (147, 700); y en los estudios *in vivo* se ha visto que las células NK contribuyen a la eficacia de estos mAbs (174, 175, 701). Así, en este trabajo se estudió el bloqueo de PD-1 en las células NK provenientes de pacientes de CCR. Del mismo modo que se había descrito, estas

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

células expresaron altos niveles del receptor. Sin embargo, al enfrentar las células NK recién aisladas de pacientes de CCR a las líneas celulares de CCR, no se observó un efecto del anticuerpo Pembrolizumab, probablemente debido a la baja citotoxicidad basal inducida por éstas. Por otro lado, la activación con ILs redujo la expresión de PD-1, probablemente por la reversión del fenotipo exhausto (623). El bloqueo de PD-1 en las células activadas de estos pacientes, bien durante el tiempo de ensayo o durante toda la activación, resultó en una tendencia hacia una mayor capacidad citotóxica. Aunque estos resultados no resultaron significativos, sería necesario un incremento del número de muestra para poder asegurar o descartar su efecto. Frente a estas observaciones, y también condicionado por el tamaño de muestra y la citotoxicidad basal de las células recién aisladas, no se observó ningún efecto de Pembrolizumab sobre las células NK provenientes de donantes sanos. En un principio, estos resultados son acordes con el bajo nivel de expresión de PD-1. Además, Mariotti et al. describieron que en las células NK de los donantes sanos existe una reserva intracelular de PD-1 con un nivel bajo de expresión; la cual no vieron que se incrementara o se expusiera en la membrana tras la activación con IL-2 (702). En esta línea, y aunque algunos estudios han obtenido resultados opuestos tras la **activación** de las células NK (147, 703), en este trabajo sólo se observó un incremento significativo del nivel de PD-1 en determinados días y condiciones de expansión, lo que puede relacionarse con una respuesta variable de los donantes analizados frente a los estímulos. En este sentido, el **bloqueo del receptor** durante la interacción de las células NK con las líneas celulares de CCR no mejoró la citotoxicidad de éstas, ni individualmente ni en combinación con el anticuerpo anti-TIM3, pese a que las líneas analizadas expresan PD-L1. Sin embargo, en estudios que se están desarrollando actualmente en el grupo se ha observado una sobreexpresión transitoria de PD-1 en la membrana de las células NK durante el proceso de degranulación. Por lo tanto, podría ser que, en condiciones de una alta expresión de PD-L1, las células NK sí vieran afectada su capacidad citotóxica, tal y como describieron Bellucci et al. (704). En este trabajo el cultivo en condiciones 3D incrementó la expresión de PD-L1 en las líneas celulares CaCo-2 y HT-29 (apartado 4.1.2, las cuales se encuentran dentro de las más resistentes a la citotoxicidad inducida por las células NK en este modelo. Y aunque el incremento de PD-L1 en el modelo en 3D varió en función del momento de la determinación, los ensayos de citotoxicidad que se recogen en este trabajo para estas líneas celulares se correspondieron con las determinaciones más altas. No obstante, tanto para demostrar su implicación en la actividad de las células NK, serían necesarios ensayos de bloqueo en estas condiciones de cultivo. Por otro lado, la valoración del **bloqueo de PD-1 durante la activación** de estas células requeriría aumentar el tamaño de muestra. En este caso se observó una tendencia hacia una mayor actividad citotóxica que no llegó a resultar significativa. En este contexto, el efecto de

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Pembrolizumab podría deberse a una alteración en las interacciones intercelulares durante la activación, del mismo modo que se ha propuesto que ocurre entre las células NK y los linfocitos Treg en el TME, favoreciendo el grado de activación de las células NK (701).

Por lo tanto, a falta de estudios adicionales, las células NK alogénicas una vez activadas no parecen estar restringidas por los *checkpoints* considerados al enfrentarse a líneas celulares de CCR. Su administración en combinación con inhibidores de PD-1 u otros *checkpoints* podría mejorar su resultado al considerar su acción dentro del TME, dado que en este caso podrían recibir señales de inhibición de un mayor número de células y no sólo de las células tumorales.

4.4 Evaluación de la capacidad anti-tumoral de las células NK alogénicas expandidas sobre CCR en un modelo de xenotrasplante en ratón.

4.4.1 Tratamiento de tumores subcutáneos de líneas celulares de CCR con células NK expandidas

Hasta el momento, las células NK activadas habían mostrado ser capaces de eliminar a las líneas celulares de CCR, cultivadas *in vitro* en modelo 2D y 3D. Además, se había conseguido establecer un protocolo que permitía expandir adecuadamente estas células. Es por ello que se planteó estudiar la capacidad de las células NK alogénicas para controlar el desarrollo del CCR *in vivo*.

Se diseñó un modelo de xenotrasplante subcutáneo (SC) en ratones inmunodeprimidos NSGTM, que carecen de linfocitos T y B maduros, células NK y complemento; y son deficientes en macrófagos y células dendríticas. Para la generación del tumor se seleccionó la línea celular HCT-116, ya que había resultado ser la más resistente en el modelo 3D (apartado 4.2.2. Tras su inoculación, se procedió al tratamiento de los ratones según el esquema indicado (Figura 4.34). Los ratones del grupo “**tratamiento temprano**” (Figura 4.34A) recibieron la primera dosis de células NK a día 7 post-inoculación, cuando el tumor era apreciable por palpación pero no visualmente (tamaño <50 mm³). Por otro lado, los ratones del grupo “**tratamiento tardío**” (Figura 4.34B) recibieron la primera dosis de células NK a día 9 post-inoculación, cuando el tumor era apreciable visualmente (tamaño 50-100 mm³). Los dos grupos recibieron 3 dosis de tratamiento a intervalos de 48 horas. En cada dosis se administraron 10x10⁶ células NK expandidas, provenientes de distintos donantes, en combinación con 10 µg de IL-2. Antes de cada administración, se aseguró que la pureza de las células NK era >90% (Figura 4.34C). Por su parte, el **grupo control** sólo recibió 10 µg de IL-2 en los mismos días que los demás ratones fueron tratados con células NK. A partir de entonces, se analizó el desarrollo tumoral.

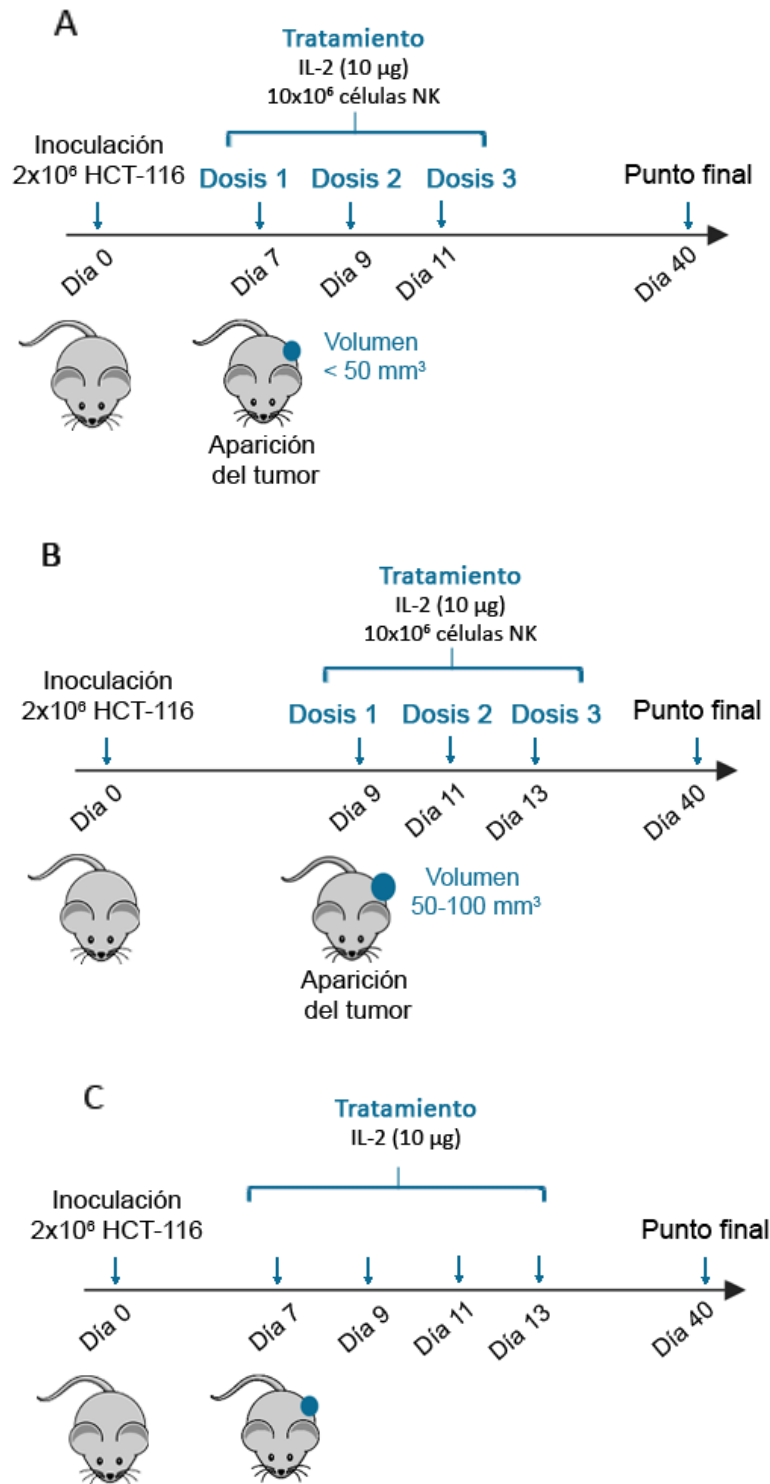


Figura 4.34 Protocolo para el tratamiento de tumores subcutáneos de CCR con células NK expandidas. Los ratones NSGTM fueron inoculados por vía SC con 2×10^6 células HCT-116. A los A) 7 días (tratamiento temprano) o B) 9 días (tratamiento tardío) se inició el esquema de tratamiento basado en la administración IP de 10×10^6 células NK y 10 μ g de IL-2 por ratón. Esta dosis se repitió 3 veces en intervalos de 48 horas. C) Los ratones control solo recibieron IL-2 en los mismos días de la administración del tratamiento.

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

Se observó que la **administración temprana** de células NK expandidas era capaz de retener el crecimiento tumoral durante el tiempo tratamiento (Figura 4.35). En tiempos posteriores, esto se tradujo en un retraso de la evolución tumoral y una mayor supervivencia. Sin embargo, la **administración tardía** de las células NK expandidas no fue capaz de retener el crecimiento tumoral (Figura 4.35), y la supervivencia de los ratones fue similar a la del grupo control.

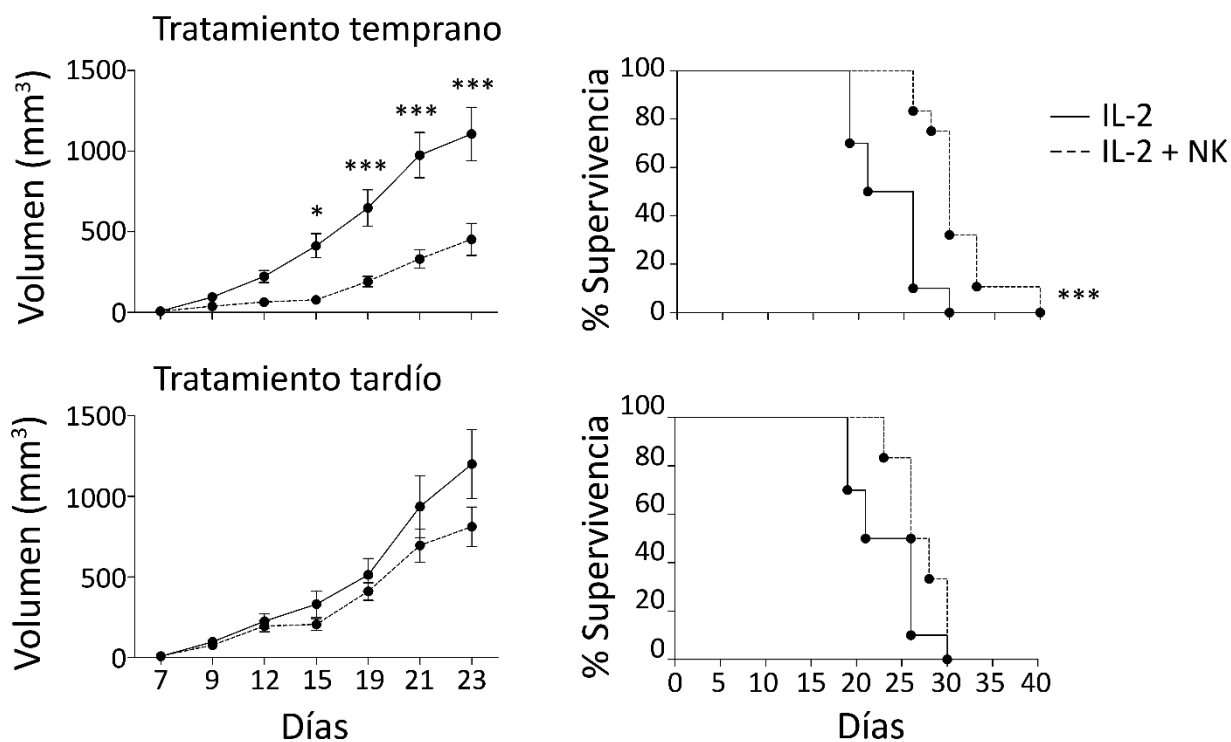


Figura 4.35 Efecto de la actuación de células NK expandidas sobre el desarrollo del CCR *in vivo*. Los ratones NSGTM fueron inoculados por vía SC con 2×10^6 células HCT-116. A los 7 días se inició tratamiento temprano, y a los 9 días el tratamiento tardío, con 10×10^6 de células NK y $10 \mu\text{g}$ de IL-2 por ratón (línea punteada). Esta dosis se repitió 3 veces en intervalos de 48 horas. Los ratones control solo recibieron IL-2 sola en los mismos días de la administración del tratamiento (línea continua). Se analizó el crecimiento tumoral y la supervivencia de los ratones hasta los criterios de punto final (1000 mm^3) o hasta los 40 días desde la inoculación tumoral, tal y como se explica en materiales y métodos. Los datos representan la media \pm SEM del volumen tumoral y la supervivencia a lo largo del tiempo. Los grupos control y tratamiento temprano contaron con un total de 10 ratones en 2 experimentos independientes. El grupo tratamiento tardío contó con un total de 6 ratones en un único experimento. Se realizó el análisis estadístico ANOVA de dos factores en la gráfica del desarrollo tumoral, y el test Log-rank (Mantel-Cox) en la gráfica de supervivencia, donde $*p < 0,05$; $***p < 0,001$.

4.4.2 Discusión

Los modelos *in vivo* permiten estudiar el comportamiento de las células NK transferidas dentro de un organismo. Así, se hace posible valorar fenómenos de migración, interacción con el entorno y citotoxicidad frente a la masa tumoral. En este trabajo, gracias al modelo 3D, ya se hizo una aproximación a un estudio más fisiológico de la actividad de las células NK. No obstante, el estudio *in vivo* aportó nueva información a la evaluación de la eficacia de esta ACT.

No obstante, este modelo presenta limitaciones relacionadas con el estado de inmunodepresión de los animales. Así, el TME que desarrolla el tumor está condicionado por la ausencia de ciertas poblaciones inmunes, como linfocitos T, B y NK, y la deficiencia en macrófagos y células dendríticas. Además, es de esperar que el comportamiento de un tumor generado como xenotrasplante SC no se comporte como un modelo ortotópico (localizado en el lugar de origen del tumor primario).

Las líneas celulares humanas de CCR ya se han utilizado en otros estudios para generar modelos *in vivo* de este tipo de tumor. Algunas de las líneas celulares más utilizadas han sido la Colo-205, HT-29, HCT-116 y SW620 (624-628). Esencialmente, estos estudios se han basado en el análisis de sus propiedades de crecimiento (626, 627), invasión (629, 630), o su sensibilidad a ciertas drogas (624). Los primeros son interesantes ya que describen el comportamiento de las líneas celulares de CCR injertadas en la especie murina. Por ejemplo los tumores de la línea HCT-116 ha mostrado ser capaces de crecer más rápidamente que los de la línea HT-29, en un modelo SC (626); y en un modelo ortotópico su tasa de crecimiento también resultó superior a la de las líneas celulares DLD1 y SW620 (631). Estos estudios también delatan diferencias entre los modelos de trasplante SC y ortotópico (627, 628). Por ejemplo, algunos estudios han detectado la necesidad de implantar un mayor número de células para el establecimiento del modelo ortotópico (629). Este modelo también se caracteriza por generar metástasis hepáticas (625, 628), y una mayor infiltración de células inmunes adaptativas y células NK (en ratones nude) (628, 629). Este estudio del TME también se ha llevado a través de líneas celulares de ratón de CCR, que se pueden implantar en ratones inmunocopetentes, capaces desarrollar un TME completo y representar los procesos fisiológicos del desarrollo tumoral (629, 632, 633).

No obstante, la evaluación de un protocolo de ACT basado en células NK humanas requiere que las líneas tumorales utilizadas como diana tengan el mismo origen. La capacidad

RESULTADOS Y DSCUSIÓN

anti-tumoral de las células NK humanas activadas, en modelos *in vivo*, se ha evaluado en otros estudios frente a distintos tipos tumorales, como mieloma múltiple (634), CCR (488, 635), mama (636), o glioblastoma (637). Los esquemas de tratamiento que se han descrito son diversos. Por lo general, suelen utilizar administraciones de $2-10 \times 10^6$ de células NK, que se repiten varias veces a distintos intervalos de tiempo. También existen variaciones en las vías de administración: peritumoral, IP o intravenosa. En este trabajo, se seleccionó la administración IP para simular la migración de las células hasta el tumor. En general, todos los artículos observaron una reducción del volumen tumoral y un retraso en su crecimiento. Estos resultados son los que se obtuvieron con el tratamiento temprano con células NK expandidas. En este grupo experimental, el crecimiento tumoral comenzó a desarrollarse más rápidamente a partir del día 15 de ensayo, probablemente debido a la desaparición de las células NK transferidas. De hecho, como se ha comentado anteriormente, la vida media de las células NK es en torno a 7 días. Y en este grupo experimental la última administración del tratamiento se había realizado a día 11. Por lo tanto, se podrían plantear modificaciones del esquema de tratamiento, variando los días de administración de las células NK o incluso de la IL-2, ya que la administración concomitante de esta IL es necesaria para mantener la viabilidad de las células transferidas (331, 638, 639). Sin embargo, la administración tardía de las células NK no fue capaz de controlar el crecimiento tumoral. En este ensayo se utilizó un *pool* de células NK provenientes de distintos donantes en cada administración para asegurar que el resultado no estuviera condicionado por la complementariedad entre la línea tumoral y las células NK. Así, estos resultados pueden deberse a que la tasa de crecimiento de las células HCT-116 fuera superior a la acción citotóxica de las células NK. No obstante, se apreció una retención del crecimiento tumoral durante los días de la administración de las células NK. Aunque este resultado ha de contrastarse en nuevos experimentos que aumenten el tamaño de muestra. Independientemente, es conveniente señalar que la línea celular HCT-116 resultó ser la más resistente a la acción de las células NK en el modelo 3D. Además, en las publicaciones previas se ha descrito una tasa de replicación superior a otras líneas celulares de CCR implantadas en el modelo de ratón. Por ello, aunque son necesarios estudios adicionales, los resultados obtenidos hasta el momento apoyan la actividad anti-tumoral de las células NK en modelos *in vivo*.

CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Los resultados descritos en este trabajo permitieron obtener las siguientes conclusiones.

1. Las líneas celulares de CCR permiten representar los distintos estados moleculares y fisiopatológicas del CCR y, del mismo modo, presentan diferencias en su capacidad de establecer cultivos convencionales y 3D.
2. Existen diferencias en los patrones de expresión de los ligandos de adhesión, activación e inhibición de las células NK en las distintas líneas de CCR. Además, las condiciones de cultivo implican variaciones en la expresión de estos ligandos, que pueden afectar a la sensibilidad al ataque de las células NK.
3. La línea celular DLD-1 es la más resistente al efecto del 5-FU frente a CaCo-2, HCT-111, HT-29 y SKCO-15. Los datos para todas ellas son consistentes con el patrón de resistencia a 5-FU descrito en estudios anteriores.
4. Las células NK recién aisladas no son capaces de eliminar a las líneas celulares de CCR en cultivos 2D. Sin embargo, en las condiciones analizadas, las células NK recién aisladas de algunos donantes son capaces de inducir la muerte de los esferoides de algunas de las líneas de CCR.
5. La activación de las células NK con la línea estimuladora R69 incrementa su potencial citotóxico frente a cultivos 2D y 3D de las líneas celulares de CCR. Además, las condiciones de cultivo implican diferencias en la sensibilidad al ataque de estas células. Las líneas celulares Colo-201/Colo-205 y DLD-1 se establecen, respectivamente, como las más resistentes y la más sensible en el cultivo 2D. Mientras que la conformación 3D incrementa la resistencia de las células HCT-116, convirtiéndose en la menos sensible. La línea celular DLD-1 se mantiene como la más sensible en este modelo.
6. La sensibilidad en 2D se correlaciona con el nivel de inestabilidad cromosómica y el estado de PI3K; y la sensibilidad en 3D se correlaciona con niveles bajos de HLA-ABC y PD-L1.
7. Las células NK son capaces de infiltrar y eliminar esferoides de la línea celular HCT-116. Pero su comportamiento depende del ratio al que se enfrenten los esferoides y las células diana. Mientras que un ratio efector:diana alto muestra una mayor citotoxicidad, un ratio bajo favorece la infiltración de las células NK.
8. En las condiciones de estudio, no existe una correlación entre la citotoxicidad inducida y el porcentaje de degranulación de las células NK frente a líneas de CCR.

CONCLUSIONES

9. Las células NK activadas se ven afectadas por mutaciones en las vías de muerte celular (deficiencia en bax y bak o inhibición de las caspasas) de las líneas celulares de CCR. De hecho, las mutaciones que afectan a las proteínas pro-apoptóticas bax y bak parecen estar implicadas en la generación de resistencia modelos 3D de la línea celular HCT-116.
10. La implicación de las vías de apoptosis y necroptosis, como mecanismos de muerte celular inducidos por las células NK activadas, parecen depender de las características intrínsecas de cada línea celular de CCR. La necroptosis no parece tener un papel en la muerte de las líneas celulares CaCo-2, HCT-116 y HT-29.
11. La capacidad de proliferación de las células NK depende del estímulo utilizado. De este modo, la estimulación con ILs solas no permite una gran tasa de expansión ni el mantenimiento del cultivo de a largo plazo. La expansión con células estimuladoras LCL-EBV⁺ solas permite mantener el cultivo durante 21 días, pero genera una tasa de expansión baja. Mientras que la combinación de las ILs con células estimuladoras LCL-EBV⁺ ofrece los mejores resultados.
12. La activación y expansión de las células NK induce cambios en la expresión de los marcadores CD56 y CD16. Así, con una activación basada en células estimuladoras LCL-EBV⁺, en presencia o ausencia de ILs, aparece una nueva población definida por expresar altos niveles de ambos marcadores.
13. Las células NK activadas mantienen su potencial citotóxico a lo largo del tiempo de expansión. Además, la expansión con diferentes líneas estimuladoras, o la presencia de citoquinas, no conlleva diferencias en su citotoxicidad.
14. La expansión de las células NK en ausencia de linfocitos T no altera su tasa de expansión ni su capacidad citotóxica.
15. Las células NK recién aisladas expresan un nivel basal de los receptores NKG2A, CXCR3 y TIM-3; pero no muestran expresión (o a niveles bajos) de NKp44, CTLA-4, PD-1 o LAG-3. La activación supone un incremento del nivel y/o porcentaje de células NK que expresan NKG2A, CXCR3, NKp44 y LAG-3; pero un mantenimiento del nivel extracelular de CTLA-4 y PD-1.
16. Los ejes regulados por los receptores TIM-3 y PD-1 no parecen estar implicados en la actividad de las células NK recién aisladas, ni activadas, provenientes de donantes sanos. Mientras que el efecto de la activación de las células NK de dichos donantes, en presencia de bloqueantes de PD-1, podría suponer un beneficio en la citotoxicidad en determinadas condiciones.

CONCLUSIONES

17. Las células NK recién aisladas provenientes de los pacientes de CCR sobreexpresan el receptor PD-1, y su bloqueo podría suponer un beneficio en la capacidad citotóxica de las células NK de algunos de los pacientes.
18. A través del esquema de tratamiento considerado, las células NK expandidas son capaces de controlar el crecimiento de tumores de CCR, con mutaciones de resistencia a droga, en sus primeras fases de desarrollo, o con baja carga tumoral; pero no parecen ser capaces de controlar tumores más avanzados.

BIBLIOGRAFÍA

6. Bibliografía

1. Antón A, Anel A, Martínez-Lostao L, Pardo J, Pazo R, editors. *Inmunología tumoral e inmunoterapia del cáncer*. Zaragoza (España): Amazing Books; 2018.
2. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 6ª edición ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
3. Pardoll D. Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention. *Semin Oncol*. 2015;42(4):523-38.
4. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
5. Jackson S, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*. 2009;461(7267):1071-8.
6. Hanahan D, Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
7. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci*. 2012;125(23):5591.
8. Sounni N, Noel A. Targeting the Tumor Microenvironment for cancer therapy. *Clin Chem*. 2013;59(1):85.
9. Fridman W, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
10. Coronella JA, Telleman P, Kingsbury GA, Truong TD, Hays S, Junghans RP. Evidence for an Antigen-driven Humoral Immune Response in Medullary Ductal Breast Cancer. *Cancer Res*. 2001;61(21):7889-99.
11. Mauri C, Bosma A. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30(1):221-41.
12. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253-68.
13. Maldonado RA, von Andrian UH. How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells. *Adv Immunol*. 2010;108:111-65.
14. Bronte V, Serafini P, Mazzoni A, Segal DM, Zanovello P. L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*. 2003;24(6):301-5.
15. Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM, Ostrand-Rosenberg S. Cross-Talk between Myeloid-Derived Suppressor Cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*. 2007;179(2):977-83.
16. Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. Macrophages Regulate the Angiogenic Switch in a Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res*. 2006;66(23):11238-46.
17. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(12):921-30.
18. Nozawa H, Chiu C, Hanahan D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(33):12493-8.
19. De Larco JE, Wuertz BRK, Furcht LT. The Potential Role of Neutrophils in Promoting the Metastatic Phenotype of Tumors Releasing Interleukin-8. *Clin Cancer Res*. 2004;10(15):4895-900.
20. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell*. 2009;16(3):183-94.
21. Erez N, Truitt M, Olson P, Hanahan D. Cancer-associated fibroblasts are activated in Incipient neoplasia to orchestrate tumor-promoting inflammation in an NF-kappaB-dependent manner. *Cancer Cell*. 2010;17(2):135-47.
22. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, et al. Stromal fibroblasts present in Invasive Human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*. 2005;121(3):335-48.

23. Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y, et al. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer cell*. 2012;21(1):66-81.
24. Castermans K, Griffioen AW. Tumor blood vessels, a difficult hurdle for infiltrating leukocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1776(2):160-74.
25. Griffioen AW, Damen CA, Blijham GH, Groenewegen G. Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. *Blood*. 1996;88(2):667-73.
26. Swartz MA, Lund AW. Lymphatic and interstitial flow in the tumour microenvironment: linking mechanobiology with immunity. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:210-19.
27. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004;432(7015):332-7.
28. Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2015;15:669-82.
29. Massagué J. TGFbeta in cancer. *Cell*. 2008;134(2):215-30.
30. Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Wang H-R, Zhang Y, Wrana JL. Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*. 2005;307(5715):1603-9.
31. Desmoulière A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol*. 1993;122(1):103-11.
32. Safina A, Vandette E, Bakin AV. ALK5 promotes tumor angiogenesis by upregulating matrix metalloproteinase-9 in tumor cells. *Oncogene*. 2006;26:2407-22.
33. Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(12):4167-71.
34. Yang L, Pang Y, Moses H. TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 2010;31(6):220-7.
35. Burkholder B, Huang R-Y, Burgess R, Luo S, Jones VS, Zhang W, et al. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. *Biochim Biophys Acta* 2014;1845(2):182-201.
36. Gajewski TF, Schreiber H, Fu Y-X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol*. 2014;14(10):1014-22.
37. Mlecnik B, Tosolini M, Charoentong P, Kirilovsky A, Bindea G, Berger A, et al. Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(4):1429-40.
38. Dengel LT, Norrod AG, Gregory BL, Clancy-Thompson E, Burdick MD, Strieter RM, et al. Interferons induce CXCR3-cognate chemokine production by human metastatic melanoma. *J Immunother*. 2010;33(9):965-74.
39. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood*. 2004;104(8):2224-34.
40. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*. 2009;69(5):2000-9.
41. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJB, Deonarine A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(50):20212-7.
42. Ammirante M, Shalapour S, Kang Y, Jamieson CAM, Karin M. Tissue injury and hypoxia promote malignant progression of prostate cancer by inducing CXCL13 expression in tumor myofibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14776-81.

43. Smyth M, Dunn G, Schreiber R. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006;90:1-50.
44. Burnet M. Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br Med Bull.* 1964;20:154-8.
45. Burnet M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res.* 1970;13:1-27.
46. Thomas L. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med.* 1982;55(3-4):329-33.
47. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science.* 1974;183(4124):534-6.
48. Stutman O. Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst.* 1979;62(2):353-8.
49. Dunn G, Old L, Schreiber R. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity.* 2004;21(2):137-48.
50. Smyth M, Thia K, Street S, MacGregor D, Godfrey D, Trapani J. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med.* 2000;192(5):755-60.
51. van den Broek M, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz W, et al. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med.* 1996;184(5):1781-90.
52. Kärre K, Ljunggren H, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986;319(6055):675-8.
53. Shankaran V, Ikeda H, Bruce A, White J, Swanson P, Old L, et al. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001;410(6832):1107-11.
54. Smyth M, Crowe N, Godfrey D. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001;13(4):459-63.
55. Shinkai Y, Rathbun G, Lam K, Oltz E, Stewart V, Mendelsohn M, et al. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell.* 1992;68(5):855-67.
56. Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht L, et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *J Exp Med.* 2003;198(3):433-42.
57. Girardi M, Glusac E, Filler R, Roberts S, Propperova I, Lewis J, et al. The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ and TCR $\alpha\beta$ T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *J Exp Med.* 2003;198(5):747-55.
58. Smyth M, Thia K, Street S, Cretney E, Trapani J, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med.* 2000;191(4):661-8.
59. Dighe A, Richards E, Old L, Schreiber R. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity.* 1994;1(6):447-56.
60. Chen D, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity.* 2013;39(1):1-10.
61. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
62. Luster AD. Chemokines - Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *N Engl J Med.* 1998;338(7):436-45.
63. Kaplan D, Shankaran V, Dighe A, Stockert E, Aguet M, Old L, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(13):7556-61.
64. Xu X, Fu X, Plate J, Chong A. IFN- γ induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res.* 1998;58(13):2832-7.

65. Bromberg J, Horvath C, Wen Z, Schreiber R, Darnell JJ. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(15):7673-8.
66. Fulda S, Debatin K. IFNgamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene*. 2002;21(15):2295-308.
67. Kumar A, Commane M, Flickinger T, Horvath C, Stark G. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science*. 1997;278(5343):1630-2.
68. Coughlin C, Salhany K, Gee M, LaTemple D, Kotenko S, Ma X, et al. Tumor cell responses to IFNgamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity*. 1998;9(1):25-34.
69. Mattei F, Schiavoni G, Belardelli F, Tough DF. IL-15 is expressed by Dendritic Cells in response to Type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes Dendritic Cell activation. *J Immunol*. 2001;167(3):1179-87.
70. Almishri W, Santodomingo-Garzon T, Le T, Stack D, Mody CH, Swain MG. TNF α Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN γ Production through TNFR2. *J Inn Immun*. 2016;8(6):617-29.
71. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195(3):327-33.
72. Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature*. 1998;392(6671):86-9.
73. Engel A, Svane I, Rygaard J, Werdelin O. MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol*. 1997;45(5):463-70.
74. Svane I, Engel A, Nielsen M, Ljunggren H, Rygaard J, Werdelin O. Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol*. 1996;26(8):1844-50.
75. Street S, Trapani J, MacGregor D, Smyth M. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med*. 2002;196(1):129-34.
76. Schreiber R, Old L, Smyth M. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
77. Dunn G, Bruce A, Ikeda H, Old L, Schreiber R. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.
78. Dunn G, Old L, Schreiber R. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
79. Vesely M, Kershaw M, Schreiber R, Smyth M. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol*. 2011;29:235-71.
80. Loeb L, Loeb K, Anderson J. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(3):776-81.
81. Wirth T, Kühnel F. Neoantigen targeting-dawn of a new era in cancer immunotherapy? *Front Immunol*. 2017;8:1848.
82. Beatty G, Gladney W. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2015;21(4):687-92.
83. Schreiber H. Factors limiting effective tumor immunity. In: Paul W, editor. *Fundamental Immunology*; 2012.
84. Algarra I, Cabrera T, Garrido F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol*. 2000;61(1):65-73.
85. Rodríguez J. HLA-mediated tumor escape mechanisms that may impair immunotherapy clinical outcomes via T-cell activation. *Oncol Lett*. 2017;14(4):4415-27.
86. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology*. 2013;2(11):e26491.
87. Seliger B, Maeurer M, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today*. 2000;21(9):455-64.

88. Driessens G, Kline J, Gajewski T. Costimulatory and coinhibitory receptors in anti-tumor immunity. *Immunol Rev.* 2009;229(1):126–44.
89. Dong H, Strome S, Salomao D, Tamura H, Hirano F, Flies D, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med.* 2002;8(8):793-800.
90. Böger C, Behrens H, Krüger S, Röcken C. The novel negative checkpoint regulator VISTA is expressed in gastric carcinoma and associated with PD-L1/PD-1: A future perspective for a combined gastric cancer therapy? *Oncoimmunology.* 2017;6(4):e1293215.
91. Wang M, Zhang C, Song Y, Wang Z, Wang Y, Luo F, et al. Mechanisms of immune evasion in breast cancer. *Onco Targets Ther.* 2017;10:1561–73.
92. Butler L, Hewett P, Butler W, Cowled P. Down-regulation of Fas gene expression in colon cancer is not a result of allelic loss or gene rearrangement. *Br J Cancer.* 1998;77(9):1454–9.
93. Dennis K, Blatner N, Gounari F, Khazaie K. Current status of interleukin-10 and regulatory T-cells in cancer. *Curr Opin Oncol.* 2013;25(6):637-45.
94. Uyttenhove C, Pilotte L, Théate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003;9(10):1269-74.
95. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002;419(6908):734-8.
96. Khong H, Restifo N. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol.* 2006;3(11):999-1005.
97. Gonzalez H, Hagerling C, Werb Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes Dev.* 2018;32(19-20):1267-84.
98. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood.* 2008;112(3):461-9.
99. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132(3):536-44.
100. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer.* 1975;16(2):216-29.
101. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Europ J Immunol.* 1975;5(2):117-21.
102. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol.* 1989;47:187-376.
103. Fauriat C, Long EO, Ljunggren H-G, Bryceson YT. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010;115(11):2167-76.
104. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The dynamic life of Natural Killer cells. *Annu Rev Immunol.* 2004;22(1):405-29.
105. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol.* 2008;9(5):503-10.
106. Paust S, Senman B, von Andrian UH. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunol Rev.* 2010;235(1):286-96.
107. Bozzano F, Perrone C, Moretta L, De Maria A. NK Cell Precursors in human Bone Marrow in health and inflammation. *Front Immunol.* [Mini Review]. 2019 2019-August-28;10(2045).
108. Wu Y, Tian Z, Wei H. Developmental and functional control of Natural Killer cells by cytokines. *Front Immunol.* 2017;8:930.
109. Cichocki F, Grzywacz B, Miller JS. Human NK cell development: One road or many? *Front Immunol.* 2019;10(2078).
110. Abel AM, Yang C, Thakar MS, Malarkannan S. Natural Killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Front Immunol.* 2018;9:1869.
111. Cherrier DE, Serafini N, Di Santo JP. Innate Lymphoid Cell development: A T cell perspective. *Immunity.* 2018;48(6):1091-103.

112. Hoebeke I, De Smedt M, Stolz F, Pike-Overzet K, Staal FJT, Plum J, et al. T-, B- and NK-lymphoid, but not myeloid cells arise from human CD34+CD38-CD7+ common lymphoid progenitors expressing lymphoid-specific genes. *Leukemia*. 2006;21:311-19.
113. Stabile H, Fionda C, Santoni A, Gismondi A. Impact of bone marrow-derived signals on NK cell development and functional maturation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2018;42:13-9.
114. Renoux Virginie M, Zriwil A, Peitzsch C, Michaëlsson J, Friberg D, Soneji S, et al. Identification of a human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in fetal and adult tissues. *Immunity*. 2015;43(2):394-407.
115. Yu J, Freud AG, Caligiuri MA. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends in immunology*. 2013;34(12):573-82.
116. Scoville SD, Freud AG, Caligiuri MA. Modeling human Natural Killer cell development in the era of Innate Lymphoid Cells. *Front Immunol*. 2017;8:360.
117. Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214(1):56-72.
118. Moretta L. Dissecting CD56dim human NK cells. *Blood*. 2010;116(19):3689-91.
119. Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, et al. In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 2007;121(2):258-65.
120. Lim AI, Di Santo JP. ILC-poiesis: Ensuring tissue ILC differentiation at the right place and time. *Eur J Immunol*. 2019;49(1):11-8.
121. Zhang Y, Huang B. The development and diversity of ILCs, NK Cells and their relevance in health and diseases. In: D X, editor. *Regulation of Inflammatory Signaling in Health and Disease*. Singapore: Springer Singapore; 2017. p. 225-44.
122. Simonetta F, Pradier A, Roosnek E. T-bet and eomesodermin in NK cell development, maturation, and function. *Front Immunol*. 2016;7:241.
123. Mazzurana L, Rao A, Van Acker A, Mjösberg J. The roles for innate lymphoid cells in the human immune system. *Semin Immunopathol*. 2018;40(4):407-19.
124. Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, et al. Regulatory Innate Lymphoid cells control innate intestinal inflammation. *Cell*. 2017;171(1):201-16.e18.
125. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, et al. Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med*. 2013;5(208):208ra145-208ra145.
126. Freud AG, Keller KA, Scoville SD, Mundy-Bosse BL, Cheng S, Youssef Y, et al. NKp80 defines a critical step during human Natural Killer cell development. *Cell Rep*. 2017;16(2):379-91.
127. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 2010;116(19):3853-64.
128. Berahovich RD, Lai NL, Wei Z, Lanier LL, Schall TJ. Evidence for NK cell subsets based on chemokine receptor expression. *J Immunol*. 2006;177(11):7833-40.
129. Fogel LA, Sun MM, Geurs TL, Carayannopoulos LN, French AR. Markers of nonselective and specific NK cell activation. *J Immunol*. 2013;190(12):6269-76.
130. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The broad spectrum of human Natural Killer cell diversity. *Immunity*. 2017;47(5):820-33.
131. Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell*. 2011;142(6):847-56.
132. Majewska-Szczepanik M, Paust S, von Andrian UH, Askenase PW, Szczepanik M. Natural killer cell-mediated contact sensitivity develops rapidly and depends on interferon- α , interferon- γ and interleukin-12. *Immunology*. 2013;140(1):98-110.
133. Dokun AO, Kim S, Smith HRC, Kang H-SP, Chu DT, Yokoyama WM. Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol*. 2001;2(10):951-6.
134. Pal M, Schwab L, Yermakova A, Mace EM, Claus R, Krahl A-C, et al. Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. *Oncoimmunology*. 2017;6(6):e1317411-e.

135. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*. 2012;120(24):4751-60.
136. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331(6013):44-9.
137. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, et al. Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*. 2012;119(11):2665-74.
138. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 2016;8(357):357ra123-357ra123.
139. Bi J, Tian Z. NK Cell Exhaustion. *Front Immunol*. 2017;8:760.
140. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011;121(9):3609-22.
141. Sun C, Fu B, Gao Y, Liao X, Sun R, Tian Z, et al. TGF- β 1 Down-Regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP Expression on Human NK Cells Contributes to HBV Persistence. *PLOS Pathog*. 2012;8(3):e1002594.
142. Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, et al. High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology*. 2017;6(1):e1264562.
143. Paul S, Kulkarni N, Shilpi, Lal G. Intratumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells. *Oncoimmunology*. 2016;5(12):e1235106.
144. Yin X, Liu T, Wang Z, Ma M, Lei J, Zhang Z, et al. Expression of the inhibitory receptor TIGIT Is up-regulated specifically on NK cells with CD226 activating receptor from HIV-Infected Individuals. *Front Immunol*. 2018;9:2341.
145. Zheng Y, Li Y, Lian J, Yang H, Li F, Zhao S, et al. TNF- α -induced Tim-3 expression marks the dysfunction of infiltrating natural killer cells in human esophageal cancer. *J Transl Med*. 2019;17(1):165.
146. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J Allergy Clin Immunol*. 2017;139(1):335-46.e3.
147. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, Vély F, Vivier E, Olive D, et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(45):72961-77.
148. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):430-41.
149. Lanier LL. NK Cell Recognition. *Annu Rev Immunol*. 2004;23(1):225-74.
150. Borrego F, Ulbrecht M, Weiss EH, Coligan JE, Brooks AG. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J Exp Med*. 1998;187(5):813-8.
151. Chapman TL, Heikema AP, Bjorkman PJ. The inhibitory receptor LIR-1 uses common binding interaction to recognize class I MHC molecules and the viral homolog UL18. *Immunity*. 1999;11(5):603-13.
152. 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.
153. Meyaard L, Adema GJ, Chang C, Woollatt E, Sutherland GR, Lanier LL, et al. LAIR-1, a novel inhibitory receptor expressed on human mononuclear leukocytes. *Immunity*. 1997;7(2):283-90.

154. Lebbink RJ, de Ruiter T, Adelmeijer J, Brenkman AB, van Helvoort JM, Koch M, et al. Collagens are functional, high affinity ligands for the inhibitory immune receptor LAIR-1. *J Exp Med*. 2006;203(6):1419-25.
155. Dimitrova M, Zenarruzabeitia O, Borrego F, Simhadri VR. CD300c is uniquely expressed on CD56 bright Natural Killer Cells and differs from CD300a upon ligand recognition. *Sci Rep*. 2016;6:23942-.
156. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989-1004.
157. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, Su TT, Ji L, Sun J, et al. Fibrinogen-like Protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3. *Cell*. 2019;176(1):334-47.e12.
158. Vivier E, Nunès JA, Vély F. Natural Killer cell signaling pathways. *Science*. 2004;306(5701):1517-19.
159. Campbell KS, Purdy AK. Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations. *Immunology*. 2011;132(3):315-25.
160. Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:227-58.
161. Steinle AL, Bauer B, Vogler I, Leibelt S. C-type lectin-like NKC-encoded immunoreceptors NKp80 and NKp65 are selectively expressed by human innate lymphocyte subsets, uniquely signal via hemITAMs and facilitate tissue-specific immunosurveillance via their genetically linked ligands AICL and KACL. *J Immunol*. 2016;196(1 Supplement):202.27.
162. Diefenbach A, Raulet DH. Natural killer cells: Stress out, turn on, tune in. *Curr Biol*. 1999;9(22):R851-R3.
163. Holmes TD, El-Sherbiny YM, Davison A, Clough SL, Blair GE, Cook GP. A human NK Cell activation/inhibition threshold allows small changes in the target cell surface phenotype to dramatically alter susceptibility to NK cells. *J Immunol*. 2011;186(3):1538-45.
164. Seidel UJE, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol*. 2013;4:76.
165. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*. 2006;107(1):159-66.
166. Paul S, Lal G. The molecular mechanism of Natural Killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol*. 2017;8:1124-.
167. Ross ME, Caligiuri MA. Cytokine-induced apoptosis of human Natural Killer cells identifies a novel mechanism to regulate the innate immune response. *Blood*. 1997;89(3):910-18.
168. Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol*. 2012;91(2):299-309.
169. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How do cytotoxic lymphocytes kill cancer cells? *Clini Cancer Res*. 2015;21(22):5047-56.
170. Afshar-Sterle S, Zotos D, Bernard NJ, Scherger AK, Rödling L, Alsop AE, et al. Fas ligand-mediated immune surveillance by T cells is essential for the control of spontaneous B cell lymphomas. *Nat Med*. 2014;20:283.
171. Kottke T, Evgin L, Shim KG, Rommelfanger D, Boisgerault N, Zaidi S, et al. Subversion of NK-cell and TNF α Immune Surveillance Drives Tumor Recurrence. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(11):1029-45.
172. Krzewski K, Strominger JL. The killer's kiss: the many functions of NK cell immunological synapses. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20(5):597-605.
173. Davis DM. Assembly of the immunological synapse for T cells and NK cells. *Trends Immunol*. 2002;23(7):356-63.

174. Roda-Navarro P, Reyburn HT. Intercellular protein transfer at the NK cell immune synapse: mechanisms and physiological significance. *FASEB J.* 2007;21(8):1636-46.
175. Orange JS, Harris KE, Andzelm MM, Valter MM, Geha RS, Strominger JL. The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(24):14151-6.
176. Wurzer H, Hoffmann C, Al Absi A, Thomas C. Actin cytoskeleton straddling the immunological synapse between cytotoxic lymphocytes and cancer cells. *Cells.* 2019;8(5):463.
177. Clark RH, Stinchcombe JC, Day A, Blott E, Booth S, Bossi G, et al. Adaptor protein 3–dependent microtubule-mediated movement of lytic granules to the immunological synapse. *Nat Immunol* 2003;4(11):1111-20.
178. Stinchcombe JC, Barral DC, Mules EH, Booth S, Hume AN, Machesky LM, et al. Rab27a is required for regulated secretion in cytotoxic T lymphocytes. *J Cell Biol.* 2001;152(4):825-34.
179. Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, et al. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell.* 2003;115(4):461-73.
180. Herz J, Pardo J, Kashkar H, Schramm M, Kuzmenkina E, Bos E, et al. Acid sphingomyelinase is a key regulator of cytotoxic granule secretion by primary T lymphocytes. *Nat Immunol.* 2009;10:761-68.
181. Young JD, Cohn ZA, Podack ER. The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science.* 1986;233(4760):184-90.
182. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunol Rev.* 2010;235(1):35-54.
183. House IG, House CM, Brennan AJ, Gilan O, Dawson MA, Whisstock JC, et al. Regulation of perforin activation and pre-synaptic toxicity through C-terminal glycosylation. *EMBO reports.* 2017;18(10):1775-85.
184. Voskoboinik I, Thia M-C, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ, et al. Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A Critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8426-34.
185. Andrin C, Pinkoski MJ, Burns K, Atkinson EA, Krahenbuhl O, Hudig D, et al. Interaction between a Ca²⁺-Binding Protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-Cell granules. *Biochemistry.* 1998;37(29):10386-94.
186. Pinkoski MJ, Hobman M, Heibein JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, et al. Entry and Trafficking of Granzyme B in Target Cells During Granzyme B-Perforin–Mediated Apoptosis. *Blood.* 1998;92(3):1044-54.
187. Pardo J, Balkow S, Anel A, Simon MM. Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perf-facilitated tumor control. *Eur J Immunol.* 2002;32(10):2881-6.
188. Arias M, Martínez-Lostao L, Santiago L, Ferrandez A, Granville DJ, Pardo Jn. The Untold Story of Granzymes in Oncoimmunology: Novel Opportunities with Old Acquaintances. *Trends Cancer.* 2017;3(6):407-22.
189. Metkar SS, Wang B, Aguilar-Santelises M, Raja SM, Uhlin-Hansen L, Podack E, et al. Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: Perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity.* 2002;16(3):417-28.
190. Trapani JA. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol.* 2001;2(12):reviews3014.1–reviews.7.
191. Froelich CJ, Pardo J, Simon MM. Granule-associated serine proteases: granzymes might not just be killer proteases. *Trends Immunol.* 2009;30(3):117-23.
192. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(5):361-70.

193. Cullen SP, Adrain C, Lüthi AU, Duriez PJ, Martin SJ. Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J Cell Biol.* 2007;176(4):435-44.
194. Pardo J, Bosque A, Brehm R, Wallich R, Naval J, Müllbacher A, et al. Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol.* 2004;167(3):457-68.
195. Sánchez-Martínez D, Azaceta G, Muntasell A, Aguiló N, Núñez D, Gálvez E, et al. Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology.* 2015;4(3):e991613.
196. Jaime-Sánchez P, Catalán E, Uranga-Murillo I, Aguiló N, Santiago L, Lanuza PM, et al. Antigen-specific primed cytotoxic T cells eliminate tumour cells in vivo and prevent tumour development, regardless of the presence of anti-apoptotic mutations conferring drug resistance. *Cell Death Differ.* 2018;25(9):1536-48.
197. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Ruefli AA, Sedelies K, et al. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzyme B-mediated caspase activation. *J Exp Med.* 2000;192(10):1403-14.
198. Zhang D, Beresford PJ, Greenberg AH, Lieberman J. Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5746-51.
199. Goping IS, Sawchuk T, Underhill DA, Bleackley RC. Identification of α -tubulin as a granzyme B substrate during CTL-mediated apoptosis. *Journal of Cell Science.* 2006;119(5):858-65.
200. Browne KA, Johnstone RW, Jans DA, Trapani JA. Filamin (280-kDa Actin-binding Protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275(50):39262-6.
201. Ewen CL, Kane KP, Bleackley RC. A quarter century of granzymes. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):28-35.
202. Larsen SK, Gao Y, Basse PH. NK cells in the tumor microenvironment. *Crit Rev Oncog.* 2015;19(1-2):91-105.
203. Talerico R, Garofalo C, Carbone E. A new biological feature of Natural Killer cells: The recognition of solid tumor-derived Cancer Stem Cells. *Front Immunol.* 2016;7:179.
204. López-Soto A, Gonzalez S, Smyth MJ, Galluzzi L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell.* 2017;32(2):135-54.
205. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2014;44(6):1582-92.
206. Hoechst B, Voigtlaender T, Ormandy L, Gamrekelashvili J, Zhao F, Wedemeyer H, et al. Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 2009;50(3):799-807.
207. Li T, Yi S, Liu W, Jia C, Wang G, Hua X, et al. Colorectal carcinoma-derived fibroblasts modulate natural killer cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Med Oncol.* 2013;30(3):663.
208. Balsamo M, Scordamaglia F, Pietra G, Manzini C, Cantoni C, Boitano M, et al. Melanoma-associated fibroblasts modulate NK cell phenotype and antitumor cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(49):20847-52.
209. Ghiringhelli F, Ménard C, Martin F, Zitvogel L. The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev.* 2006;214(1):229-38.
210. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005;202(8):1075-85.
211. El-Gazzar A, Groh V, Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *J Immunol.* 2013;191(4):1509-15.
212. Zingoni A, Vulpis E, Nardone I, Soriani A, Fionda C, Cippitelli M, et al. Targeting NKG2D and NKp30 ligands shedding to improve NK Cell-based immunotherapy. *Crit Rev Immunol.* 2016;36(6):445-60.

213. Lankry D, Roivis TL, Jonjic S, Mandelboim O. The interaction between CD300a and phosphatidylserine inhibits tumor cell killing by NK cells. *Eur J Immunol.* 2013;43(8):2151-61.
214. Loeffler DA, Heppner GH, Juneau PL. Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment. *Int J Cancer.* 1991;48(6):895-9.
215. Hansson M, Asea A, Ersson U, Hermodsson S, Hellstrand K. Induction of apoptosis in NK cells by monocyte-derived reactive oxygen metabolites. *J Immunol.* 1996;156(1):42-7.
216. Krzywinska E, Stockmann C. Hypoxia, metabolism and immune cell function. *Biomedicines.* 2018;6(2):56.
217. Poznanski SM, Ashkar AA. What defines NK cell functional fate: Phenotype or metabolism? *Front Immunol.* 2019;10(1414).
218. Raval RR, Sharabi AB, Walker AJ, Drake CG, Sharma P. Tumor immunology and cancer immunotherapy: summary of the 2013 SITC primer. *J Immunother Cancer.* 2014;2:14.
219. Morales A, Eiding D, Bruce A. Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors. *J Urol.* 1976;116(2):180-3.
220. Fridman WH. From Cancer Immune Surveillance to Cancer Immunoediting: Birth of Modern Immuno-Oncology. *J Immunol.* 2018;201(3):825-6.
221. Schuster M, Nechansky A, Kircheis R. Cancer immunotherapy. *Biotechnol Journal.* 2006;1(2):138-47.
222. Galluzzi L, Vacchelli E, Bravo-San Pedro J-M, Buqué A, Senovilla L, Baracco EE, et al. Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget.* 2014;5(24):12472-508.
223. Martin Lluesma S, Graciotti M, Chiang CL-L, Kandalaf LE. Does the immunocompetent status of cancer patients have an impact on therapeutic DC vaccination strategies? *Vaccines.* 2018;6(4):79.
224. Schön MP, Schön M. Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol.* 2007;157(s2):8-13.
225. Girardin SE, Boneca IG, Viala J, Chamaillard M, Labigne A, Thomas G, et al. Nod2 Is a General Sensor of Peptidoglycan through Muramyl Dipeptide (MDP) Detection. *J Biol Chem.* 2003;278(11):8869-72.
226. Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, Chilton PM, Casella CR, Mitchell TC. The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science.* 2007;316(5831):1628-32.
227. Means TK, Jones BW, Schromm AB, Shurtleff BA, Smith JA, Keane J, et al. Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on Mycobacterium tuberculosis-induced macrophage responses. *J Immunol.* 2001;166(6):4074-82.
228. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013;31(1):51-72.
229. Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Mayer A, Deshpande AD, Carpenter D, et al. Inflammatory monocyte mobilization decreases patient survival in pancreatic cancer: a role for targeting the CCL2/CCR2 axis. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3404-15.
230. Bugaut H, Bruchard M, Berger H, Derangère V, Odoul L, Euvrard R, et al. Bleomycin exerts ambivalent antitumor immune effect by triggering both immunogenic cell death and proliferation of regulatory T cells. *PLoS one.* 2013;8(6):e65181.
231. Spisek R, Charalambous A, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S, Dhodapkar MV. Bortezomib enhances dendritic cell (DC)-mediated induction of immunity to human myeloma via exposure of cell surface heat shock protein 90 on dying tumor cells: therapeutic implications. *Blood.* 2007;109(11):4839-45.
232. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F, et al. Cyclophosphamide Synergizes with Type I Interferons through Systemic Dendritic Cell Reactivation and Induction of Immunogenic Tumor Apoptosis. *Cancer Res.* 2011;71(3):768-78.
233. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res.* 2011;71(14):4821-33.

234. Martins I, Kepp O, Schlemmer F, Adjemian S, Tailler M, Shen S, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene*. 2011;30:1147.
235. Görgün G, Calabrese E, Soydan E, Hideshima T, Perrone G, Bandi M, et al. Immunomodulatory effects of lenalidomide and pomalidomide on interaction of tumor and bone marrow accessory cells in multiple myeloma. *Blood*. 2010;116(17):3227-37.
236. Chretien A-S, Le Roy A, Vey N, Prebet T, Blaise D, Fauriat C, et al. Cancer-induced alterations of NK-mediated target recognition: current and investigational pharmacological strategies aiming at restoring NK-mediated anti-tumor activity. *Front Immunol*. 2014;5:122.
237. Kuhne MR, Mulvey T, Chen S, Pan C, Chong C, Niekro W, et al. BMS-936564/MDX-1338: A Fully Human Anti-CXCR4 Antibody Induces Apoptosis In Vitro and Shows Anti Tumor Activity In Vivo. *Blood*. 2011;118(21):1543.
238. Iclozan C, Antonia S, Chiappori A, Chen D-T, Gabrilovich D. Therapeutic regulation of myeloid-derived suppressor cells and immune response to cancer vaccine in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013;62(5):909-18.
239. Tseng D, Volkmer J-P, Willingham SB, Contreras-Trujillo H, Fathman JW, Fernhoff NB, et al. Anti-CD47 antibody-mediated phagocytosis of cancer by macrophages primes an effective antitumor T-cell response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(27):11103-8.
240. Stevenson JP, Kindler HL, Pappasavvas E, Sun J, Jacobs-Small M, Hull J, et al. Immunological effects of the TGF β -blocking antibody GC1008 in malignant pleural mesothelioma patients. *Oncoimmunology*. 2013;2(8):e26218.
241. Uhl M, Aulwurm S, Wischhusen J, Weiler M, Ma JY, Almirez R, et al. SD-208, a novel transforming growth factor beta receptor I kinase inhibitor, inhibits growth and invasiveness and enhances immunogenicity of murine and human glioma cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2004;64(21):7954-61.
242. Waldmann TA. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2017;10(12):a028472
243. Rosenberg SA. IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*. 2014;192(12):5451-58.
244. Levin AM, Bates DL, Ring AM, Krieg C, Lin JT, Su L, et al. Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'. *Nature*. 2012;484(7395):529-33.
245. Lasek W, Zagozdzon R. Clinical Trials with IL-12 in Cancer Immunotherapy. *Interleukin 12: Antitumor Activity and Immunotherapeutic Potential in Oncology*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 43-75.
246. Conlon KC, Lugli E, Welles HC, Rosenberg SA, Fojo AT, Morris JC, et al. Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer. *J Clin Oncol*. 2015;33(1):74-82.
247. Robertson MJ, Stamatkin CW, Pelloso D, Weisenbach J, Prasad NK, Safa AR. A Dose-escalation study of recombinant human Interleukin-18 in combination with Ofatumumab after autologous peripheral blood stem cell transplantation for lymphoma. *J Immunother*. 2018;41(3):151-7.
248. Schmidt H, Brown J, Mouritzen U, Selby P, Fode K, Svane IM, et al. Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with Metastatic Melanoma or Renal Cell Carcinoma: A phase I trial. *Clin Cancer Res*. *Clin Cancer Res*;16(21):5312-19.
249. Waldmann TA. The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2006;6(8):595-601.
250. Petrella TM, Tozer R, Belanger K, Savage KJ, Wong R, Smylie M, et al. Interleukin-21 has activity in patients with metastatic melanoma: A Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2012;30(27):3396-401.
251. Bezu L, Kepp O, Cerrato G, Pol J, Fucikova J, Spisek R, et al. Trial watch: Peptide-based vaccines in anticancer therapy. *Oncoimmunology*. 2018;7(12):e1511506.

252. Srivatsan S, Patel JM, Bozeman EN, Imasuen IE, He S, Daniels D, et al. Allogeneic tumor cell vaccines: the promise and limitations in clinical trials. *Hum Vaccin Immunother.* 2014;10(1):52-63.
253. Mastelic-Gavillet B, Balint K, Boudousquie C, Gannon PO, Kandalaft LE. Personalized Dendritic Cell vaccines-recent breakthroughs and encouraging clinical results. *Front Immunol.* 2019;10:766-.
254. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* 2013;12(4):265-77.
255. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, et al. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(5):411-22.
256. Marin-Acevedo JA, Dholaria B, Soyano AE, Knutson KL, Chumsri S, Lou Y. Next generation of immune checkpoint therapy in cancer: new developments and challenges. *J Hematol Oncol.* 2018;11(1):39.
257. Sanmamed MF, Pastor F, Rodriguez A, Perez-Gracia JL, Rodriguez-Ruiz ME, Jure-Kunkel M, et al. Agonists of co-stimulation in cancer immunotherapy directed against CD137, OX40, GITR, CD27, CD28, and ICOS. *Semin Oncol.* 2015;42(4):640-55.
258. Melero I, Berman DM, Aznar MA, Korman AJ, Pérez Gracia JL, Haanen J. Evolving synergistic combinations of targeted immunotherapies to combat cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15:457-72.
259. De Sousa Linhares A, Leitner J, Grabmeier-Pfistershammer K, Steinberger P. Not all Immune checkpoints are created equal. *Front Immunol.* 2018;9(1909).
260. Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. Anti-PD-1 and anti-CTLA-4 therapies in cancer: mechanisms of action, efficacy, and limitations. *Front Oncol.* 2018;8:86.
261. Alsaab HO, Sau S, Alzhrani R, Tatiparti K, Bhise K, Kashaw SK, et al. PD-1 and PD-L1 checkpoint signaling inhibition for cancer immunotherapy: Mechanism, combinations, and clinical outcome. *Front Pharmacol.* 2017;8:561.
262. Lin H, Wei S, Hurt EM, Green MD, Zhao L, Vatan L, et al. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest.* 2018;128(2):805-15.
263. Darvin P, Toor SM, Sasidharan Nair V, Elkord E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med.* 2018;50(12):165.
264. Woo S-R, Turnis ME, Goldberg MV, Bankoti J, Selby M, Nirschl CJ, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res.* 2012;72(4):917-27.
265. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med.* 2010;207(10):2187-94.
266. Kim N, Kim HS. Targeting checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of Natural Killer cells. *Front Immunol.* 2018;9:2041.
267. Kimiz-Gebologlu I, Gulce-Iz S, Biray-Avci C. Monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. *Mol Biol Rep.* 2018;45(6):2935-40.
268. Humblet Y. Cetuximab: an IgG(1) monoclonal antibody for the treatment of epidermal growth factor receptor-expressing tumours. *Expert Opin Pharmacother.* 2004;5(7):1621-33.
269. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber H-P, Novotny W. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(5):391-400.
270. Scott SD. Rituximab: A new therapeutic monoclonal antibody for Non-Hodgkin's Lymphoma. *Cancer Pract.* 1998;6(3):195-7.
271. Rowe JM, Löwenberg B. Gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia: a remarkable saga about an active drug. *Blood.* 2013;121(24):4838-41.

272. Linke R, Klein A, Seimetz D. Catumaxomab: clinical development and future directions. *mAbs*. 2010 Mar-Apr;2(2):129-36.
273. Bargou R, Leo E, Zugmaier G, Klinger M, Goebeler M, Knop S, et al. Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody. *Science*. 2008;321(5891):974-7.
274. Krishnamurthy A, Jimeno A. Bispecific antibodies for cancer therapy: A review. *Pharmacol Ther*. 2018;185:122-34.
275. Runcie K, Budman DR, John V, Seetharamu N. Bi-specific and tri-specific antibodies- the next big thing in solid tumor therapeutics. *Mol Med*. 2018;24(1):50.
276. Sedykh SE, Prinz VV, Buneva VN, Nevinsky GA. Bispecific antibodies: design, therapy, perspectives. *Drug Des Devel Ther*. 2018;12:195-208.
277. Zhuang H, Xue Z-y, Wang L, Li X-y, Zhang N, Zhang R-x. Efficacy and immune mechanisms of cetuximab for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Clin Oncol Cancer Res*. 2011;8(4):207-14.
278. Marelli G, Howells A, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic viral therapy and the immune system: A double-edged sword against cancer. *Front Immunol*. 2018;9:866-.
279. Russell SJ, Peng K-W, Bell JC. Oncolytic virotherapy. *Nat Biotechnol*. 2012;30(7):658-70.
280. Vähä-Koskela MJV, Heikkilä JE, Hinkkanen AE. Oncolytic viruses in cancer therapy. *Cancer Letters*. 2007;254(2):178-216.
281. Conry RM, Westbrook B, McKee S, Norwood TG. Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Hum Vaccin Immunother*. 2018;14(4):839-46.
282. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*. 1982;155(6):1823-41.
283. Fagan E, Eddleston A. Immunotherapy for cancer: the use of lymphokine activated killer (LAK) cells. *Gut*. 1987;28(2):113-6.
284. Rosenberg SA, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, Chang AE, Schwartzentruber DJ, et al. Prospective randomized trial of high-dose Interleukin-2 alone or in conjunction with Lymphokine-Activated Killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1993;85(8):622-32.
285. Stephane P, Bastien C, Acres RB. Improvement of Adoptive Cellular Immunotherapy of Human Cancer Using Ex-Vivo Gene Transfer. *Curr Gen Ther*. 2002;2(1):91-100.
286. Pittari G, Filippini P, Gentilcore G, Grivel J-C, Rutella S. Revving up Natural Killer cells and Cytokine-Induced Killer cells against hematological malignancies. *Front Immunol*. 2015;6(230):1823-41.
287. West EJ, Scott KJ, Jennings VA, Melcher AA. Immune activation by combination human lymphokine-activated killer and dendritic cell therapy. *Br J Cancer*. 2011;105:787-95.
288. Gao X, Mi Y, Guo N, Xu H, Xu L, Gou X, et al. Cytokine-Induced Killer cells as pharmacological Ttools for cancer immunotherapy. *Front Immunol* 2017;8:774-.
289. Yee C, Thompson JA, Byrd D, Riddell SR, Roche P, Celis E, et al. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: In vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):16168-73.
290. June C. Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest*. 2007;117(6):1466-76.
291. Mitchell MS, Darrah D, Yeung D, Halpern S, Wallace A, Volland J, et al. Phase I trial of adoptive immunotherapy with cytolytic T lymphocytes immunized against a tyrosinase epitope. *J Clin Oncol*. 2002;20(4):1075-86.
292. Durai M, Krueger C, Ye Z, Cheng L, Mackensen A, Oelke M, et al. In vivo functional efficacy of tumor-specific T cells expanded using HLA-Ig based artificial antigen presenting cells (aAPC). *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58(2):209-20.

293. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.
294. Lee S, Margolin K. Tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma. *Curr Oncol Rep*. 2012;14(5):468-74.
295. Gross G, Waks T, Eshhar Z. Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989;86(24):10024-8.
296. Sadelain M, Brentjens R, Rivière I. The Basic Principles of Chimeric Antigen Receptor Design. *Cancer Discov*. 2013;3(4):388-98.
297. Guest RD, Hawkins RE, Kirillova N, Cheadle EJ, Arnold J, O'Neill A, et al. The role of extracellular spacer regions in the optimal design of chimeric immune receptors: evaluation of four different scFvs and antigens. *J Immunother*. 2005;28(3):203-11.
298. van der Stegen SJC, Hamieh M, Sadelain M. The pharmacology of second-generation chimeric antigen receptors. *Nat Rev Drug Discov*. 2015;14:499-509.
299. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3392-400.
300. Androulla NM, Lefkothea CP. CAR T-cell Therapy: A New Era in Cancer Immunotherapy. *Curr Pharm Biotechnol*. 2018;19(1):5-18.
301. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Res*. 2011;71(17):5697-706.
302. Chmielewski M, Abken H. CAR T Cells Releasing IL-18 Convert to T-Bethigh FoxO1low Effectors that Exhibit Augmented Activity against Advanced Solid Tumors. *Cell Rep*. 2017;21(11):3205-19.
303. Petersen CT, Krenciute G. Next generation CAR T cells for the immunotherapy of high-grade glioma. *Front Oncol*. 2019;9:69.
304. De Munter S, Ingels J, Goetgeluk G, Bonte S, Pille M, Weening K, et al. Nanobody based dual specific CARs. *Int J Mol Sci*. 2018;19(2):pii: E403.
305. Wilkie S, Burbridge SE, Chiapero-Stanke L, Pereira ACP, Cleary S, van der Stegen SJC, et al. Selective expansion of chimeric antigen receptor-targeted T-cells with potent effector function using Interleukin-4. *J Biol Chem*. 2010;285(33):25538-44.
306. Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2013;2(7):e105-e.
307. Wilkie S, van Schalkwyk MCI, Hobbs S, Davies DM, van der Stegen SJC, Pereira ACP, et al. Dual targeting of ErbB2 and MUC1 in breast cancer using chimeric antigen receptors engineered to provide complementary signaling. *J Clin Immunol*. 2012;32(5):1059-70.
308. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, et al. T Cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med*. 2018;3(95):95ra73.
309. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365(8):725-33.
310. Kosti P, Maher J, Arnold JN. Perspectives on Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapy for solid tumors. *Frontiers in Immunology*. 2018;9(1104).
311. Martinez M, Moon EK. CAR T cells for solid tumors: New strategies for finding, infiltrating, and surviving in the tumor microenvironment. *Front Immunol*. 2019;10:128.
312. Berg SL, Cairo MS, Russell H, Ayello J, Ingle AM, Lau H, et al. Safety, pharmacokinetics, and immunomodulatory effects of lenalidomide in children and adolescents with relapsed/refractory solid tumors or myelodysplastic syndrome: a Children's Oncology Group Phase I Consortium report. *J Clin Oncol*. 2011;29(3):316-23.

313. Shi J, Tricot GJ, Garg TK, Malaviarachchi PA, Szmania SM, Kellum RE, et al. Bortezomib down-regulates the cell-surface expression of HLA class I and enhances natural killer cell-mediated lysis of myeloma. *Blood*. 2008;111(3):1309-17.
314. Soriani A, Zingoni A, Cerboni C, Iannitto ML, Ricciardi MR, Di Gialleonardo V, et al. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood*. 2009;113(15):3503-11.
315. Becker PSA, Suck G, Nowakowska P, Ullrich E, Seifried E, Bader P, et al. Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2016;65(4):477-84.
316. Locatelli F, Pende D, Mingari MC, Bertaina A, Falco M, Moretta A, et al. Cellular and molecular basis of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in the successful treatment of high-risk leukemias: role of alloreactive NK cells. *Front Immunol*. 2013;4:15.
317. Reisner Y, Kapoor N, Kirkpatrick D, Pollack MS, Cunningham-Rundles S, Dupont B, et al. Transplantation for severe combined immunodeficiency with HLA-A,B,D,DR incompatible parental marrow cells fractionated by soybean agglutinin and sheep red blood cells. *Blood*. 1983;61(2):341-8.
318. Hercend T, Takvorian T, Nowill A, Tantravahi R, Moingeon P, Anderson KC, et al. Characterization of natural killer cells with antileukemia activity following allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*. 1986;67(3):722-8.
319. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, et al. Effectiveness of donor Natural Killer cell alloreactivity in Mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 2002;295(5562):2097-100.
320. Aversa F, Martelli MF, Velardi A. Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation with a megadose T-Cell-Depleted graft: Harnessing natural and adaptive immunity. *Seminars in Oncology*. 2012;39(6):643-52.
321. Cooley S, Weisdorf D. Natural killer cells and tumor control. *Curr Opin Hematol*. 2010;17(6):514-21.
322. Chabannon C, Mfarrej B, Guia S, Ugolini S, Devillier R, Blaise D, et al. Manufacturing Natural Killer cells as medicinal products. *Front Immunol*. 2016;7(504).
323. Cooley S, Weisdorf DJ, Guethlein LA, Klein JP, Wang T, Le CT, et al. Donor selection for natural killer cell receptor genes leads to superior survival after unrelated transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2010;116(14):2411-9.
324. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, et al. IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant*. 2003;32(2):177-86.
325. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res*. 2011;17(19):6287-97.
326. Hu W, Wang G, Huang D, Sui M, Xu Y. Cancer Immunotherapy Based on Natural Killer Cells: Current Progress and New Opportunities. *Front Immunol*. [Review]. 2019 2019-May-31;10(1205).
327. Leung W, Handgretinger R, Iyengar R, Turner V, Holladay MS, Hale GA. Inhibitory KIR-HLA receptor-ligand mismatch in autologous haematopoietic stem cell transplantation for solid tumour and lymphoma. *Br J Cancer*. 2007;97(4):539-42.
328. Klingemann H, Grodman C, Cutler E, Duque M, Kadidlo D, Klein AK, et al. Autologous stem cell transplant recipients tolerate haploidentical related-donor natural killer cell-enriched infusions. *Transfusion*. 2013;53(2):412-1.
329. Koehl U, Esser R, Zimmermann S, Tonn T, Kotchetkov R, Bartling T, et al. Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr*. 2005;217(06):345-50.

330. Veluchamy JP, Kok N, van der Vliet HJ, Verheul HMW, de Gruijl TD, Spanholtz J. The rise of allogeneic Natural Killer cells as a platform for cancer immunotherapy: Recent innovations and future developments. *Front Immunol.* 2017;8:631-.
331. Miller J, Soignier Y, Panoskaltzis-Mortari A, McNearney S, Yun G, Fautsch S, et al. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood.* 2005;105(8):3051-7.
332. Curti A, Ruggeri L, Addio A, Bontadini A, Dan E, Motta MR, et al. Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2011;118(12):3273-79.
333. Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, et al. A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy.* 2011;13(1):98-107.
334. Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, Doufexis D, Ardavanis A, Baxevanis CN, et al. A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010;59(12):1781-9.
335. Guillerey C, Huntington ND, Smyth MJ. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nature Immunology.* 2016;17(9):1025-36.
336. Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res.* 2001;10(4):535-44.
337. Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, Sehgal A, Im A, Hou J-Z, et al. Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using "off-the-shelf" activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy.* 2017;19(10):1225-32.
338. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *New England Journal of Medicine.* 1989;321(17):1174-8.
339. Spanholtz J, Tordoir M, Eissens D, Preijers F, van der Meer A, Joosten I, et al. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PloS one.* 2010;5(2):e9221-e.
340. Condiotti R, Zakai YB, Barak V, Nagler A. Ex vivo expansion of CD56+ cytotoxic cells from human umbilical cord blood. *Exp Hematol.* 2001;29(1):104-13.
341. Sanchez-Martinez D, Allende-Vega N, Orecchioni S, Talarico G, Cornillon A, Vo D, et al. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics.* 2018;8(14):3856-69.
342. Chouaib S, Pittari G, Nanbakhsh A, El Ayoubi H, Amsellem S, Bourhis J-H, et al. Improving the outcome of leukemia by natural killer cell-based immunotherapeutic strategies. *Front Immunol.* 2014;5:95.
343. Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monge J, Santos S, Vesga MA, Maruri N, et al. Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol.* 2014;5:439-.
344. Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LJN, et al. Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(4):274-83.
345. Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann S-Y, Kloess S, Bremm M, et al. Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol.* 2013;3:118.
346. Granzin M, Wagner J, Köhl U, Cerwenka A, Huppert V, Ullrich E. Shaping of Natural Killer cell antitumor activity by ex vivo cultivation. *Front Immunol.* 2017;8:458.
347. London L, Perussia B, Trinchieri G. Induction of proliferation in vitro of resting human natural killer cells: IL 2 induces into cell cycle most peripheral blood NK cells, but only a minor subset of low density T cells. *J Immunol.* 1986;137(12):3845-54.

348. Henney CS, Kuribayashi K, Kern DE, Gillis S. Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*. 1981;291(5813):335-8.
349. Liu C-C, Perussia B, Young JD-E. The emerging role of IL-15 in NK-cell development. *Immunol Today*. 2000;21(3):113-6.
350. Carson WE, Fehniger TA, Haldar S, Eckhert K, Lindemann MJ, Lai CF, et al. A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J Clin Invest*. 1997;99(5):937-43.
351. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. *J Exp Med*. 2003;197(8):967-76.
352. Kogure T, Mantani N, Goto H, Shimada Y, Tamura Ji, Terasawa K. The effect of interleukin-15 on the expression of killer-cell immunoglobulin-like receptors on peripheral natural killer cells in human. *Mediators Inflamm*. 2002;11(4):219-24.
353. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, Tagaya Y. IL-15R α Recycles and Presents IL-15 In trans to Neighboring Cells. *Immunity*. 2002;17(5):537-47.
354. Rubinstein MP, Kovar M, Purton JF, Cho J-H, Boyman O, Surh CD, et al. Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R α . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(24):9166-71.
355. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, et al. Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*. 2009;69(9):4010-7.
356. Rabinowich H, Herberman RB, Whiteside TL. Differential effects of IL12 and IL2 on expression and function of cellular adhesion molecules on purified human Natural Killer cells. *Cell Immunol*. 1993;152(2):481-98.
357. Parihar R, Dierksheide J, Hu Y, Carson WE. IL-12 enhances the natural killer cell cytokine response to Ab-coated tumor cells. *J Clin Invest*. 2002;110(7):983-92.
358. Lehmann D, Spanholtz J, Sturtzel C, Tordoir M, Schlechta B, Groenewegen D, et al. IL-12 directs further maturation of ex Vivo differentiated NK cells with improved therapeutic potential. *PLOS ONE*. 2014;9(1):e87131.
359. Ferlazzo G, Pack M, Thomas D, Paludan C, Schmid D, Strowig T, et al. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(47):16606-11.
360. Park Y-K, Shin D-J, Cho D, Kim S-K, Lee J-J, Shin M-G, et al. Interleukin-21 increases direct cytotoxicity and IFN- γ production of Ex Vivo Expanded NK cells towards breast cancer cells. *Anticancer Res*. 2012;32(3):839-46.
361. Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS, Phatarpekar PV, Kopp LM, Johnson JL, et al. Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PloS one*. 2012;7(1):e30264-e.
362. Senju H, Kumagai A, Nakamura Y, Yamaguchi H, Nakatomi K, Fukami S, et al. Effect of IL-18 on the expansion and phenotype of human Natural Killer cells: Application to cancer immunotherapy. *Int J Biol Sci*. 2018;14(3):331-40.
363. Lim SA, Kim T-J, Lee JE, Sonn CH, Kim K, Kim J, et al. Ex Vivo Expansion of Highly Cytotoxic Human NK Cells by Cocultivation with Irradiated Tumor Cells for Adoptive Immunotherapy. *Cancer Res*. 73(8):2598-607.
364. Perussia B, Ramoni C, Anegón I, Cuturi M, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 1987;6(4):171-88.
365. Berg M, Lundqvist A, McCoy P, Jr., Samsel L, Fan Y, Tawab A, et al. Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy*. 2009;11(3):341-55.
366. Lim SA, Kim T-J, Lee JE, Sonn CH, Kim K, Kim J, et al. Ex vivo expansion of highly cytotoxic human NK Cells by cocultivation with irradiated tumor cells for adoptive immunotherapy. *Cancer Res*. 2013;73(8):2598-607.

367. Lim D-P, Jang Y-Y, Kim S, Koh SS, Lee J-J, Kim J-S, et al. Effect of exposure to interleukin-21 at various time points on human natural killer cell culture. *Cytotherapy*. 2014;16(10):1419-30.
368. Cho D, Campana D. Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J Lab Med*. 2009;29(2):89-96.
369. Perez SA, Mahaira LG, Demirtzoglou FJ, Sotiropoulou PA, Ioannidis P, Iliopoulou EG, et al. A potential role for hydrocortisone in the positive regulation of IL-15-activated NK-cell proliferation and survival. *Blood*. 2005;106(1):158.
370. Natural killer cells for cancer immunotherapy: a new CAR is catching up. *Journal [serial on the Internet]*. 2019 Date; 39: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30685121>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6355444/>.
371. Glienke W, Esser R, Priesner C, Suerth JD, Schambach A, Wels WS, et al. Advantages and applications of CAR-expressing natural killer cells. *Frontiers in pharmacology*.6:21-.
372. Mehta RS, Rezvani K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Frontiers in Immunology*. [Review]. 2018-February-15;9(283).
373. Chang Y-H, Connolly J, Shimasaki N, Mimura K, Kono K, Campana D. A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances Natural Killer cell activation and killing of tumor cells. *Cancer Res*. 2013;73(6):1777.
374. Altvater B, Landmeier S, Pscherer S, Temme J, Schweer K, Kailayangiri S, et al. 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Clin Cancer Res*. 2009;15(15):4857-66.
375. Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM. Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog*. 2014;19(1-2):121-32.
376. 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-.
377. Fang F, Xiao W, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Semin Immunol*. 2017;31:37-54.
378. Melero I, Rouzaut A, Motz GT, Coukos G. T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy. *Cancer discovery*. 2014;4(5):522-6.
379. Reslan L, Dalle S, Dumontet C. Understanding and circumventing resistance to anticancer monoclonal antibodies. *mAbs*. 2009;1(3):222-9.
380. Jenkins RW, Barbie DA, Flaherty KT. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer*. 2018;118:9.
381. van Brummelen EMJ, Ros W, Wolbink G, Beijnen JH, Schellens JHM. Antidrug antibody formation in oncology: clinical relevance and challenges. *Oncologist*. 2016;21(10):1260-8.
382. Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM, Rosenberg SA. Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2. *Mol Ther*. 2010;18(4):843-51.
383. Fedorov VD, Themeli M, Sadelain M. PD-1- and CTLA-4-based inhibitory Chimeric Antigen Receptors (iCARs) divert off-target immunotherapy responses. *Sci Transl Med*. 2013;5(215):215ra172.
384. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394-424.
385. 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):197.
386. Vuik FER, Nieuwenburg SAV, Bardou M, Lansdorp-Vogelaar I, Dinis-Ribeiro M, Bento MJ, et al. Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*. 2019;gutjnl-2018-317592.

387. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2017;3(4):464-71.
388. Rutter MD. Surveillance programmes for neoplasia in colitis. *J Gastroenterol.* 2011;46(1):1-5.
389. Drewes JL, Housseau F, Sears CL. Sporadic colorectal cancer: microbial contributors to disease prevention, development and therapy. *Br J Cancer.* 2016;115(3):273-80.
390. Bates RC, Pursell BM, Mercurio AM. Epithelial-Mesenchymal Transition and Colorectal Cancer: gaining insights into tumor progression using LIM 1863 cells. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):29-39.
391. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(6):442-54.
392. Ahnen D. The American College of Gastroenterology Emily Couric Lecture--the adenoma-carcinoma sequence revisited: has the era of genetic tailoring finally arrived? *Am J Gastroenterol.* 2011;106(2):190-8.
393. Najdi R, Holcombe RF, Waterman ML. Wnt signaling and colon carcinogenesis: beyond APC. *J Carcinog.* 2011;10:5.
394. Kolligs FT, Bommer G, Göke B. Wnt/Beta-Catenin/Tcf Signaling: A Critical Pathway in Gastrointestinal Tumorigenesis. *Digestion.* 2002;66(3):131-44.
395. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2059-72.
396. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.e3.
397. Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, et al. Demonstration that mutation of the Type II transforming growth factor β receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem.* 1995;270(37):22044-9.
398. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in Mismatch Repair-deficient human cancers. *Cancer Res.* 2002;62(9):2447.
399. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet.* 2006;38(7):787-93.
400. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1997;57(5):808-11.
401. Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008;10(1):13-27.
402. Hagggar FA, Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009;22(4):191-7.
403. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990;61(5):759-67.
404. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-8.
405. Hemminki A, Peltomäki P, Mecklin J-P, Järvinen H, Salovaara R, Nyström-Lahti M, et al. Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet.* 1994;8(4):405-10.
406. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010;138(6):2044-58.
407. Stoffel EM, Kastrinos F. Familial colorectal cancer, beyond Lynch syndrome. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association.* 2013;12(7):1059-68.
408. Grady WM. CIMP and colon cancer gets more complicated. *Gut.* 2007;56(11):1498-500.

409. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med*. 2015;21(11):1350-6.
410. Rennoll S, Yochum G. Regulation of MYC gene expression by aberrant Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *World J Biol Chem*. 2015;6(4):290-300.
411. Morkel M, Riemer P, Bläker H, Sers C. Similar but different: distinct roles for KRAS and BRAF oncogenes in colorectal cancer development and therapy resistance. *Oncotarget*. 2015;6(25):20785-800.
412. Roth A, Tejpar D, Delorenzi M, Yan R, Fiocca R, Klingbiel D, et al. Prognostic Role of KRAS and BRAF in stage II and III resected Colon Cancer: Results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(3):466-74.
413. Rosty C, Young JP, Walsh MD, Clendenning M, Sanderson K, Walters RJ, et al. PIK3CA activating mutation in colorectal carcinoma: associations with molecular features and survival. *PloS one*. 2013;8(6):e65479.
414. Atreya CE, Sangale Z, Xu N, Matli MR, Tikishvili E, Welbourn W, et al. PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival. *Cancer Med*. 2013;2(4):496-506.
415. Popat S, Zhao D, Chen Z, Pan H, Shao Y, Chandler IAN, et al. Relationship between Chromosome 18q Status and Colorectal Cancer Prognosis: A Prospective, Blinded Analysis of 280 Patients. *Anticancer Res*. 2007;27(1B):627-33.
416. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer*. 2005;92(3):434-44.
417. Blanco-Calvo M, Concha Á, Figueroa A, Garrido F, Valladares-Ayerbes M. Colorectal cancer classification and cell heterogeneity: a systems oncology approach. *Int J Mol Sci*. 2015;16(6):13610-32.
418. Testa U, Pelosi E, Castelli G. Colorectal cancer: genetic abnormalities, tumor progression, tumor heterogeneity, clonal evolution and tumor-initiating cells. *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 2018;6(2):31.
419. Roelands J, Kuppen PJK, Vermeulen L, Maccalli C, Decock J, Wang E, et al. Immunogenomic Classification of Colorectal Cancer and Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2017;18(10):2229.
420. Williams DS, Bird MJ, Jorissen RN, Yu YL, Walker F, Zhang HH, et al. Nonsense mediated decay resistant mutations are a source of expressed mutant proteins in colon cancer cell lines with microsatellite instability. *PloS one*. 2010;5(12):e16012.
421. Becht E, de Reyniès A, Giraldo NA, Pilati C, Buttard B, Lacroix L, et al. Immune and stromal classification of colorectal cancer is associated with molecular subtypes and relevant for precision immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016;22(16):4057-66.
422. Eriksen AC, Sørensen FB, Lindebjerg J, Hager H, dePont Christensen R, Kjær-Frifeldt S, et al. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in stage II Colon Cancer. A nationwide population-based study. *Transl Oncol*. 2018;11(4):979-87.
423. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1506-12.
424. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, Angell HK, Berger A, Lagorce C, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol*. 2014;232(2):199-209.
425. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2001 2019/09/02;91(12):2417-22.
426. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
427. Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, et al. Immunoselective Pressure and Human Leukocyte Antigen Class I Antigen Machinery Defects in Microsatellite Unstable Colorectal Cancers. *Cancer Res*. 2005;65(14):6418.

428. de Vries NL, van Unen V, Ijsselsteijn ME, Abdelaal T, van der Breggen R, Farina Sarasqueta A, et al. High-dimensional cytometric analysis of colorectal cancer reveals novel mediators of antitumour immunity. *Gut*. 2019;gutjnl-2019-318672.
429. Simpson JAD, Al-Attar A, Watson NFS, Scholefield JH, Ilyas M, Durrant LG. Intratumoral T cell infiltration, MHC class I and STAT1 as biomarkers of good prognosis in colorectal cancer. *Gut*. 2010;59(7):926-33.
430. Menon AG, Morreau H, Tollenaar RAEM, Alphenaar E, van Puijenbroek M, Putter H, et al. Down-regulation of HLA-A expression correlates with a better prognosis in Colorectal Cancer patients. *Lab Invest*. 2002;82(12):1725-33.
431. Speetjens FM, de Bruin EC, Morreau H, Zeestraten ECM, Putter H, van Krieken JH, et al. Clinical impact of HLA class I expression in rectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2008;57(5):601-9.
432. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, et al. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997;79(12):2320-8.
433. Sconocchia G, Eppenberger S, Spagnoli GC, Tornillo L, Drosner R, Caratelli S, et al. NK cells and T cells cooperate during the clinical course of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2014;3(8):e952197.
434. Halama N, Braun M, Kahlert C, Spille A, Quack C, Rahbari N, et al. Natural Killer Cells are scarce in Colorectal Carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin Cancer Res*. 2011;17(4):678-89.
435. Zhang R-L, Zhang X, Dong S-S, Hu B, Han Q-Y, Zhang J-G, et al. Predictive value of different proportion of lesion HLA-G expression in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(64):107441-51.
436. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JGH, Natanov R, Putter H, Smit VTHBM, et al. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol*. 2010;185(12):7452-9.
437. Ye S-r, Yang H, Li K, Dong D-d, Lin X-m, Yie S-m. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2007;20(3):375-83.
438. André P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, et al. Anti-NKG2A mAb Is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK Cells. *Cell*. 2018;175(7):1731-43.e13.
439. Levy E, Bianchini M, Von Euw E, Barrio M, Bravo A, Furman D, et al. Human leukocyte antigen-E protein is overexpressed in primary human colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2008;32(3):633-41.
440. Bossard C, Bézieau S, Matysiak-Budnik T, Volteau C, Laboisie CL, Jotereau F, et al. HLA-E/ β 2 microglobulin overexpression in colorectal cancer is associated with recruitment of inhibitory immune cells and tumor progression. *Int J Cancer*. 2012;131(4):855-63.
441. Watson NFS, Spendlove I, Madjd Z, McGilvray R, Green AR, Ellis IO, et al. Expression of the stress-related MHC class I chain-related protein MICA is an indicator of good prognosis in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2006;118(6):1445-52.
442. Doubrovina ES, Doubrovin MM, Vider E, Sisson RB, O'Reilly RJ, Dupont B, et al. Evasion from NK Cell Immunity by MHC Class I Chain-Related Molecules Expressing Colon Adenocarcinoma. *J Immunol*. 2003;171(12):6891-99.
443. Ålgars A, Irjala H, Vaittinen S, Huhtinen H, Sundström J, Salmi M, et al. Type and location of tumor-infiltrating macrophages and lymphatic vessels predict survival of colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2011;131(4):864-73.
444. Sconocchia G, Zlobec I, Lugli A, Calabrese D, Iezzi G, Karamitopoulou E, et al. Tumor infiltration by Fc γ RIII (CD16)+ myeloid cells is associated with improved survival in patients with colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2011;128(11):2663-72.

445. Chifman J, Pullikuth A, Chou JW, Bedognetti D, Miller LD. Conservation of immune gene signatures in solid tumors and prognostic implications. *BMC Cancer*. 2016;16(1):911.
446. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2009;27(2):186-92.
447. Ladoire S, Martin F, Ghiringhelli F. Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2011;60(7):909-18.
448. Villalba M, Evans SR, Vidal-Vanaclocha F, Calvo A. Role of TGF- β in metastatic colon cancer: it is finally time for targeted therapy. *Cell Tissue Res*. 2017;370(1):29-39.
449. 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;554:538-43.
450. Chakravarthy A, Khan L, Bensler NP, Bose P, De Carvalho DD. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure. *Nat Commun*. 2018;9(1):4692.
451. Mishra J, Drummond J, Quazi SH, Karanki SS, Shaw JJ, Chen B, et al. Prospective of colon cancer treatments and scope for combinatorial approach to enhanced cancer cell apoptosis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012;86(3):232-50.
452. Greene F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C, Haller D, et al. *Cancer staging manual*. 6^a Edición ed.: AJCC; 2002.
453. Gustavsson B, Carlsson G, Machover D, Petrelli N, Roth A, Schmoll H-J, et al. A Review of the evolution of systemic chemotherapy in the management of colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer*. 2015;14(1):1-10.
454. Hartmann KU, Heidelberger C. Studies on fluorinated pyrimidines: XIII. Inhibition of thymidilate synthetase *Journal of Biological Chemistry*. 1961;236(11):3006-13.
455. Ullman B, Lee M, Martin DW, Jr., Santi DV. Cytotoxicity of 5-fluoro-2'-deoxyuridine: requirement for reduced folate cofactors and antagonism by methotrexate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(2):980-3.
456. Chaney SG, Campbell SL, Bassett E, Wu Y. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005;53(1):3-11.
457. Ron HJM, Walter JL, Jaap V, Alex S. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors Irinotecan (CPT-11) and Topotecan. *Curr Cancer Drug Targets*. 2002;2(2):103-23.
458. Skarkova V, Kralova V, Vitovcova B, Rudolf E. Selected aspects of chemoresistance mechanisms in Colorectal Carcinoma-A focus on Epithelial-to-Mesenchymal Transition, autophagy, and apoptosis. *Cells*. 2019;8(3):234.
459. Des Guetz Gt, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret G-Y, Morere J-F, Uzzan B. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2009;45(10):1890-6.
460. Popovici V, Budinska E, Tejpar S, Weinrich S, Estrella H, Hodgson G, et al. Identification of a poor-prognosis BRAF-mutant-like population of patients with colon cancer. *J Clin Oncol*. 2012;30(12):1288-95.
461. Iacopetta B. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2003;21(3):271-6.
462. Wang Y, Long Y, Xu Y, Guan Z, Lian P, Peng J, et al. Prognostic and predictive value of CpG island methylator phenotype in patients with locally advanced nonmetastatic sporadic colorectal cancer. *Ann Oncol*. 2014;2014:436985.
463. Williamson JS, Jones HG, Williams N, Griffiths AP, Jenkins G, Beynon J, et al. Extramural vascular invasion and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in rectal cancer: Influence of the CpG island methylator phenotype. *World J Gastrointest Oncol*. 2017;9(5):209-17.

464. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY, Juo HH, Wang H, Pappou EP, et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol.* 2014;25(12):2314-27.
465. Bignucolo A, De Mattia E, Cecchin E, Roncato R, Toffoli G. Pharmacogenomics of targeted agents for personalization of colorectal cancer treatment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(7):1522.
466. Gang W, Wang J-J, Guan R, Yan S, Shi F, Zhang J-Y, et al. Strategy to targeting the immune resistance and novel therapy in colorectal cancer. *Cancer Med.* 2018;7(5):1578-603.
467. Deming DA, Cavalcante LL, Lubner SJ, Mulkerin DL, LoConte NK, Eickhoff JC, et al. A phase I study of selumetinib (AZD6244/ARRY-142866), a MEK1/2 inhibitor, in combination with cetuximab in refractory solid tumors and KRAS mutant colorectal cancer. *Invest New Drugs.* 2015;34(2):168-75.
468. Hong DS, Morris VK, El Osta B, Sorokin AV, Janku F, Fu S, et al. Phase IB Study of Vemurafenib in Combination with Irinotecan and Cetuximab in Patients with Metastatic Colorectal Cancer with BRAFV600E Mutation. *Cancer Discov.* 2016;6(12):1352-65.
469. van Geel RMJM, Tabernero J, Elez E, Bendell JC, Spreafico A, Schuler M, et al. A Phase Ib dose-escalation study of Encorafenib and Cetuximab with or without Alpelisib in metastatic BRAF-mutant Colorectal Cancer. *Cancer Discov.* 2017;7(6):610-9.
470. Jacobs J, Smits E, Lardon F, Pauwels P, Deschoolmeester V. Immune checkpoint modulation in Colorectal Cancer: What's new and what to expect. *J Immunol Res.* 2015;2015:158038.
471. Hermel DJ, Sigal D. The emerging role of checkpoint inhibition in Microsatellite Stable Colorectal Cancer. *J Pers Med.* 2019;9(1):5.
472. Wang W, Wu L, Zhang J, Wu H, Han E, Guo Q. Chemoimmunotherapy by combining oxaliplatin with immune checkpoint blockades reduced tumor burden in colorectal cancer animal model. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;487(1):1-7.
473. Bendell J, Ciardiello F, Tabernero J, Tebbutt N, Eng C, Di Bartolomeo M, et al. LBA-004 Efficacy and safety results from IMblaze370, a randomised Phase III study comparing atezolizumab+cobimetinib and atezolizumab monotherapy vs regorafenib in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2018;29(suppl_5).
474. Bendell JC, Bang Y-J, Chee CE, Ryan DP, McRee AJ, Chow LQ, et al. A phase Ib study of safety and clinical activity of atezolizumab (A) and cobimetinib (C) in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol.* 2018;36(4_suppl):560.
475. Hodi FS, Lawrence D, Lezcano C, Wu X, Zhou J, Sasada T, et al. Bevacizumab plus ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *Cancer Immunol Res.* 2014;2(7):632-42.
476. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, et al. The effect of anti-VEGF therapy on immature myeloid cell and dendritic cells in cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(8):1115-24.
477. Uyl-de Groot CA, Vermorken JB, Hanna MG, Verboom P, Groot MT, Bonsel GJ, et al. Immunotherapy with autologous tumor cell-BCG vaccine in patients with colon cancer: a prospective study of medical and economic benefits. *Vaccine.* 2005;23(17):2379-87.
478. Schulze T, Kemmner W, Weitz J, Wernecke KD, Schirmacher V, Schlag PM. Efficiency of adjuvant active specific immunization with Newcastle disease virus modified tumor cells in colorectal cancer patients following resection of liver metastases: results of a prospective randomized trial. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;58(1):61-9.
479. Bartnik A, Nirmal AJ, Yang S-Y. Peptide vaccine therapy in Colorectal Cancer. *Vaccines.* 2012;1(1):1-16.
480. Xiang B, Snook AE, Magee MS, Waldman SA. Colorectal cancer immunotherapy. *Discov Med.* 2013;15(84):301-8.
481. Marshall JL, Hawkins MJ, Tsang KY, Richmond E, Pedicano JE, Zhu M, et al. Phase I study in cancer patients of a replication-defective avipox recombinant vaccine that expresses human carcinoembryonic antigen. *J Clin Oncol.* 1999;17(1):332.

482. Karanikas V, Hwang LA, Pearson J, Ong CS, Apostolopoulos V, Vaughan H, et al. Antibody and T cell responses of patients with adenocarcinoma immunized with mannan-MUC1 fusion protein. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2783-92.
483. Deng X, Gao F, Li N, Li Q, Zhou Y, Yang T, et al. Antitumor activity of NKG2D CAR-T cells against human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Am J Cancer Res.* 2019;9(5):945-58.
484. Choi M, Dyson G, Thakur A, Mahaseth H, Philip PA, Shields AF, et al. Phase I study of anti-CD3 x anti-EGFR-armed activated T-cells for treatment of advanced colorectal or pancreatic cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(3_suppl):698.
485. Peng H, Yao M, Fan H, Song L, Sun J, Zhou Z, et al. Effects of autologous Cytokine-Induced Killer Cells Infusion in Colorectal Cancer patients: a prospective study. *Cancer Biother Radiopharm.* 2017;32(6):221-6.
486. ClinicalTrials.gov [Internet]: Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); [cited 15/08/2019]; Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>.
487. Luna JI, Grossenbacher SK, Murphy WJ, Canter RJ. Targeting Cancer Stem Cells with natural killer cell immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2016;17(3):313-24.
488. Zhang Q, Zhang H, Ding J, Liu H, Li H, Li H, et al. Combination Therapy with EpCAM-CAR-NK-92 Cells and Regorafenib against human Colorectal Cancer models. *J Immunol Res.* 2019;2018:4263520.
489. Goubet A-G, Daillère R, Routy B, Derosa L, M. Roberti P, Zitvogel L. The impact of the intestinal microbiota in therapeutic responses against cancer. *C R Biol.* 2018;341(5):284-9.
490. Weiswald L-B, Bellet D, Dangles-Marie V. Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 2015;17(1):1-15.
491. Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multicellular spheroids. *Expert opinion on biological therapy.* 2012;12(10):1347-60.
492. Nath S, Devi GR. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther.* 2017;163:94-108.
493. Sutherland RM, Inch WR, McCredie JA, Kruuv J. A multi-component radiation survival curve using an in Vitro tumour model. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 1970;18(5):491-5.
494. Barrera-Rodríguez R, Fuentes JM. Multidrug resistance characterization in multicellular tumour spheroids from two human lung cancer cell lines. *Cancer Cell Int.* 2015;15:47.
495. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017;108(3):283-9.
496. Chandrasekaran S, Geng Y, DeLouise LA, King MR. Effect of homotypic and heterotypic interaction in 3D on the E-selectin mediated adhesive properties of breast cancer cell lines. *Biomaterials.* 2012;33(35):9037-48.
497. Kuo C-T, Wang J-Y, Lin Y-F, Wo AM, Chen BPC, Lee H. Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Sci Rep.* 2017;7(1):4363.
498. Desroches BR, Zhang P, Choi BR, King ME, Maldonado AE, Li W, et al. Functional scaffold-free 3-D cardiac microtissues: a novel model for the investigation of heart cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302(10):H2031-H42.
499. Fukuda J, Nakazawa K. Orderly arrangement of hepatocyte spheroids on a microfabricated chip. *Tissue Eng.* 2005;11(7-8):1254-62.
500. Cui X, Hartanto Y, Zhang H. Advances in multicellular spheroids formation. *J R Soc Interface.* 2017;14(127):20160877.
501. Luca AC, Mersch S, Deenen R, Schmidt S, Messner I, Schäfer K-L, et al. Impact of the 3D microenvironment on phenotype, gene expression, and EGFR inhibition of colorectal cancer cell lines. *PLoS one.* 2013;8(3):e59689.

502. Zschenker O, Streichert T, Hehlhans S, Cordes N. Genome-wide gene expression analysis in cancer cells reveals 3D growth to affect ECM and processes associated with cell adhesion but not DNA repair. *PloS one*. 2012;7(4):e34279.
503. Leung BM, Leshner-Perez SC, Matsuoka T, Moraes C, Takayama S. Media additives to promote spheroid circularity and compactness in hanging drop platform. *Biomater Sci*. 2015;3(2):336-44.
504. Tevis KM, Colson YL, Grinstaff MW. Embedded spheroids as models of the cancer microenvironment. *Adv Biosyst*. 2017;1(10):1700083.
505. Smyrek I, Mathew B, Fischer SC, Lissek SM, Becker S, Stelzer EHK. E-cadherin, actin, microtubules and FAK dominate different spheroid formation phases and important elements of tissue integrity. *Biol Open*. 2019;8(1):bio037051.
506. Jähn K, Richards R, Archer C, Stoddart M. Pellet culture model for human primary osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2010;20:149-61.
507. Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM. An efficient and flexible cell aggregation method for 3D spheroid production. *J Vis Exp*. 2017(121):55544.
508. Del Duca D, Werbowetski T, Del Maestro R. Spheroid preparation from hanging drops: characterization of a model of brain tumor invasion. *J Neurooncol*. 2004;67(3):295-303.
509. Costa EC, de Melo-Diogo D, Moreira AF, Carvalho MP, Correia IJ. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by liquid overlay technique: Considerations and practical approaches. *Biotechnol J*. 2018;13(1):1700417.
510. Goodwin T, Schroeder W, Wolf D, Moyer M. Rotating-wall vessel coculture of small intestine as a prelude to tissue modeling: aspects of simulated microgravity. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1993;202(2):181-92.
511. Sebastian A, Buckle A-M, Markx GH. Formation of multilayer aggregates of mammalian cells by dielectrophoresis. *J Micromech Microeng*. 2006;16(9):1769-77.
512. Markx GH. The use of electric fields in tissue engineering: A review. *Organogenesis*. 2008;4(1):11-7.
513. Ino K, Ito A, Honda H. Cell patterning using magnetite nanoparticles and magnetic force. *Biotechnol Bioeng*. 2007;97(5):1309-17.
514. Chen K, Wu M, Guo F, Li P, Chan CY, Mao Z, et al. Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab on a chip*. 2017;16(14):2636-43.
515. Alessandri K, Sarangi BR, Gurchenkov VV, Sinha B, Kießling TR, Fetler L, et al. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(37):14843-8.
516. Moshksayan K, Kashaninejad N, Warkiani ME, Lock JG, Moghadas H, Firoozabadi B, et al. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sensors Actuat B-Chem*. 2018;263:151-76.
517. Okuyama T, Yamazoe H, Mochizuki N, Khademhosseini A, Suzuki H, Fukuda J. Preparation of arrays of cell spheroids and spheroid-monolayer cocultures within a microfluidic device. *J Biosci Bioeng*. 2010;110(5):572-6.
518. Boussoimmier-Calleja A, Li R, Chen MB, Wong SC, Kamm RD. Microfluidics: A new tool for modeling cancer-immune interactions. *Trends Cancer*. 2016;2(1):6-19.
519. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon Cancer survival rates with the New American Joint Committee on cancer sixth edition staging. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(19):1420-5.
520. Zhao B, Wang L, Qiu H, Zhang M, Sun L, Peng P, et al. Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2017;8(3):3980-4000.
521. Sanchez-Martínez D, Krzywinska E, Rathore MG, Saumet A, Cornillon A, Lopez-Royuela N, et al. All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreases CTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cell cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49:42-52.

522. Sánchez-Martínez D, Lanuza PM, Gómez N, Muntasell A, Cisneros E, Moraru M, et al. Activated allogeneic NK cells preferentially kill poor prognosis B-Cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Front Immunol*. 2016;7:454.
523. Rocca YS, Roberti MP, Arriaga JM, Amat M, Bruno L, Pampena MB, et al. Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun*. 2013;19(1):76-85.
524. Ayuso JM, Truttschel R, Gong MM, Humayun M, Virumbrales-Munoz M, Vitek R, et al. Evaluating natural killer cell cytotoxicity against solid tumors using a microfluidic model. *Oncoimmunology*. 2018;8(3):1553477.
525. Ayuso-Domínguez J. Development of micofluidic systems applied to cancer research. Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2016.
526. Kelm JM TN, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng*. 2003;83(2):173-80.
527. Sánchez-Martínez D AG, Muntasell A, Aguiló N, Núñez D, Gálvez EM, Naval J, Anel A, Palomera L, Vilches C, Marzo I, Villalba M, Pardo J. Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology*. 2015;4(3):e991613.
528. Perussia B RC, Anegon I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G. Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 1987;6(4):171-88.
529. Sanchez-Martinez D A-VN, Orecchioni S, Talarico G, Cornillon A, Vo DN, Rene C, Lu ZY, Krzywinska E, Anel A, Galvez EM, Pardo J, Robert B, Martineau P, Hicheri Y, Bertolini F, Cartron G, Villalba M. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics*. 2019;8(14):3856-69.
530. Lee N LM, Carretero M, Ishitani A, Navarro F, Lopez-Botet M, Geraghty DE. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(9):5199-204.
531. Shimizu Y GD, Koller BH, Orr HT, DeMars R. Transfer and expression of three cloned human non-HLA-A,B,C class I major histocompatibility complex genes in mutant lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(227-31).
532. Martin SJ RC, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;182(1545-56).
533. Betts MR BJ, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003;281(1-2):68-78.
534. Shultz LD LB, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S, Kotb M, Gillies SD, King M, Mangada J, Greiner DL, Handgretinger R. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol*. 2005;174(10):6477-89.
535. Miller JS SY, Panoskaltzis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 2005;105(8):3051-7.
536. Streltsova MA ES, Kanevskiy LM, Grechikhina MV, Kobyzeva PA, Lee DA, Telford WG, Sapozhnikov AM, Kovalenko EI. Recurrent Stimulation of Natural Killer Cell Clones with K562 Expressing Membrane-Bound Interleukin-21 Affects Their Phenotype, Interferon- γ Production, and Lifespan. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):E443.
537. Shenouda MM GA, Nham T, Hogg R, Lee AJ, Chew MV, Shafaei M, Aarts C, Lee DA, Hassell J, Bane A, Dhesy-Thind S, Ashkar AA. Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer

- patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast Cancer Res.* 2017;19(1):76.
538. Berg KCG, Eide PW, Eilertsen IA, Johannessen B, Bruun J, Danielsen SA, et al. Multi-omics of 34 colorectal cancer cell lines - a resource for biomedical studies. *Mol Cancer.* 2017;16(1):116.
539. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, M. E, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* 2013;2(9):e71-e.
540. Luke Ardolino AJ. Immune checkpoint inhibitors in malignancy. *Exp Clin Pharmacol.* 2019;42:62-7.
541. Bracht K, Nicholls AM, Liu Y, Bodmer WF. 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br J Cancer.* 2010;103(3):340-6.
542. Mouradov D, Sloggett C, Jorissen RN, Love CG, Li S, Burgess AW, et al. Colorectal cancer cell lines are representative models of the main molecular subtypes of primary cancer. *Cancer Res.* 2014;74(12):3238.
543. Sveen A, Bruun J, Eide PW, Eilertsen IA, Ramirez L, MurumÄngi A, et al. Colorectal cancer Consensus Molecular Subtypes translated to preclinical models uncover potentially targetable cancer cell dependencies. *Clin Cancer Res.* 2018;24(4):794.
544. Eduati F, Doldàn-Martelli V, Klinger B, Cokelaer T, Sieber A, Kogera F, et al. Drug resistance mechanisms in colorectal cancer dissected with cell type-specific dynamic logic models. *Cancer Res.* 2017;77(12):3364-75.
545. Linnekamp JF, Hooff SRv, Prasetyanti PR, Kandimalla R, Buikhuisen JY, Fessler E, et al. Consensus molecular subtypes of colorectal cancer are recapitulated in in vitro and in vivo models. *Cell Death Differ* 2018;25(3):616-33.
546. Karpinski P, Rossowska J, Sasiadek MM. Immunological landscape of consensus clusters in colorectal cancer. *Oncotarget.* 2017;8(62):105299-311.
547. Riedl A, Schleder M, Pudelko K, Stadler M, Walter S, Unterleuthner D, et al. Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses. *J Cell Sci.* 2017;130(1):203-18.
548. Zoetemelk M, Rausch M, Colin DJ, Dormond O, Nowak-Sliwinska P. Short-term 3D culture systems of various complexity for treatment optimization of colorectal carcinoma. *Sci Rep.* 2019;9(1):7103.
549. Virgone-Carlotta A, Lemasson M, Mertani HC, Diaz J-J, Monnier S, Dehoux T, et al. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil. *PLoS one.* 2017;12(11):e0188100-e.
550. Aline GS, Isaura Beatriz BS, Esther C-F, Leticia SB, Jessica Brito S, Karina M, et al. Comparative assay of 2D and 3D cell culture models: Proliferation, gene expression and anticancer drug response. *Current Pharmaceutical Design.* 2018;24(15):1689-94.
551. Jia W, Jiang X, Liu W, Wang L, Zhu B, Zhu H, et al. Effects of three-dimensional collagen scaffolds on the expression profiles and biological functions of glioma cells. *Int J Oncol.* 2018;52(6):1787-800.
552. Takahashi Y, Hori Y, Yamamoto T, Urashima T, Ohara Y, Tanaka H. 3D spheroid cultures improve the metabolic gene expression profiles of HepaRG cells. *Biosci Rep.* 2015;35(3):e00208.
553. Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, Sommariva M, Limonta P, Gagliano N. Epithelial-To-Mesenchymal transition markers and CD44 isoforms are differently expressed in 2D and 3D cell cultures of prostate cancer cells. *Cells.* 2019;8(2):143.
554. Kelly CP, O'Keane JC, Orellana J, Schroy PC, Yang S, LaMont JT, et al. Human colon cancer cells express ICAM-1 in vivo and support LFA-1-dependent lymphocyte adhesion in vitro. *Am J Physiol.* 1992;263(6):G864-G70.

555. Maeda K, Kang S, Sawada T, Nishiguchi T, Yashiro M, Ogawa Y, et al. Expression of intercellular adhesion molecule-1 and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2002;9(3):511-4.
556. Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, Yashiro M, Maeda K, Ohira M, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer.* 2005;41(12):1802-10.
557. Emmanouil G, Ayiomamitis G, Zizi-Sermpetzoglou A, Tzardi M, Moursellas A, Voumvouraki A, et al. Angiodrastic chemokines in colorectal cancer: Clinicopathological correlations. *Anal Cell Pathol (Amst).* 2018;2018:1616973-.
558. Roland CL, Harken AH, Sarr MG, Barnett CC, Jr. ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery.* 2007;141(6):705-7.
559. Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, et al. Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003;18(1):32-40.
560. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 2002;12(1):3-13.
561. Poláková K, Russ G. Expression of the non-classical HLA-G antigen in tumor cell lines is extremely restricted. *Neoplasma.* 2000;47(6):342-8.
562. Zhang Z, Su T, He L, Wang H, Ji G, Liu X, et al. Identification and functional analysis of ligands for Natural Killer cell activating receptors in Colon Carcinoma. *Tohoku J Exp Med.* 2012;226(1):59-68.
563. McGilvray RW, Eagle RA, Watson NFS, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, et al. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clin Cancer Res.* 2009;15(22):6993-7002.
564. Ghadially H, Brown L, Lloyd C, Lewis L, Lewis A, Dillon J, et al. MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue. *Br J Cancer.* 2017;116(9):1208-17.
565. Suresh P. Membrane-bound versus soluble major histocompatibility complex Class I-related chain A and major histocompatibility complex Class I-related chain B differential expression: Mechanisms of tumor eradication versus evasion and current drug development strategies. *J Cancer Res Ther.* 2016;12(4):1224-33.
566. Brandt CS, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, et al. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med.* 2009;206(7):1495-503.
567. Ni L, Dong C. New B7 family checkpoints in human cancers. *Mol Cancer Ther.* 2017;16(7):1203-11.
568. Wu MR, Zhang T, DeMars LR, Sentman CL. B7H6-specific chimeric antigen receptors lead to tumor elimination and host antitumor immunity. *Gene Ther.* 2016;22(8):675-84.
569. Sanchez-Correa B, Valhondo I, Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Pera A, Bergua MJ, et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE axis: novel immune checkpoints for Natural Killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers.* 2019;11(6).
570. Gao J, Zheng Q, Xin N, Wang W, Zhao C. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci.* 2017;108(10):1934-8.
571. Grenga I, Donahue RN, Lepone L, Bame J, Schlom J, Farsaci B. PD-L1 and MHC-I expression in 19 human tumor cell lines and modulation by interferon-gamma treatment. *J Immunother Cancer.* 2014;2(Suppl 3):P102-P.
572. Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, Huynh TG, Mino-Kenudson M. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. *Mod Pathol* 2016;29(9):1104-12.
573. Hamada T, Soong TR, Masugi Y, Kosumi K, Nowak JA, da Silva A, et al. TIME (Tumor Immunity in the MicroEnvironment) classification based on tumor CD274 (PD-L1) expression status

- and tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinomas. *Oncoimmunology*. 2018;7(7):e1442999-e.
574. Herr R, Köhler M, Hana A, Weinberg F, Möller Y, Halbach S, et al. B-Raf inhibitors induce epithelial differentiation in BRAF-Mutant colorectal cancer cells. *Cancer Res*. 2015;75(1):216-29.
575. Feng D, Qin B, Pal K, Sun L, Dutta S, Dong H, et al. BRAFV600E-induced, tumor intrinsic PD-L1 can regulate chemotherapy-induced apoptosis in human colon cancer cells and in tumor xenografts. *Oncogene*. 2019.
576. Drummond CG, Nickerson CA, Coyne CB. A three-dimensional cell culture model to study enterovirus infection of polarized intestinal epithelial cells. *mSphere*. 2016;1(1):e00030-15.
577. Samy KE, Levy ES, Phong K, Demaree B, Abate AR, Desai TA. Human intestinal spheroids cultured using Sacrificial Micromolding as a model system for studying drug transport. *Sci Rep*. 2019;9(1):9936-.
578. Llosa NJ, Cruise M, Tam A, Wicks EC, Hechenbleikner EM, Taube JM, et al. The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. *Cancer Discov*. 2015;5(1):43-51.
579. Wang H, Yao H, Li C, Liang L, Zhang Y, Shi H, et al. PD-L2 expression in colorectal cancer: Independent prognostic effect and targetability by deglycosylation. *Oncoimmunology*. 2017;6(7):e1327494-e.
580. Sconocchia G, Eppenberger-Castori S, Zlobec I, Karamitopoulou E, Arriga R, Coppola A, et al. HLA class II antigen expression in colorectal carcinoma tumors as a favorable prognostic marker. *Neoplasia*. 2014;16(1):31-42.
581. Angelova M, Charoentong P, Hackl H, Trajanoski Z. The colorectal cancer immune paradox revisited. *Oncoimmunology*. 2016;5(2):e1078058-e.
582. Michel S, Linnebacher M, Alcaniz J, Voss M, Wagner R, Dippold W, et al. Lack of HLA class II antigen expression in microsatellite unstable colorectal carcinomas is caused by mutations in HLA class II regulatory genes. *Int J Cancer*. 2010;127(4):889-98.
583. Zhou X, Sun L, Jing D, Xu G, Zhang J, Lin L, et al. Galectin-9 expression predicts favorable clinical outcome in solid tumors: A systematic review and meta-analysis. *Front Physiol*. 2018;9:452-.
584. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1245-52.
585. Gonçalves Silva I, Yasinska IM, Sakhnevych SS, Fiedler W, Wellbrock J, Bardelli M, et al. The Tim-3-galectin-9 secretory pathway is involved in the immune escape of human Acute Myeloid Leukemia cells. *EBioMedicine*. 2017;22:44-57.
586. Gleason MK, Lenvik TR, McCullar V, Felices M, Brien MS, Cooley SA, et al. Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 2012;119(13):3064-72.
587. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol Res*. 2014;2(5):410-22.
588. Satelli A, Rao P, Gupta P, Lockman P, Srivenugopal K, Rao U. Varied expression and localization of multiple galectins in different cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2008;19:587-94.
589. Han Z-M, Huang H-M, Sun Y-W. Effect of CEACAM-1 knockdown in human colorectal cancer cells. *Oncol Lett*. 2018;16(2):1622-6.
590. Arabzadeh A, Beauchemin N. Stromal CEACAM1 expression regulates colorectal cancer metastasis. *Oncoimmunology*. 2012;1(7):1205-7.
591. Ieda J, Yokoyama S, Tamura K, Takifuji K, Hotta T, Matsuda K, et al. Re-expression of CEACAM1 long cytoplasmic domain isoform is associated with invasion and migration of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2011;129(6):1351-61.

592. Birge RB, Boeltz S, Kumar S, Carlson J, Wanderley J, Calianese D, et al. Phosphatidylserine is a global immunosuppressive signal in efferocytosis, infectious disease, and cancer. *Cell Death Differ.* 2016;23(6):962-78.
593. Riedl S, Rinner B, Asslaber M, Schaidler H, Walzer S, Novak A, et al. In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1808(11):2638-45.
594. Weber JK, Zhou R. Phosphatidylserine-induced conformational modulation of immune cell exhaustion-associated receptor TIM3. *Sci Rep.* 2017;7(1):13579.
595. Jo W-S, Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Biomark.* 2006;2(1-2):51-60.
596. Carethers JM, Chauhan DP, Fink D, Nebel S, Bresalier RS, Howell SB, et al. Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology.* 1999;117(1):123-31.
597. Violette S, Poulain L, Dussaulx E, Pepin D, Faussat A-M, Chambaz J, et al. Resistance of colon cancer cells to long-term 5-fluorouracil exposure is correlated to the relative level of Bcl-2 and Bcl-XL in addition to Bax and p53 status. *Int J Cancer.* 2002;98(4):498-504.
598. Kandioler D, Mittlböck M, Kappel S, Puhalla H, Herbst F, Langner C, et al. TP53 mutational status and prediction of benefit from adjuvant 5-Fluorouracil in stage III colon cancer patients. *EBioMedicine.* 2015;2(8):825-30.
599. Mariadason JM, Arango D, Shi Q, Wilson AJ, Corner GA, Nicholas C, et al. Gene expression profiling-based prediction of response of colon carcinoma cells to 5-Fluorouracil and Camptothecin. *Cancer Res.* 2003;63(24):8791-812.
600. Núñez D, Domingo MP, Sánchez-Martínez D, Cebolla V, Chiou A, Velázquez-Campoy A, et al. Recombinant production of human ICAM-1 chimeras by single step on column refolding and purification. *Process Biochem.* 2013;48(4):708-15.
601. Bryceson YT, March ME, Barber DF, Ljunggren H-G, Long EO. Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med.* 2005;202(7):1001-12.
602. Veluchamy JP, Spanholtz J, Tordoir M, Thijssen VL, Heideman DAM, Verheul HMW, et al. Combination of NK Cells and Cetuximab to Enhance Anti-Tumor Responses in RAS Mutant Metastatic Colorectal Cancer. *PloS one.* 2016;11(6):e0157830-e.
603. Bhat R, Rommelaere J. NK-cell-dependent killing of colon carcinoma cells is mediated by natural cytotoxicity receptors (NCRs) and stimulated by parvovirus infection of target cells. *BMC Cancer.* 2013;13:367.
604. Talerico R, Todaro M, Di Franco S, Maccalli C, Garofalo C, Sottile R, et al. Human NK cells selective targeting of Colon Cancer–Initiating cells: A role for Natural Cytotoxicity Receptors and MHC class I molecules. *J Immunol.* 2013;190(5):2381-90.
605. Giannattasio A, Weil S, Kloess S, Ansari N, Stelzer EHK, Cerwenka A, et al. Cytotoxicity and infiltration of human NK cells in in vivo-like tumor spheroids. *BMC Cancer.* 2015;15(1):351.
606. Burkett MW, Shafer-Weaver KA, Strobl S, Baseler M, Malyguine A. A novel flow cytometric assay for evaluating cell-mediated cytotoxicity. *J Immunother.* 2005;28(4):396-402.
607. Bhat R, Watzl C. Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies. *PloS one.* 2007;2(3):e326.
608. Prager I, Liesche C, van Ooijen H, Urlaub D, Verron Q, Sandström N, et al. NK cells switch from granzyme B to death receptor–mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med.* 2019;216(9):2113-27.
609. Backes CS, Friedmann KS, Mang S, Knörck A, Hoth M, Kummerow C. Natural killer cells induce distinct modes of cancer cell death: Discrimination, quantification, and modulation of apoptosis, necrosis, and mixed forms. *J Biol Chem.* 2018;293(42):16348-63.
610. Chollat-Namy M, Ben Safta-Saadoun T, Haferssas D, Meurice G, Chouaib S, Thiery J. The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy. *Cell Death Dis.* 2019;10(10):695.

611. De Miguel D, Gallego-Lleyda A, Ayuso JM, Pejenaute-Ochoa D, Jarauta V, Marzo I, et al. High-order TRAIL oligomer formation in TRAIL-coated lipid nanoparticles enhances DR5 cross-linking and increases antitumour effect against colon cancer. *Cancer Lett.* 2016;383(2):250-60.
612. Brodbeck T, Nehmann N, Bethge A, Wedemann G, Schumacher U. Perforin-dependent direct cytotoxicity in natural killer cells induces considerable knockdown of spontaneous lung metastases and computer modelling-proven tumor cell dormancy in a HT29 human colon cancer xenograft mouse model. *Mol Cancer.* 2014;13:244.
613. Krzywinska E, Allende-Vega N, Cornillon A, Vo D-N, Cayrefourcq L, Panabieres C, et al. Identification of anti-tumor cells carrying Natural Killer (NK) cell antigens in patients with hematological cancers. *EBioMedicine.* 2015;2(10):1364-76.
614. Korzeniewski C, Callewaert DM. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 1983;64(3):313-20.
615. Cui J, Bystryn J-C. An improved europium release assay for complement-mediated cytolysis. *J Immunol Methods.* 1992;147(1):13-9.
616. Peper JK, Schuster H, Löffler MW, Schmid-Horch B, Rammensee H-G, Stevanović S. An impedance-based cytotoxicity assay for real-time and label-free assessment of T-cell-mediated killing of adherent cells. *J Immunol Methods.* 2014;405:192-8.
617. Benson DM, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood.* 2010;116(13):2286-94.
618. Concha-Benavente F, Kansy B, Moskovitz J, Moy J, Chandran U, Ferris RL. PD-L1 Mediates Dysfunction in Activated PD-1+ NK Cells in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Immunol Res.* 2018;6(12):1548-60.
619. Liu Y, Cheng Y, Xu Y, Wang Z, Du X, Li C, et al. Increased expression of programmed cell death protein 1 on NK cells inhibits NK-cell-mediated anti-tumor function and indicates poor prognosis in digestive cancers. *Oncogene.* 2017;36:6143-53.
620. Romee R, Foley B, Lenvik T, Wang Y, Zhang B, Ankarlo D, et al. NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood.* 2013;121(18):3599-608.
621. Tremblay-McLean A, Coenraads S, Kiani Z, Dupuy FP, Bernard NF. Expression of ligands for activating natural killer cell receptors on cell lines commonly used to assess natural killer cell function. *BMC Immunol.* 2019;20(1):8.
622. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015;26(3):311-27.
623. West EE, Jin H-T, Rasheed A-U, Penaloza-MacMaster P, Ha S-J, Tan WG, et al. PD-L1 blockade synergizes with IL-2 therapy in reinvigorating exhausted T cells. *J Clin Invest.* 2013;123(6):2604-15.
624. Oliver PG, LoBuglio AF, Zinn KR, Kim H, Nan L, Zhou T, et al. Treatment of human colon cancer xenografts with TRA-8 anti-death receptor 5 antibody alone or in combination with CPT-11. *Clin Cancer Res.* 2008;14(7):2180-9.
625. Ding Q, Chang C-J, Xie X, Xia W, Yang J-Y, Wang S-C, et al. APOBEC3G promotes liver metastasis in an orthotopic mouse model of colorectal cancer and predicts human hepatic metastasis. *J Clin Invest.* 2011;121(11):4526-36.
626. Lee JY, Kim M-S, Kim EH, Chung N, Jeong YK. Retrospective growth kinetics and radiosensitivity analysis of various human xenograft models. *Lab Anim Res.* 2016;32(4):187-93.
627. Ropic S, Vangestel C, Verhaeghe J, Van den Wyngaert T, Hinz R, Verhoye M, et al. Characterization of an orthotopic Colorectal Cancer mouse model and its feasibility for accurate quantification in Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol.* 2017;19(5):762-71.

628. McIntyre RE, Buczacki SJA, Arends MJ, Adams DJ. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. *Bioessays*. 2015;37(8):909-20.
629. Zhao X, Li L, Starr TK, Subramanian S. Tumor location impacts immune response in mouse models of colon cancer. *Oncotarget*. 2017;8(33):54775-87.
630. Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M, Sakashita H, Manabe T, Shimahara Y, et al. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. *Oncogene*. 2007;26(32):4679-88.
631. Céspedes MV, Espina C, García-Cabezas MA, Trias M, Boluda A, Gómez del Pulgar MT, et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. *Am J Pathol*. 2007;170(3):1077-85.
632. Zhang Y, Davis C, Ryan J, Janney C, Peña MMO. Development and characterization of a reliable mouse model of colorectal cancer metastasis to the liver. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(7):903-18.
633. Shen J, Li ZJ, Li LF, Lu L, Xiao ZG, Wu WKK, et al. Vascular-targeted TNF α and IFN γ inhibits orthotopic colorectal tumor growth. *J Transl Med*. 2016;14(1):187-.
634. Chu J, Deng Y, Benson DM, He S, Hughes T, Zhang J, et al. CS1-specific chimeric antigen receptor (CAR)-engineered natural killer cells enhance in vitro and in vivo antitumor activity against human multiple myeloma. *Leukemia*. 2014;28(4):917-27.
635. Shiozawa M, Chang C-H, Huang Y-C, Chen Y-C, Chi M-S, Hao H-C, et al. Pharmacologically upregulated carcinoembryonic antigen-expression enhances the cytolytic activity of genetically-modified chimeric antigen receptor NK-92MI against colorectal cancer cells. *BMC immunol*. 2018;19(1):27-.
636. Kruschinski A, Moosmann A, Poschke I, Norell Hk, Chmielewski M, Seliger B, et al. Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(45):17481-6.
637. Han J, Chu J, Keung Chan W, Zhang J, Wang Y, Cohen JB, et al. CAR-Engineered NK cells targeting wild-type EGFR and EGFRvIII enhance killing of glioblastoma and patient-derived glioblastoma stem cells. *Sci Rep*. 2015;5:11483-.
638. Streltsova M, Erokhina S, Kanevskiy L, Grechikhina M, Kobyzeva P, Lee D, et al. Recurrent stimulation of Natural Killer cell clones with K562 expressing membrane-bound interleukin-21 affects their phenotype, interferon- γ production, and lifespan. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):E443.
639. Shenouda M, Gillgrass A, Nham T, Hogg R, Lee A, Chew M, et al. Ex vivo expanded natural killer cells from breast cancer patients and healthy donors are highly cytotoxic against breast cancer cell lines and patient-derived tumours. *Breast Cancer Res*. 2017;19(1):76.



ANEXOS

ANEXOS

ANEXO 1 - Reactivos

Tabla 1. Reactivos

Reactivo/químico	Casa comercial	Concentración del stock	Medio de dilución	Concentración de trabajo
5-FU	Sigma	200 µM	DMSO	0,01 -100 µM
7-AAD	Immunostep	-	-	1/100
Anexina-V-FITC	Immunostep	-	-	1,5/100
Azul de tripano	Sigma	0.4%	0,15 M NaCl	1:1
BM Cyclin	Roche	Ciclina 1: 2,5 mg/mL Ciclina 2: 1,25 mg/mL	PBS	Ciclina 1: 10 µg/mL Ciclina 2: 5 µg/mL
DMSO	Sigma	-	-	10% (v/v)
DNasa	Roche	10 mg/mL	Agua mili-Q	40 µg/mL
EDTA	PanReac	0,5 M	-	2 mM
eFluor 670	eBioscience	5 mM	DMSO	3 µM
GolgiStop™	BD	-	-	1/500
Mitomicina C	Sigma	0,5 mg/mL	PBS	25 µg/mL
Metilcelulosa de alta viscosidad (4.000 cp)	Sigma	-	Medio basal	12 g/L
MycoAlert Mycoplasma	Lonza	-	-	-
Nec-1	Sigma	3 mM	DMSO	30 µM
Prestoblu™	ThermoFisher	x10	-	1/10
PFA	PanReac	4%	PBS	1% (v/v)
Q-VD-OPh	Bionova	10 mM	DMSO	30 µM

5-FU: 5-Fluorouracilo; **7-AAD:** 7-Amino-Actinomicina D; **DMSO:** Dimetilsulfóxido; **EDTA:** Ácido Etilenaminotetraacético; **FITC:** Isotiocianato de Fluoresceína **Nec-1:** Necrostatina-1; **PFA:** Paraformaldehído

Tabla 2. Soluciones y tampones

Tampón	Composición	Casa comercial
ABB 1x, tampón de marcaje	140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl ₂ ; 10 Mm HEPES/NaOH pH 7,4	Elaboración propia
Histopaque®-1077	Ficoll 1,077 g/mL	Sigma
Tampón de lisis de glóbulos rojos	150 mM NH ₄ Cl; 10 mM K ₂ CO ₃ ; 0,1 mM EDTA; pH 7,2-7,4	Alfa Aesar
MACS, tampón de separación	PBS; 0,5% SFB; 2mM EDTA	Elaboración propia
PBS	45 g/L NaCl; 70 g/L KH ₂ PO ₄ ; 1,1 g/L KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4	Elaboración propia
Solución de permeabilización	0,1% saponina; 5% SFB en PBS	Elaboración propia

ABB: Tampón de unión de Anexina-V; **EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

ANEXO 2- Paneles para el análisis multiparamétrico de los marcadores de las células NK mediante citometría de flujo

Tabla 1. Paneles de fluorocromos en el citómetro FACSCalibur

FACSCalibur						
Láser	Filtro	FL	Canal de fluorescencia	Panel 1	Panel 2	Panel 3
Láser azul 488 nm	530(30)BP	1	FITC/Alexa Fluor® 488	CD3-FITC	PD-1-FITC	-
	588(42)BP	2	PE	CD56-PE	NKp44-PE	CXCR3-PE/ NKG2A –PE
	670LP	3	7-AAD/PerCP	-	CD3-PerCP	CD3-PerCP
Láser rojo 635 nm	661(16)BP	4	APC/Alexa Fluor® 647	CTLA4-APC / TIM-3-APC/ LAG-3 APC	CD56-APC	CD56-APC

Tabla 2. Paneles de fluorocromos en el citómetro Beckman Gallios™ para el fenotipado de PBMCS.

Beckman Gallios™				
Láser	Filtro	FL	Canal de fluorescencia	Panel
Láser azul 488 nm	525(40)BP	1	FITC/ Alexa Fluor® 488	CD16-FITC
	575(30)BP	2	PE	
	620(30)BP	3	PI	-
	695(30)BP	4	7-AAD/ PerCP/ PerCP- Vio700	CD56-PerCP- Vio700
	755 LP	5	PE-Cy7/ PE-Vio700	-
Láser rojo 638 nm	660(20)BP	6	APC/ Alexa Fluor® 647	
	725(20)BP	7	APC-Alexa Fluor® 700	-
	750LP	8	APC-Cy7	
Láser violeta 405 nm	450(40)BP	9	Alexa Fluor® 405/ VioBlue	-
	550(50)BP	10	Alexa Fluor 430/ VioGreen	CD3-VioGreen + Bloqueante Fc

Tabla 3. Paneles de fluorocromos en el citómetro Beckman Gallios™ para el fenotipado de las líneas tumorales de CCR.

Beckman Gallios™				
Láser	Filtro	FL	Canal de fluorescencia	Panel 1
Láser azul 488 nm	525(40)BP	1	FITC/ Alexa Fluor® 488	MICA/B-VioBright515
	575(30)BP	2	PE	Nectina-2-PE PVR-PE
	620(30)BP	3	PI	-
	695(30)BP	4	7-AAD/ PerCP/ PerCP-Vio700	HLA-G-PerCP-Vio700
	755 LP	5	PE-Cy7/ PE-Vio700	-
Láser rojo 638 nm	660(20)BP	6	APC/ Alexa Fluor® 647	B7H6-Alexa Fluor® 647
	725(20)BP	7	APC-Alexa Fluor® 700	-
	750LP	8	APC-Cy7	-
Láser violeta 405 nm	450(40)BP	9	Alexa Fluor® 405/ VioBlue	ULBP-1-Alexa Fluor® 405 ULBP-2/5/6- Alexa Fluor® 405
	550(50)BP	10	Alexa Fluor® 430/ VioGreen	-

ANEXO 3- Expresión de ligandos de las células NK

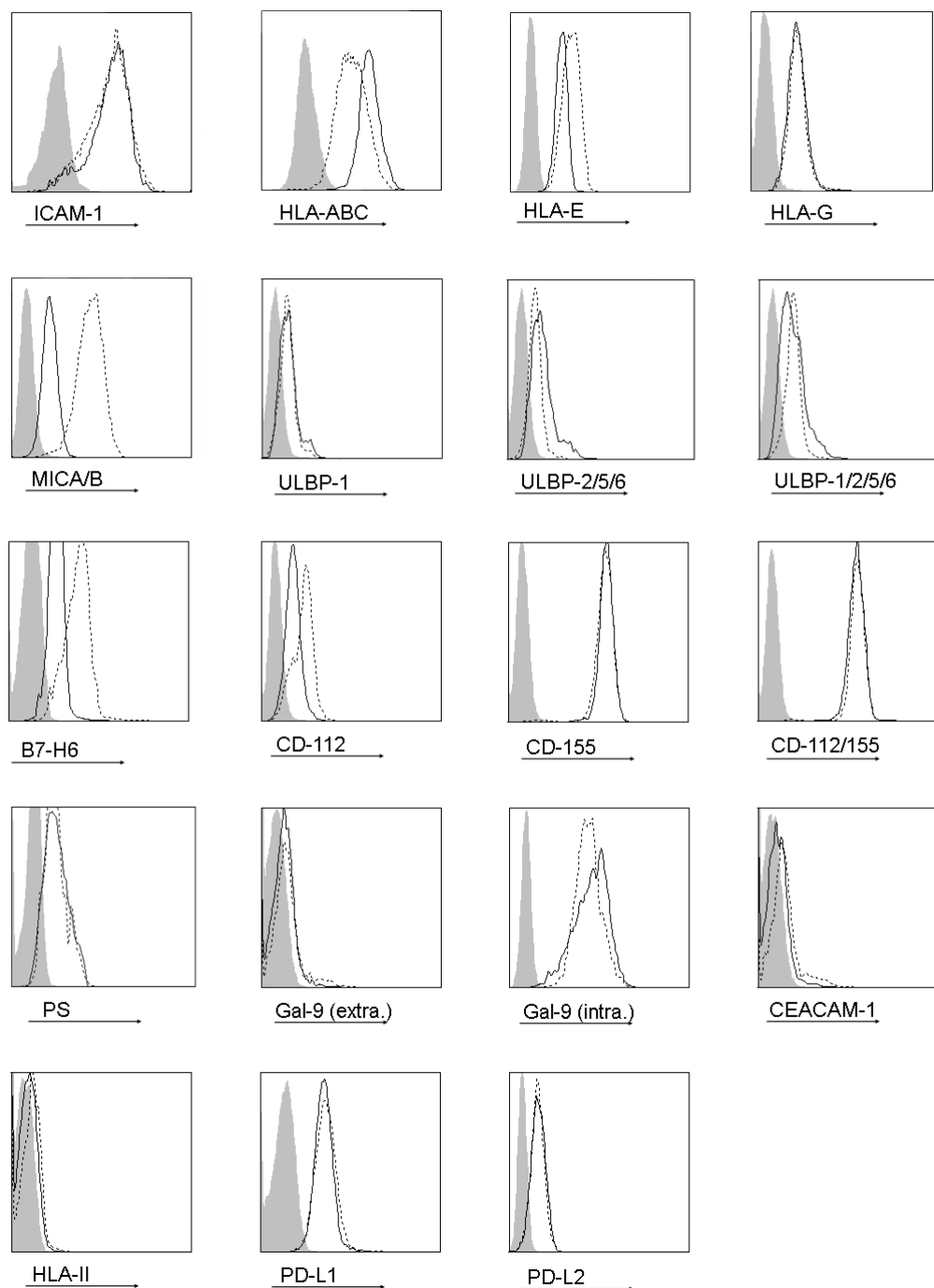


Figura 1. Expresión de los ligandos de las células NK en la línea celular HCT-116. Se obtuvieron suspensiones monocelulares de los cultivo y se analizó de la expresión de los distintos ligandos mediante citometría de flujo, como se describe en materiales y métodos (apartado 3.3.3.1). Los datos representan histogramas de una determinación representativa del patrón de expresión característico de la línea HCT-116 en 2D (línea continua) y 3D (línea punteada) frente al control FMO (del inglés, *Fluorescence Minus One*; gris).

