



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Influencia de la necrosis tumoral en
neuroblastoma sobre la migración de
células NK.

Influence of tumour necrosis in neuroblastoma
on NK cells migration.

Autora:

Cecilia Pesini Martín

Directores:

Julián Pardo Jimeno

Eva Gálvez Buerba

Máster Universitario en Biología Molecular y Celular.

Departamento de Microbiología, Medicina Preventiva y Salud Pública.

Centro de Investigaciones Biomédicas de Aragón (CIBA).

Curso académico 2019-2020

AGRADECIMIENTOS.

Quiero agradecerle al Dr. Ariel Ramírez Labrada su trabajo como mi mentor en el laboratorio y destacar sus cualidades de paciencia y confianza como maestro. Es un placer adentrarme en el mundo de la investigación de la mano de alguien con tantas ganas como él y tanta capacidad de transmitir las.

ABREVIATURAS

2D	bidimensional
3D	tridimensional
7-AAD	7-Aminoactinomicina D
ADCC	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (del inglés, <i>Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>)
CTL	linfocito T citotóxico (del inglés, <i>Cytolytic T Lymphocyte</i>)
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
GD2	gangliósido GD2
INRG	<i>International Neuroblastoma Risk Group</i> ; grupo internacional de riesgo de neuroblastoma
KIR	receptores de tipo inmunoglobulina de células NK (del inglés, <i>Killer immunoglobuline-like receptors</i>)
mAb	anticuerpo monoclonal
MHC-I	complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (del inglés, <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MSC	célula madre mesenquimal (del inglés, <i>mesenchymal stem cell</i>)
NK	asesinas naturales (del inglés, <i>Natural Killer</i>)
NB	neuroblastoma
PBMC	célula mononuclear de sangre periférica (del inglés, <i>peripheral blood mononuclear cell</i>)
PBS	tampón fosfato salino (del inglés, <i>phosphate buffered saline</i>)
PD1	receptor de muerte celular programada-1 (del inglés, <i>programmed death-1</i>)
PD-L1	ligando de muerte programada-1 (del inglés, <i>programmed death ligand-1</i>)
SFB	suero fetal bovino
TAM	macrófagos asociados al tumor (del inglés, <i>tumour associated macrophages</i>)
TME	microentorno tumoral (del inglés, <i>tumor microenvironment</i>)

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. El neuroblastoma.....	3
1.1.1. Nuevas líneas de investigación en neuroblastoma.	6
1.2. El neuroblastoma y el microentorno tumoral.	7
1.3. Las células NK.	11
1.4. Inmunoterapia con células NK.....	12
1.4.1. Anticuerpos.	12
1.4.2. Activación con citoquinas.	14
1.4.3. Terapia adoptiva.	14
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Búsqueda bibliográfica.....	18
3.2. Cultivo celular.....	18
3.2.1. Líneas celulares.....	18
3.2.2. Mantenimiento y manipulación de los cultivos celulares.....	18
3.2.3. Recuento y determinación de la viabilidad celular.....	19
3.2.4. Congelación y descongelación de líneas celulares.....	19
3.2.5. Cultivo celular 3D por método de gota colgante.....	20
3.2.6. Disgregación de los esferoides.....	20
3.3. Caracterización celular por citometría de flujo.	20
3.4. Obtención de células NK a partir de sangre periférica de donantes sanos.	21
3.4.1. Aislamiento de PBMCs.....	21
3.4.2. Separación de células NK.....	21
3.5. Expansión de células NK.	21
3.6. Incubación overnight de células NK.	22
3.7. Citotoxicidad de las células NK frente a células de neuroblastoma.....	22
3.8. Ensayo de degranulación de células NK.	23
3.9. Marcaje de células NK viables con eFluor 670.....	23
3.10. Inmunofluorescencia.	24
3.10.1. Preparación de cubreobjetos con poli-L-lisina.....	24
3.10.2. Preparación de muestra.	24
3.11. Análisis estadístico.....	24
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26

4.1. Revisión bibliográfica: inmunoterapia contra el neuroblastoma.....	26
4.1.1 Las células NK y el neuroblastoma.	27
4.1.2 Inmunoterapia basada en células NK contra el neuroblastoma.....	29
4.2. Caracterización del crecimiento y formación del núcleo necrótico en esferoides de la línea celular SH-SY5Y.	31
4.3. Expansión de células NK a partir de sangre periférica de donantes sanos.....	33
4.4. Citotoxicidad de células NK expandidas frente a cultivos de líneas celulares de neuroblastoma en 2D.....	35
4.5. Citotoxicidad de células NK expandidas frente a cultivos de la línea celular SH-SY5Y en 3D.....	38
4.6. Infiltración en esferoides de células NK expandidas.	41
4.7. Análisis de la proteína PD1 en las células NK.....	43
4.8. Bloqueo de la vía PD1/PD-L1 en la citotoxicidad de células NK.....	45
5. CONCLUSIONES	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	50

RESUMEN

El neuroblastoma es el tumor sólido extracraneal más común en niños, suponiendo el 8% de los casos de cáncer infantil. Mientras los casos de neuroblastoma de bajo riesgo tienen una tasa de supervivencia superior al 90%, el neuroblastoma de alto riesgo, con una alta probabilidad de no responder a los tratamientos convencionales, tiene una tasa de supervivencia a 5 años del 50%. Por lo tanto, es muy necesario el desarrollo de terapias específicas contra el neuroblastoma de alto riesgo. La terapia adoptiva con células NK es una de las líneas de investigación contra el cáncer infantil, ya que por lo general se tratan de tumores poco inmunogénicos, con una baja tasa de mutaciones, y contra los que las células NK se presentan como una herramienta terapéutica potente y segura.

El neuroblastoma, como tumor sólido, presenta unas características en su microentorno tumoral que modulan la actividad de las células inmunes, como la presencia de necrosis tumoral y la oposición a la infiltración debido a la estructura del tumor, que pueden alterar los resultados de la terapia adoptiva con células NK. Además, mientras la inmunoterapia con anticuerpos monoclonales contra la vía de inmunosupresión PD1/PD-L1 ha sido ampliamente estudiada en linfocitos T, mostrando una gran relevancia, no ha sido tan estudiada en las células NK. Debido a esto, en este trabajo se ha estudiado la actividad citotóxica de las células NK expandidas *in vitro* con dos protocolos frente a cultivos tanto en 2D como en 3D de líneas celulares de neuroblastoma. Los cultivos en 3D presentan ciertas características del microentorno tumoral, mostrando mayor grado de semejanza con la complejidad de un tumor sólido. También se ha estudiado la expresión de PD1 en las células NK. La comparación de los protocolos de expansión mostró diferencias entre los niveles de citotoxicidad de las células NK observados con ambos procedimientos. Los cultivos en 3D mostraron mayor resistencia a la citotoxicidad de las células NK que los cultivos en 2D. Respecto al estudio de la expresión de PD1 en las células NK, se ha observado el aumento de la expresión en la membrana tras la incubación de las células NK con células tumorales, observándose niveles análogos a los presentes en pacientes con cáncer. Además, se observó una recuperación parcial de la actividad citotóxica de las células NK al añadir el anticuerpo anti-PD1. Estos resultados indican la relevancia de la vía PD1/PD-L1 en las células NK y su influencia por lo tanto en los tratamientos con inmunoterapia con células NK.

ABSTRACT

Neuroblastoma is the most common extracranial solid tumour in children, representing 8% of childhood tumours. While low-risk neuroblastoma cases have a survival rate greater than 90%, high-risk neuroblastoma, which has a high probability of not responding to conventional treatments, has a 5-year survival rate of 50%. Therefore, is very necessary the development of specific therapies against high-risk neuroblastoma. Adoptive NK cell therapy is one of the lines of research against childhood cancer, since they are generally non-immunogenic tumours, with a low mutational burden, and against which NK cells are a powerful and safe therapeutic tool.

Neuroblastoma, as a solid tumour, has characteristics in its tumour microenvironment that modulate immune cells activity, such the presence of tumour necrosis and opposition to infiltration due to the structure of the tumour, which can alter the results of adoptive NK cells therapy. Furthermore, while immunotherapy with monoclonal antibodies against the PD1/PD-L1 immunosuppression pathway has been extensively studied in T lymphocytes, showing great relevance, it has not been studied as much in NK cells. Due to this, this work has studied the cytotoxic activity of NK cells expanded *in vitro* with two protocols against neuroblastoma cell lines cultures in both 2D and 3D, which have characteristics of the tumour microenvironment, showing greater degree of similarity with a solid tumour complexity. PD1 expression in NK cells has also been studied. The comparison of the expansion protocols showed differences between NK cell cytotoxicity levels observed with both procedures. 3D cultures showed higher resistance to NK cell cytotoxicity than 2D cultures. Regarding the study of PD1 expression in NK cells, an increase in membrane expression has been observed after incubation of NK cells with tumour cells, observing levels analogous to those present in cancer patients and showing partial recovery of NK cells cytotoxic activity by adding anti-PD1 antibody. These results indicates the relevance of the PD1/PD-L1 pathway in NK cells and its influence therefore in NK cell immunotherapy treatments.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El neuroblastoma

El neuroblastoma (NB) es un tumor sólido infantil que representa el 8% de los tumores pediátricos^{1,2}, siendo el tumor sólido extracraneal más común en niños. En España, el NB tiene una incidencia media de 100 casos anuales³. La letalidad del NB en Europa se ha reducido en los últimos años, aumentando la ratio de supervivencia a 5 años del 37% a finales de los 70s, hasta el 70% actualmente⁴. La probabilidad de desarrollar NB varía con la edad, siendo la edad de diagnóstico más común entre los 18 y los 22 meses. El 50% de los casos se diagnostica antes del primer año de vida y el 90% de los casos antes de los 5 años^{4,5}. La edad de diagnóstico es un importante indicador del pronóstico clínico del tumor, siendo en niños menores de 18 meses en los que se encuentra la mayor probabilidad de regresión espontánea o del éxito de la cirugía en tratamiento único². Por lo contrario, en los casos de niños de mayor edad, es más probable que se den tumores agresivos, resistentes a terapias citotóxicas y combinadas. En la adolescencia y edad adulta los casos de NB son muy escasos, pero presentan una alta letalidad^{1,2}.

El NB es un tumor originario de células embrionarias del sistema nervioso simpático procedentes de la cresta neural. La cresta neural es un conjunto de precursores multipotenciales con capacidad migratoria que durante etapas tempranas del desarrollo embrionario contribuyen a la formación de diversos tejidos. Durante el desarrollo celular existe un equilibrio entre proliferación, migración y muerte celular, procesos en los que un error puede derivar en la transformación celular. En concreto, alteraciones durante el desarrollo de las células de linaje simpaticoadrenal, que dan lugar a los ganglios simpáticos y a la médula adrenal, son las que se relacionan con la aparición del NB. Por consecuente, los tumores primarios de NB suelen localizarse en el abdomen, entorno a la cadena ganglionar simpática, dándose en un 65% de los casos en la glándula suprarrenal. Otras localizaciones comunes son la región cervical, tórax y pelvis⁶.

El NB, como tumor infantil, presenta mayor dificultad en cuanto a su estudio, por las características de sus pacientes, así como por las características que presentan estos tumores. Los tumores infantiles se suelen manifestar en células precursoras de tejidos sin capacidad de renovación, en las cuales se acumulan un número bajo de mutaciones, al contrario que en los adultos, en los que las células precursoras son células de tejidos con una alta tasa de renovación como la piel o el intestino, en el que la acumulación de mutaciones es mayor. Esta menor carga mutacional se traduce en una menor inmunogenicidad del tumor, al presentar menos diferencias con una célula no transformada, y un menor número de dianas terapéuticas, aumentando la complejidad en el desarrollo de fármacos y terapias efectivas⁷.

El sistema de clasificación internacional del NB por grupo de riesgo (INRG) relaciona el estadio de la enfermedad, la edad y factores histológicos y moleculares, con el riesgo que presentan un tumor de NB de no responder a los tratamientos (Figura 1)⁸. Siguiendo esta clasificación, entorno al 50% de los casos de NB que se producen son de bajo riesgo, los cuales tienen un buen pronóstico y presentan una supervivencia superior al 90%. En

contrapartida, la otra mitad de los casos de NB tienen un alto riesgo de no responder a los tratamientos convencionales, presentando una supervivencia a 5 años preocupantemente baja, menor al 50%^{5,9}. Estos datos, señalan la importancia de realizar estudios centrados en el NB de alto riesgo para poder desarrollar terapias que mejoren la tasa de supervivencia de este cáncer infantil, que pese a suponer el 8% de los casos, es responsable del 15% de las muertes infantiles por cáncer².

El sistema de clasificación INRG tiene en cuenta características histológicas respecto a la diferenciación del neuroblasto, así como las alteraciones genéticas que han mostrado mayor influencia en el pronóstico. Una de ellas es la amplificación del oncogén MYCN, que se encuentra en el 20% de los casos, la cual tiene una fuerte correlación con un mal pronóstico¹. El gen MYCN tiene diversas funciones relacionadas con malignidad, activando la transcripción de genes relacionados con la metástasis, supervivencia, proliferación y angiogénesis, así como el mantenimiento de un estado no diferenciado de las células¹⁰. Otra de las características genéticas que también ha mostrado correlación con un mal pronóstico es el conjunto de aberraciones en el brazo largo del cromosoma 11 (11q), las cuales se han encontrado entre un 20 y un 45% de los tumores analizados. Aunque esto se ha intentado relacionar con la presencia de un gen supresor de tumores en esa localización, no se han obtenidos datos concluyentes y su relación con un peor pronóstico parece estar relacionada con haploinsuficiencias¹⁰.

INRG Stage	Age (months)	Histologic Category	Grade of Tumor Differentiation	MYCN	11q Aberration	Ploidy	Pretreatment Risk Group
L1/L2		GN maturing; GNB intermixed					A Very low
L1		Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA			B Very low
				Amp			K High
L2	< 18	Any, except GN maturing or GNB intermixed		NA	No		D Low
					Yes		G Intermediate
	≥ 18	GNB nodular; neuroblastoma	Differentiating	NA	No		E Low
					Yes		H Intermediate
			Poorly differentiated or undifferentiated	NA			N High
M	< 18			NA		Hyperdiploid	F Low
	< 12			NA		Diploid	I Intermediate
	12 to < 18			NA		Diploid	J Intermediate
	< 18			Amp			O High
	≥ 18						P High
MS					No		C Very low
	< 18			NA	Yes		Q High
					Amp		

Figura 1. Esquema de la clasificación pretratamiento de la INRG¹²

Otro de los aspectos que se tiene en cuenta en la clasificación INRG es el estadio de la enfermedad, existiendo cuatro. Los estadios L1 y L2 corresponden a tumores localizados, diferenciándose en la observación de factores de riesgo definidos por imagen (IDRFs) en el caso de L2. Estos factores de riesgo se relacionan con la posibilidad de extirpación total o parcial del tumor debida a su localización. Los otros dos estadios implican metástasis, definiéndose el estadio MS para los casos de metástasis localizada en piel, hígado y/o médula ósea en niños menores de 18 meses de edad y que pueden acabar madurando a

neuronas sanas, revertiendo la malignidad. En el estadio M, se engloban el resto de casos con metástasis que no entran dentro del estadio MS descrito^{11,12}.

La presencia de metástasis en NB es alta, encontrándose en un 60% de los niños mayores de un año en el momento del diagnóstico¹³. Los lugares más frecuentes en los que se localiza la metástasis son el hueso y la médula ósea, resultando en una alta morbilidad, incluyendo dolor y compresión nerviosa entre otras afecciones. Debido al alto porcentaje de metástasis en la médula ósea del NB, es común la obtención de muestras de pacientes para la realización de estudios personalizados a partir de muestras obtenidas mediante aspiración o biopsia de la médula ósea¹⁴.

El diagnóstico inequívoco del NB requiere la biopsia del tumor para posteriormente someterlo a estudio mediante la observación del tejido por microscopía óptica, generalmente con inmunohistoquímica, con la que además se pueden determinar marcadores de pronóstico como la amplificación del oncogén MYCN. Otro método es la determinación en orina de compuestos como ácido homovanílico u otros compuestos generados en la degradación de catecolaminas (neurotransmisores empleados por el sistema nervioso simpático), presentes en un 85% de los casos^{2,15}.

El tratamiento del NB varía principalmente en función del grupo de riesgo con el que se asocie al tumor. En los casos de bajo riesgo, se recomienda la extirpación quirúrgica como único tratamiento, e incluso se tiende a esperar a su remisión de forma espontánea, debido a la alta probabilidad de que esto suceda, evitando así los riesgos asociados con la cirugía¹⁶. En el NB clasificado como riesgo intermedio, en los que tras la extirpación del tumor localizado se detecta algún signo de presentar mayor riesgo, se aplica quimioterapia, radioterapia y/o ácido retinoico (13cis RA). El 13cis RA induce la diferenciación de los neuroblastos, promoviendo la maduración hacia células no malignas. Para el tratamiento de estos grupos de riesgo de NB se tiende a la reducción de las dosis, moderando la agresividad del tratamiento, ya que se han observado mejoras de la supervivencia a 5 años en un 9%¹⁷.

Por último, en los casos de alto riesgo se realiza un tratamiento combinado, comenzando por quimioterapia de alta intensidad, con cisplatino, etopósido o doxorubicina, previa a la extracción quirúrgica^{2,15}. Se continúa el tratamiento con progenitores hematopoyéticos y radioterapia. Como último paso se aplica 13cis RA e inmunoterapia como terapia de mantenimiento. Concretamente, la inmunoterapia que se aplica es un anticuerpo monoclonal anti-GD2, un gangliósido generalmente sobreexpresado en NB^{15,16}. Desafortunadamente, entorno a la mitad de los tumores de alto riesgo no responden a los tratamientos o sufren recidivas durante los dos primeros años del tratamiento, lo que mantiene una elevada tasa de mortalidad⁴. Además, los tratamientos actuales presentan toxicidades agudas y prologadas, teniendo graves repercusiones en la salud de los pacientes, especialmente sensibles por su corta edad. Las altas dosis de quimioterapia pueden generar problemas en hígado y/o riñón, que aún en centros experimentados, tienen una tasa de mortalidad asociada. Otros efectos a largo plazo son pérdidas auditivas permanentes, por el acumulo de compuestos con platino, con los problemas asociados

que esto conlleva en los niños⁴. Debido a la baja tasa de supervivencia del NB de alto riesgo, urge la mejora de los tratamientos actuales y el desarrollo de nuevas terapias.

1.1.1. Nuevas líneas de investigación en neuroblastoma.

Las terapias probadas contra el NB de alto riesgo en la última década no han obtenido en su mayoría resultados satisfactorios. Las innovaciones con mayor éxito han sido la quimioterapia de alta intensidad combinada con la administración de células madre autólogas y el uso de anticuerpos anti-GD2^{2,4}. Una de las causas por las que los avances no están siendo tan prometedores como se esperarían podría deberse a la falta de entendimiento tanto de la biología del tumor como de los factores del paciente. Por ello es de gran importancia a la hora de aplicar un tratamiento seleccionar adecuadamente la población que pueda beneficiarse de él. Algunos estudios muestran que mientras los tumores iniciales presentan una baja tasa mutacional, con la progresión del tumor y los tratamientos se van seleccionando, aumentando la carga mutacional de los tumores en las recidivas, por lo que se propone la realización de una segunda biopsia para la clasificación del tumor en la nueva etapa^{18,19}.

Otro cuello de botella en la investigación oncológica es la reproducibilidad de los resultados obtenidos *in vitro* al aplicarlos *in vivo*. En el caso del NB de alto riesgo, además de la compleja estructura tumoral y las múltiples interacciones que ocurren entre el tumor y el entorno, presenta una gran heterogeneidad intratumoral², requiriéndose modelos de cultivo que representen mayor complejidad biológica. La búsqueda de modelos más representativos, que comenzó con los cultivos tradicionales de líneas celulares derivadas de muestras de pacientes en 2D, ha evolucionado hacia modelos de cultivos más complejos, como el cultivo de células primarias, los cultivos en 3D o los xenoinjertos derivados de pacientes (PDXs) (Figura 2)^{4,20}.

El incremento de estudios sobre la relación del sistema inmune con el cáncer ha desencadenado un aumento de la investigación en inmunoterapia contra el cáncer. Esta nueva línea de investigación se presenta con una larga y potente perspectiva de futuro para el tratamiento del cáncer y potencialmente aplicable en aquellos tumores con peor pronóstico que además no responden a los tratamientos actuales, como lo es el NB de alto riesgo.

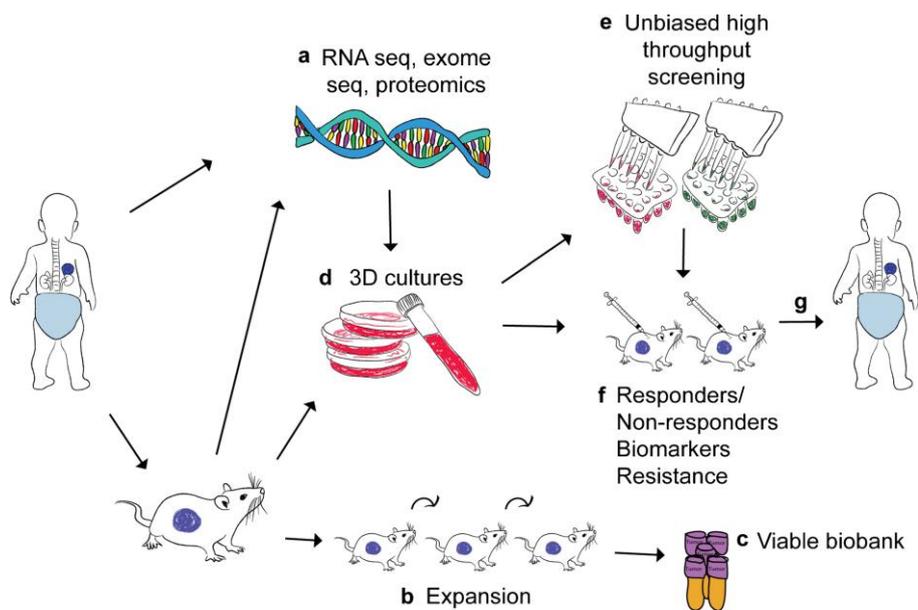


Figura 2. PDXs en investigación traslacional del cáncer infantil²⁰. **A)** Realización de una caracterización molecular tanto del tumor del niño como del PDXs. **B)** Realización de pases *in vivo* para aumentar la muestra disponible. **C)** Generación de biobancos para estudios futuros. **D)** Realización de cultivos *in vitro* en esferoides 3D u organoides. **E)** Realización de screenings. **F)** Selección de terapias prometedoras para testarlas como PDXs. **G)** Obtención de resultados con mayor potencial para el desarrollo de terapias efectivas en cáncer infantil.

1.2. El neuroblastoma y el microentorno tumoral.

Los estudios sobre cáncer fueron numerosos y presentaron muchos avances durante el último cuarto del siglo XX, pero fue en el año 2000, en el que Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg, iniciaron un gran cambio del concepto de cáncer, abriendo una nueva línea de investigación. Hasta la fecha, la gran premisa sobre el cáncer basaba su origen en un defecto en los mecanismos de regulación del ciclo celular y homeostasis, generando un modelo en el que las células tumorales son las únicas implicadas en su desarrollo y gozan de independencia con su entorno. En el trabajo Douglas Hanahan y Robert A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*, describieron seis procesos que intervienen en la generación y desarrollo tumoral (puntos clave o “hallmarks”) y que los conecta con su entorno, generando la idea del microentorno tumoral²¹. Posteriormente estos *hallmarks* se han ampliado siendo actualmente los siguientes: i) suministro de señales proliferativas, ii) evasión de supresión del crecimiento, iii) establecimiento de inmortalidad, iv) capacidad de invasión y metástasis, v) inducción de angiogénesis, vi) inestabilidad genómica, vii) resistencia a la muerte celular, viii) disregulación del metabolismo, ix) evasión del ataque del sistema inmune y x) promoción de la inflamación (Figura 3). De los 10 *hallmarks* definidos, se conocen implicaciones de células no tumorales en todos ellos, exceptuando la estabilidad genómica y la modificación del metabolismo. Los tipos celulares no tumorales que se ven implicados en estos procesos son principalmente células tipo fibroblastos, células madre mesenquimales (MSC) relacionadas con la angiogénesis y células del sistema inmune. El conjunto de esas interacciones celulares y las condiciones ambientales modifican la visión del tumor y se amplía, añadiendo el concepto de

microentorno tumoral (TME), en el que el sistema inmune participa de diversas formas^{11,22,23}.

El NB, como tumor sólido, consta de TME, cuyas características e interacciones influyen en su crecimiento y desarrollo, resultando en distintos pronósticos. Análisis recientes han mostrado la importancia de diversos factores del TME en el NB²⁴. A continuación, se describen algunas de las interacciones del NB con su TME en función del *hallmark* en el que intervienen.

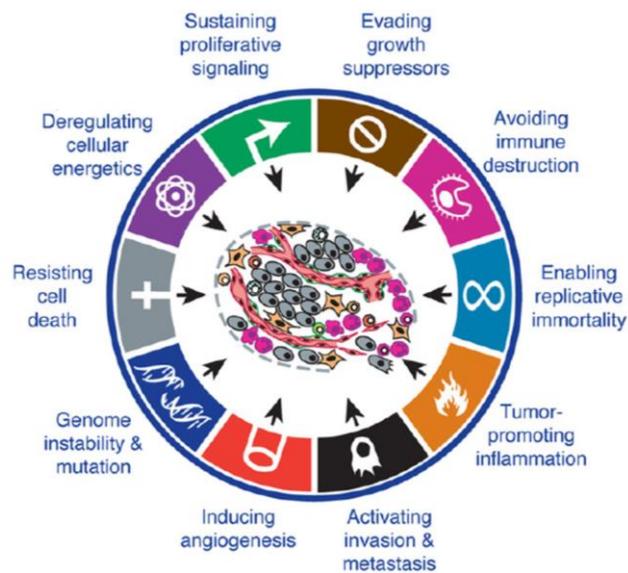


Figura 3. Hallmarks del cáncer²²

Invasión y metástasis.

La capacidad de invadir los tejidos colindantes o metastatizar es uno de los signos de agresividad de un tumor. En el NB, a la hora del diagnóstico aproximadamente el 60% de los pacientes mayores de un año presentan metástasis, la cual se localiza frecuentemente en hueso, médula ósea e hígado^{13,24}. La migración a los diferentes tejidos se relaciona con la expresión de diferentes receptores de quimiocinas: CXCR4, CXCR7 y CXCL12, los cuales se han observado en líneas de NB derivadas de tumores de alto riesgo, como la línea celular SH-SY5Y²⁵. Las MSC y los osteoblastos son la mayor fuente de CXCL12, la cual promueve la metástasis hacia el hueso y la médula ósea²⁶. Una vez en el hueso el TME tiene un papel crítico. El crecimiento del NB en el hueso genera la liberación de citoquinas, como la IL-6, que reclutan y activan a los osteoclastos. Estos generan la destrucción del hueso, la cual a su vez genera factores que promueven el crecimiento del tumor, alcanzándose un dañino círculo vicioso. A su vez, los neuroblastos producen factores de crecimiento, IGF-1 e IGF-2, que contribuyen igualmente a ese proceso^{13,24}.

Vascularización.

Una importante característica que modula en gran medida tanto al tumor como a su entorno es la presencia de hipoxia. Durante el crecimiento de un tumor se requiere la inducción de vascularización que aporte nutrientes y oxígeno. Normalmente los vasos que se generan no son suficientes para suplir la alta demanda de las células tumorales, generando fallos en la irrigación e hipoxia. La hipoxia tumoral reduce la exposición a

fármacos administrados por vía intravenosa y la ratio de proliferación celular, lo que hace a estos tumores más resistentes a las terapias convencionales. Además, también se ha visto que la hipoxia se relaciona con el cúmulo de mutaciones, la propensión a la metástasis y la desdiferenciación celular, características relacionadas con la agresividad del tumor, que determinan el pronóstico de un paciente^{12,27}.

En el NB, como en la mayoría de tumores, son las propias células tumorales las que producen varios factores de crecimiento que promueven la angiogénesis. Los principales factores son el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), cuya expresión se ha visto correlacionada con la amplificación de MYCN y otros marcadores de agresividad. Además de las propias células tumorales, los neuroblastos estimulan la producción de VEGF por las MSC cuya presencia se relaciona con mayor vascularización, mientras que la presencia de células de Schwann se relaciona con menor vascularización y mejor pronóstico²⁴.

Resistencia a la muerte celular.

La muerte celular programa o apoptosis, es una barrera fisiológica contra el cáncer, desencadenándose en respuesta a diversos tipos de estrés que experimenta una célula tumoral durante su desarrollo²². Los principales mecanismos que presenta el sistema inmune para la eliminación de las células tumorales se basan en el desencadenamiento de la apoptosis²⁸. En varias líneas celulares de NB derivadas de tumores agresivos y metastásicos, se ha observado la pérdida de expresión de caspasa 8, proteasa iniciadora de la cascada proteolítica por vía extracelular²⁹, permitiéndoles evitar esta vía de apoptosis. El TME puede tanto aportar proteínas anti-apoptóticas como Bcl-XL al activarse las MSC y los macrófagos asociados al tumor (TAMs, del inglés, *tumour associated macrophages*) por acción de la IL-6³⁰ como promover la apoptosis mediante la producción del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) e interferón γ (INF- γ) por TAMs dirigidos por la IL-12³¹.

Generación de inflamación tumorigénica.

Actualmente se admite que, virtualmente, todos los tumores tienen infiltración de células inmunes, en un amplio rango, tanto de la respuesta inmune innata como de la adaptativa²⁴. La relación entre el sistema inmune y el cáncer es altamente compleja, aceptándose hoy en día la teoría de la inmunoeedición del cáncer³². Esta teoría añade a la conocida acción antitumoral del sistema inmune, un papel protumoral mediante la selección de las células tumorales que pueden sobrevivir en un paciente inmunocompetente o la generación de unas condiciones en el TME que favorezcan su crecimiento. De esta forma, aunque la respuesta inmune antitumoral está mediada por inflamación, se ha visto que esta también puede tener el efecto contrario. En el NB, monocitos, macrófagos y neutrófilos crean un ambiente inflamatorio que influye en su crecimiento y metástasis. El NB promueve la diferenciación de los macrófagos a macrófagos M2, los cuales promueven la progresión tumoral³³.

Evasión del sistema inmune.

La teoría de la inmunoección del cáncer explica como las células tumorales sufren una selección debido a la presión selectiva que ejerce el sistema inmune sobre él. Con este proceso se modula la población de células tumorales hacia aquellas cuyo proteoma supone una ventaja, evitando ser eliminadas por el sistema inmune³². Se han observado diferentes mecanismos desarrollados en el NB para evadir la respuesta inmune. Un mecanismo común observado en líneas celulares tumorales es una baja expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, del inglés, *major histocompatibility complex*), lo que se traduce en un menor reconocimiento antigénico de los linfocitos T citotóxicos (CTLs, del inglés, *cytolytic T lymphocytes*). Alguno de los mecanismos moleculares implicados en la reducción de la expresión de MHC-I observada en NB incluyen defectos en la expresión de proteínas del inmunoproteosoma o de la proteína TAP³⁴, requeridas para el procesamiento antigénico y la presentación vía MHC-I. Sin embargo, la expresión de MHC-I en el NB esta modulada por el TME, pudiendo aumentar por la secreción de INF- γ por parte de células inmunes activadas, exponiendo la célula tumoral al sistema inmune. Además, la amplificación de MYCN se ha visto relacionada con la disminución de MHC-I.

Otro mecanismo de evasión del sistema inmune, es la expresión en forma soluble de la cadena relacionada con MHC-I (MICA) o de B7-H3/CD276, las cuales inhiben la activación de las células asesinas naturales (NK, del inglés, *natural killer*) y CTLs al ligarse a sus receptores. También se ha observado una mayor expresión de HLA-G en monocitos, inducida por el NB, molécula inmunosupresora para las células NK. Los TAMs promueven también el microentorno inmunosupresor produciendo IL-6, IL-10 y el factor de transformación tumoral (TGF) β 1. En cuanto a la contribución de los puntos de control del sistema inmune o *immune checkpoints*, como PD1 o CTLA-4 se ha observado que el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) contra CTLA-4, o el ligando de PD-1 (PD-L1) favorece la regresión del tumor, mostrando por lo tanto relevancia en el NB²⁴.

Además de los mecanismos de evasión del sistema inmune, los tumores pediátricos presentan una baja tasa de mutaciones, lo que los hace poco inmunogénicos, es decir, no despiertan una fuerte respuesta inmune, ya que sus características son similares a las células homólogas no tumorales. De esta forma el sistema inmune no las reconoce como peligrosas, denominándose a este tipo de tumores, tumores fríos³⁵. La falta de antígenos tumorales, así como la reducción de la expresión de MHC-I del NB, reduce las dianas terapéuticas para los tratamientos, pero abre la puerta a otro tipo de terapias como la inmunoterapia con células NK³⁵, como se muestra más adelante.

1.3. Las células NK.

Las células NK son linfocitos granulares pertenecientes al sistema inmune innato que representan entre el 5 y 15% de los linfocitos de sangre periférica. Fueron descritas en los años 70s, al observar su citotoxicidad espontánea contra células tumorales y posteriormente contra células infectadas por virus. A diferencia de los linfocitos T, las células NK no requieren el reconocimiento de un antígeno específico ni su presentación mediante una célula presentadora de antígeno (APC) para desencadenar su actividad. La activación de las células NK se da a través de un complejo equilibrio de señales de activación e inhibición, con el que determinan si desencadenan una respuesta contra la célula con la que contactan. La principal señal de inhibición es el reconocimiento del MHC-I propio, expresado en todas las células nucleadas. En una interacción con una célula sana, la célula NK, reconoce el MHC-I y no recibe señales de activación, manteniendo la tolerancia. En el caso de una célula transformada o infectada, esta puede haber tanto reducido la expresión de MHC-I como aumentado la exposición de ligandos de estrés. En el primer caso, la célula NK desencadena sus funciones efectoras siguiendo la hipótesis de “ausencia de lo propio” y en el segundo caso la inducción por estrés, pudiendo darse por combinación de ambas. La respuesta de la célula NK se produce cuando la integración de las señales de inhibición y las señales de activación superan un valor umbral, interviniendo un gran número de receptores y ligandos^{29,36,37}.

Una vez activadas, las células NK ejercen su actividad citotóxica efectora mediante tres vías: la secreción de gránulos citotóxicos, la producción de ligandos de muerte solubles o de citoquinas, que aumentan la sensibilidad de las células dianas a los mecanismos citotóxicos. Los gránulos citotóxicos contienen perforina, que genera poros en la membrana celular, y granzimas, que una vez en el interior de la célula desencadenan su muerte. Los ligandos de muerte, TNF- α , FasL y TRAIL, desencadenan la muerte de las células diana al unirse con sus respectivos receptores presentes en la diana. Además de su capacidad lítica, las células NK intervienen en la regulación de la respuesta inmune, mediante la producción de distintas citoquinas y quimiocinas, ayudando a la activación de diferentes células inmunes (células dendríticas, macrófagos y linfocitos T). Las principales citoquinas producidas por las células NK son el INF- γ y el TNF- α . Ambas son citoquinas proinflamatorias con diversas funciones, como la inhibición del crecimiento celular, promoción de la apoptosis de células tumorales y el aumento de expresión de MHC-I, además de activar células inmunes como macrófagos y las propias células NK^{29,37}.

Se han definido distintas poblaciones funcionales de células NK en base a la expresión de proteínas de membrana. Las dos subpoblaciones mejor caracterizadas son las células NK CD56^{bright} y CD56^{dim}. La población de células NK CD56^{dim} es la mayoritaria en sangre (80-95%) y se caracterizan por una potente y rápida respuesta citotóxica mediante la movilización de gránulos preformados, mediada por la interacción receptor-ligando, y la abundante secreción de INF- γ . Las células NK CD56^{bright} en cambio, son la población mayoritaria en órganos linfoides secundarios y presentan baja actividad citotóxica, especializándose en la producción de citoquinas y quimiocinas, inducida por estimulación

con citoquinas. Además, se ha observado una mayor sensibilidad a la activación de las células NK CD56^{bright} mediante las citoquinas IL-2, IL-15 e IL-12, que las células NK CD56^{dim}. Actualmente se considera que las células CD56^{bright} son un paso previo de maduración respecto a las CD56^{dim}³⁸. Otra población de células NK son las células NK adaptativas, las cuales presentan rasgos descritos para la inmunidad adaptativa, como características específicas de tejido o generación de memoria, mostrando una respuesta secundaria mayor. Finalmente, en cuanto a la disfuncionalidad de las células NK en el contexto de inmunidad antitumoral, cobra relevancia las células NK “exhaustas” o agotadas. Esta población de células NK presenta una producción de INF- γ , granzima B y actividad citotóxica reducidas y se observa en situaciones de exposición persistente a señales de activación, como en el TME o en infecciones virales crónicas³⁷.

1.4. Inmunoterapia con células NK.

La actividad antitumoral innata de las células NK las convierte en una potente opción terapéutica contra el cáncer. Son muchas las posibles estrategias para el desarrollo de inmunoterapias basadas en células NK, las cuales se pueden agrupar en terapias con anticuerpos, con citoquinas o con células NK manipuladas *in vitro*^{39,40}.

1.4.1. Anticuerpos.

Las células NK reconocen a sus células diana a través de diversos receptores presentes en la membrana celular con capacidad de transducir una señal intracelular. Esto les permite recibir numerosas señales de su entorno y en el caso de recibir las señales oportunas, desencadenar su actividad citotóxica. Los anticuerpos terapéuticos son una de las ramas de la inmunoterapia más desarrollada hasta ahora, siendo numerosos los anticuerpos utilizados actualmente en clínica⁴¹. La base teórica de estos tratamientos es la alteración del reconocimiento entre la célula NK y la célula tumoral, buscando modular la respuesta inmune hacia la actividad antitumoral. Los receptores de las células NK que intervienen en el reconocimiento de la diana tumoral pueden considerarse por lo tanto dianas terapéuticas, siendo numerosos y variados. A continuación, se describen algunos de los receptores de las células NK más relevantes y sus aplicaciones en inmunoterapia, haciendo una clasificación funcional en receptores de activación y coestimulación o de inhibición^{39,42-44}.

Receptores de activación y coestimulación.

CD16 (Fc γ RIIIA).

El receptor de activación CD16 reconoce la fracción constante (Fc) de las inmunoglobulinas G (IgG) desencadenando la degranulación de las células NK mediante la denominada citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*). Mientras que el resto de receptores de activación tienen que trabajar de forma conjunta para iniciar la respuesta de las células NK, se ha visto que el receptor CD16 es capaz de iniciar la respuesta citotóxica en células NK sin previa activación de forma independiente⁴⁵. Numerosos anticuerpos terapéuticos basan su mecanismo de acción en el desencadenamiento de la ADCC de las células NK.

Receptores de citotoxicidad natural: NKp30, NKp44 y NKp46.

Mientras que los receptores NKp30 y NKp46 son de expresión constitutiva, NKp44 solo se expresa tras la activación de las células NK. El único ligando de los receptores de citotoxicidad natural observado en tumores ha sido B7-H6, ligando de NKp30. Pese a esto, la relevancia de estos receptores en el desencadenamiento de la actividad tumoral no se descarta, por lo que se tiene en cuenta en el desarrollo de nuevas terapias⁴³.

NKG2D (CD314).

Es uno de los receptores de activación más estudiados en células NK, sus ligandos son moléculas de HLA-I inducidas por estrés (MICA, MICB y los ULBPS1-6). La inmunoección del cáncer fomenta la progresión de las células tumorales con mecanismos para la reducción de estos ligandos, como reducir su expresión o escindirlos con proteasas extracelulares. Para evitar la escisión de los ligandos de NKG2D se han diseñado anticuerpos que bloquean los puntos de corte de estas proteasas⁴⁶.

DNAM-1 (CD226).

DNAM-1 es un receptor de coestimulación que promueve la adhesión entre célula NK y su diana durante la sinapsis inmunológica. Tiene como ligandos las proteínas CD112 y el receptor de poliovirus (PVR o CD155), las cuales están distribuidas ampliamente por los tejidos⁴³.

Receptores de inhibición.

KIRs.

La familia KIR engloba a numerosos receptores, en su mayoría inhibitorios, que reconocen moléculas polimórficas del MHC-I. Los receptores KIR presentan una amplia variabilidad, acorde al haplotipo HLA propio. Son numerosas las aproximaciones terapéuticas que se basan en la disrupción entre los KIRs presentes en las células NK efectoras y las moléculas de HLA expresadas en las células tumorales del paciente, como el uso de anticuerpos bloqueantes como lirilumab⁴⁷ o el uso de células NK alogénicas descrito más adelante³⁹.

Receptor de muerte celular programada-1 (PD1, del inglés, programmed dead-1).

Los puntos de control inmunitario, son mecanismos fisiológicos que permiten la limitación de la respuesta inmune, evitando efectos adversos por reacciones desproporcionadas y procesos de autoinmunidad. PD1 es uno de los puntos de control inmunitario más estudiado. La expresión de PD1 aumenta con la activación de la célula inmune y su unión al ligando, PD-L1, evita la transducción de señales de activación, generando células inmunes no funcionales. PD1 ha sido ampliamente estudiado en células T, obteniéndose tratamientos eficaces contra diversos cánceres⁴¹. En cambio, la implicación de PD1 en la regulación de la respuesta de las células NK es menos conocida⁴³. Pese a que el nivel de PD1 observado en células NK activadas *in vitro* es muy bajo, en algunas condiciones, como células NK infiltradas en tumores, se ha visto significativamente aumentado, indicando tanto su presencia, como su posible relevancia, pero se requiere de más investigaciones para confirmar su relevancia^{48,49}.

1.4.2. Activación con citoquinas.

Las diferentes citoquinas generan diferentes fenotipos de células NK, entre ellos, el fenotipo de activación, generado principalmente por acción de las citoquinas IL-2, IL-15 e IL-12³⁹. El uso de citoquinas para la modulación de las células NK es una herramienta más de la inmunoterapia con células NK. El tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con altas dosis de IL-2 produce la generación de linfocitos activados asesinos (LAK), una combinación de CTLs y células NK, con gran capacidad lítica. La administración de IL-2 directamente en pacientes con cáncer ha mostrado una respuesta limitada, además de mostrar alta toxicidad³⁹. Una alternativa es la modulación indirecta *in vivo*, realizando una depleción de las células inmunes con drogas como ciclofosfamida y fludarabina. De esta forma se eliminan células supresoras, liberándose una gran cantidad de citoquinas. Además, actualmente se están estudiando otros fenotipos de las células NK, con potenciales usos en inmunoterapia como las células NK adaptativas. Las células NK adaptativas o de memoria, se denominan así ya que responden más robustamente tras una activación previa. Puede obtenerse este fenotipo de célula NK mediante la exposición a las interleuquinas 12, 15 y 18 conjuntamente, manteniendo una actividad citotóxica potenciada durante varias semanas³⁸.

1.4.3. Terapia adoptiva.

Además de las terapias con anticuerpos o citoquinas, se están desarrollando otras terapias, como la terapia celular o adoptiva, basada en la aplicación de células inmunes con capacidad antitumoral en el paciente. Más allá de los linfocitos T, las células NK se muestran como una potente herramienta. El origen de las células NK puede ser tanto el propio paciente, células NK autólogas, como de un donante sano, células NK alogénicas. Ambas se obtienen a partir de sangre periférica o del cordón umbilical, tanto enriqueciendo la población de células en función de su expresión de CD56 o eliminando aquellas con las proteínas CD3 o CD19. Una vez obtenidas se puede recurrir a la expansión de las células NK para obtener un mayor número, así como para activarlas, obteniendo un fenotipo más propenso a desempeñar un papel antitumoral. En el primer caso, las células NK autólogas expandidas *in vitro*, son reintroducidas en el paciente para que ejerzan su actividad antitumoral mediante el reconocimiento de las células tumorales por niveles de expresión de MHC-I por debajo del “nivel de seguridad”. Por otro lado, las células NK alogénicas reconocen como diana aquellas células que expresan un HLA-I ajeno, aun haciéndolo a altos niveles, basándose en desajustes entre los KIRs y sus ligandos. Las células NK autólogas han mostrado bajos efectos antitumorales, debido a los bajos niveles de receptores de activación observados, así como el reconocimiento del MHC-I propio. Se ha tratado de potenciarla añadiendo IL-2 pero se observaron altos niveles de toxicidad debido a la alta cantidad de interleuquina requerida y los múltiples efectos de esta⁵⁰. Las células NK alogénicas han mostrado una mayor actividad antitumoral al tratarse de células desarrolladas en un ambiente sin inmunosupresión y potenciarse la aloreactividad. Al tratarse de donantes haploidénticos, se reduce la inhibición producida por el MHC-I propio, reduciendo las señales de activación requeridas para alcanzar el valor umbral de activación. Además, mientras que la terapia

celular con linfocitos T ha mostrado el desencadenamiento de la enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) como efecto secundario, no lo ha hecho el tratamiento con células NK alogénicas, mostrando una seguridad mayor para este tratamiento^{39,40,43}. La posibilidad de la activación y expansión *ex vivo* de las células NK ha sido ampliamente explorada ya que permite obtener células NK más propensas a ejercer su actividad antitumoral, así como un mayor número de células activas^{51,52}.

También se utilizan líneas celulares de células NK, especialmente en las aproximaciones basadas en la modificación genética, debido a su mayor facilidad de manipulación, pese a poder aplicarse también en cultivos primarios. De forma análoga a las células T, las células NK son modificadas genéticamente para que expresen receptores quiméricos de antígeno (CARs, del inglés, *chimeric antigen receptor*). Se diseñan receptores seleccionando tanto el ligando (“antígeno”) que reconocen como la señal que transducirán en el interior de la célula NK. Las células CAR-NK se dirigen entonces contra proteínas sobreexpresadas en la diana, añadiendo una señal de activación adicional que favorecerá el reconocimiento de la célula tumoral³⁹.

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El NB infantil es el principal tumor sólido extracraneal en niños. En el 50% de los casos los tumores presentan características relacionadas con un alto riesgo de no responder a los tratamientos actuales, generando una tasa de supervivencia a 5 años para los niños con este tipo de tumores que no alcanza el 50%^{2,12,16}. Es necesario por lo tanto el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para superar la resistencia del NB de alto riesgo a los tratamientos actualmente estandarizados.

En los últimos años el desarrollo de la inmunoterapia ha generado tratamientos con buenos resultados contra diversos tipos de cáncer. La terapia celular es una de las principales líneas de estudio de la inmunoterapia, basada en la administración de células inmunes. Aunque los estudios con linfocitos T son más numerosos, la utilización de células NK presenta mayor nivel de seguridad por la imposibilidad de desencadenar GVHD como efecto adverso^{39,43}. La terapia adoptiva con células NK es una de las opciones estudiadas contra tumores sólidos poco inmunogénicos como el NB, debido a la capacidad de desencadenar respuesta citotóxica frente a células tumorales sin necesidad de presentación antigénica. En los últimos años se han desarrollado protocolos de expansión y activación *in vitro* de las células NK originarias de donantes sanos, presentándolas como una opción de tratamiento. La sensibilidad del NB frente a la lisis mediada por la citotoxicidad de células NK activadas ha sido observada y son diversos los estudios clínicos que aprovechan esto para tratarlo^{44,53}.

Las limitaciones observadas durante el desarrollo de los estudios de terapias adoptivas con células NK sobre tumores sólidos como el NB se deben a las características inmunosupresoras del TME^{24,43}. Por ello, para mejorar la eficacia de estas terapias es necesario comprender las relaciones que se dan entre la célula NK efectora y el TME, como pueden ser la inhibición mediante el punto de control inmunológico PD1 y la modulación de la infiltración mediada por la presencia de necrosis tumoral.

En este trabajo se plantea como hipótesis que **los factores presentes en el TME, como la necrosis tumoral y la inmunosupresión mediante la vía PD1/PD-L1, podría regular la infiltración y actividad de células NK sobre el NB.**

El objetivo final de este trabajo es estudiar la actividad citotóxica de las células NK expandidas contra el NB y los factores que pueden modularla, siendo los factores sobre los que se centra el trabajo el protocolo de expansión de las células NK, la influencia de la necrosis tumoral y la vía de inmunosupresión PD1/PD-L1. Para ello se establecieron los siguientes objetivos y objetivos intermedios:

1. Desarrollo de un modelo de cultivo celular de NB con presencia de necrosis tumoral.
 - a. Generar cultivos tridimensionales (3D) de líneas de NB caracterizando la formación de núcleo necrótico.
2. Valorar la función efectora de las células NK expandidas frente a NB.

- a. Estudiar la expansión de células NK de donantes sanos con diferentes protocolos.
 - b. Analizar la actividad citotóxica de las células NK expandidas contra líneas celulares de NB en cultivos 2D y 3D.
 - c. Estudiar la infiltración de células NK en cultivos 3D.
3. Estudiar la proteína PD1 en el contexto de la actividad antitumoral de las células NK.
- a. Determinar el nivel de expresión en membrana de PD1 en distintas condiciones.
 - b. Determinar su localización intracelular.
 - c. Estudiar su influencia en la citotoxicidad de las células NK frente a líneas de NB.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Búsqueda bibliográfica.

Se ha realizado una revisión sistemática sobre la implicación y aplicaciones en inmunoterapia de las células NK en el neuroblastoma infantil. Para la búsqueda se utilizó la base de datos PubMed siguiendo como estrategia de búsqueda la selección de revisiones científicas de los últimos 10 años que contuvieran las palabras “nk” y “neuroblastoma” en el título o resumen. A partir de los resultados obtenidos, descartándose los que se no se consideraron relevantes para el objeto de la revisión, se accedió a los estudios científicos y revisiones citadas en los artículos seleccionados.

3.2. Cultivo celular.

3.2.1. Líneas celulares.

En el desarrollo de este trabajo se han utilizado varios tipos de líneas celulares humanas:

-Línea celular de NB infantil SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™), así como la misma línea modificada para la expresión de la proteína GFP (SH-SY5Y GFP). Ambas líneas fueron proporcionadas por el grupo del Dr. Eduardo Ruiz de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza. Estas células crecen predominantemente de forma adherente. La línea SH-SY5Y es una sublínea de la línea celular SK-N-SH (ATCC® HTB-11™) derivada de una muestra de neuroblastoma extraída en 1970 de la médula ósea del NB de una niña de 4 años. Puntualmente se utilizó la línea celular de NB infantil SK-N-BE(2)-C (ATCC® CRL-2268™). Esta línea celular deriva de la línea SK-N-BE(2) (ATCC® CRL-2271™), obtenida en 1972 de una biopsia de la médula ósea de un niño de dos años de edad con neuroblastoma diseminado tras repetidos ciclos de quimioterapia y radioterapia. Presenta amplificación del oncogén MYCN.

-Línea celular K562 (ATCC® CRL-243™), derivada de una leucemia mielogénica aguda, deficiente en la proteína MHC-I.

-Línea celular R69-LCL (R69), una línea linfoblastoide de células B transfectadas con el virus Epstein-Barr.

En este trabajo se han empleado también cultivos primarios de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Las células se extrajeron de muestras de sangre proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón, con la aprobación del Comité Ético de Investigación Científica de Aragón, número: C.I.P11/006.

3.2.2. Mantenimiento y manipulación de los cultivos celulares.

Dependiendo del tipo celular, se adaptaron las características del cultivo y mantenimiento. Todas ellas se cultivaron en frascos de cultivo de 25 cm² (Corning), en horizontal para las células adherentes y en vertical para las células en suspensión. Se usó medio de cultivo Eagle modificado por Dubelcco (DMEM, Sigma) para las líneas de NB y medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI, Sigma) para las líneas celulares K562, R69 y las PBMCs. Ambos medios de cultivo se suplementaron con

penicilina (100U/mL)/estreptomina (100ug/mL) (Sigma-Aldrich) y 2 mM Glutamax (Lonza). Se añadió suero fetal bovino (SFB, Sigma) al 10% a los medios tras su deplementación. Para ello el SFB se mantuvo 30 min a 56°C en baño termostatzado (Precistern Selecta) centrifugándose posteriormente 10 min a 3000 xg para eliminar el precipitado. De esta forma se desechan las proteínas del sistema del complemento presentes en el SFB para que no alteren los resultados obtenidos en los estudios. A continuación, los medios de cultivo suplementados como se ha descrito se indican como “medios completos”. Los medios fueron atemperados a 37°C en baño termostatzado previamente a su uso. Las células se mantuvieron en incubador termostatzado a 37°C, 5% de CO₂ y saturado de humedad (Panasonic), realizando subcultivos periódicos dependiendo tanto de su crecimiento como de su uso.

Para la disociación de las células adherentes se utilizó Tripsina-EDTA (Sigma) permitiendo su actuación durante 1-5 minutos a 37°C, tras lavar con tampón fosfato salino (PBS) para evitar la inactivación de la Tripsina por el SFB. Posteriormente se neutralizó la tripsina añadiendo medio completo y se centrifugó la suspensión celular a 500 xg durante 5 min

En todos los casos, la manipulación de los cultivos se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio All).

3.2.3. Recuento y determinación de la viabilidad celular.

La determinación de la densidad celular y su viabilidad se realizó mediante recuento celular haciendo uso de la cámara de Neubauer, un microscopio óptico invertido (Optiphot, Nikon) y el colorante selectivo Azul de Tripano (Sigma). El Azul de Tripano penetra únicamente en células que han perdido la integridad de la membrana plasmática, por lo que las células no viables adquieren una coloración azul mientras que las células vivas no se tiñen. El colorante se añadió en proporción 1:1 con la suspensión celular y se contó un número de cuadrantes necesarios para contar al menos 100 células.

3.2.4. Congelación y descongelación de líneas celulares

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

Para la descongelación de los viales, se añadió gradualmente 10 mL de medio atemperado al criotubo con las células y se centrifugó (500 xg, 5 min). Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en medio completo.

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

El cultivo celular 3D de las líneas celulares de NB se realizó por el método de la gota colgante, generando agregados multicelulares denominados esferoides. Este método se basa en la adición de un agente viscosante al medio de cultivo que aumenta su densidad y permite la disposición de la suspensión celular en gotas suspendidas en la cubierta de una placa de Petri. A partir de cultivos celulares convencionales (2D) se preparó una disolución celular a la concentración deseada en DMEM completo con un 20% de Methocell (12 g/L metilcelulosa (Sigma) en DMEM) como agente viscosante. Con la ayuda de una pipeta multicanal se depositaron gotas de 30 μ L en la tapa de placas Petri (Thermo Scientific Nunc), quedando colgadas al voltear la tapa. El fondo de las placas se mantuvo cubierto con agua mili-Q estéril para mantener una alta humedad y evitar el secado de las gotas. Tras 48 horas de incubación, tiempo estimado para su consolidación, los esferoides fueron trasladados individualmente a los pocillos de una placa de 96 pocillos de fondo redondo tratada con la solución antiadherente Anti-Adherence Rinsing Solution (Stemcell) para evitar la adhesión del esferoide. Toda la manipulación de los esferoides se realizó con puntas de micropipetas de 200 μ L seccionadas \approx 10 mm para aumentar el diámetro del orificio y evitar la deformación o fragmentación del esferoide.

3.2.6. Disgregación de los esferoides.

Para aquellos ensayos en los que fue necesario el estudio de las células que conformaban los esferoides de forma individual, estos fueron disgregados siguiendo el protocolo descrito para 2D en el apartado 3.2.2 de materiales y métodos, aumentando el tiempo de actuación de la solución Tripsina-EDTA a 5-10 minutos. Tras la incubación, se realizó una rápida resuspensión mecánica.

3.3. Caracterización celular por citometría de flujo.

Para determinar la proporción de las poblaciones celulares en cultivos de PBMCs y las características de las células NK, se realizaron marcajes extracelulares de diferentes proteínas de membrana con anticuerpos específicos unidos a fluoróforos y se analizaron por citometría de flujo. En todos los casos se realizó el marcaje de las proteínas CD3 y CD56, obteniéndose la proporción de las poblaciones resultantes: CD3⁺ CD56⁻, correspondiente a los linfocitos T, CD3⁻ CD56⁺, correspondiente a las células NK y CD3⁺ CD56⁺ correspondiente a las células NKT. Los anticuerpos anti CD3 y CD56 utilizados fueron: anti-CD3 VioGreen, anti-CD56 PerCP-Vio700, y anti-CD56 PE, según los requerimientos del panel, todos obtenidos en Miltenyi Biotec. Otros anticuerpos utilizados en el estudio fueron: anti-CD335 (NKp46) APC, anti-CD336 (NKp44) PE, anti-CD159a (NKG2A) PE-Vio770 y anti-CD107a-APC de Miltenyi Biotec; anti-CD337 (NKp30) PE y anti-CD314 (NKG2D) BV421 de BD Bioscience y anti-PD1 Alexa Fluor700 de Biolegend. Todos los marcajes se realizaron con una dilución del anticuerpo 1:50 en PBS 5% SFB durante 20 minutos a 4°C en oscuridad. Además de los anticuerpos nombrados, se usó un anticuerpo bloqueante de los receptores de la región constante de los anticuerpos, *FcR blocking reagent* (Miltenyi Biotec). En los casos que el análisis por citometría no se hacía a continuación del marcaje, se fijaban las muestras para su

conservación. Para ello se lavó con 1mL de PBS y se añadió 200 μ L de paraformaldehído (PHA, Sigma) al 4%.

El citómetro empleado fue el Citómetro analizador Gallios (Beckman Coulter), el cual dispone de tres láseres (488, 630, 405nm) y 10 detectores de fluorescencia además de dos detectores que nos permiten analizar el tamaño y la complejidad celular (FSC o *Forward Scatter* y SSC o *Side Scatter*). El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Kaluza de Beckman Coulter.

3.4. Obtención de células NK a partir de sangre periférica de donantes sanos.

3.4.1. Aislamiento de PBMCs.

Partiendo de muestras de “*buffy-coat*” (capa leucocitaria obtenida a partir de la centrifugación de sangre total) proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón se realizó un aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs, del inglés, *peripheral blood mononuclear cell*). Para ello se usó la centrifugación en gradiente de densidad (500 xg, 30 min, deceleración 3/10) del *buffy-coat*, previamente diluido 1:5 en PBS, en Ficoll (Histopaque, Sigma-Aldrich) a partes iguales. Tras la centrifugación se recogieron las PBMCs que forman una fase blanquecina intermedia entre el plasma y el Ficoll. Las células obtenidas se lavaron con PBS y se determinó su densidad celular.

3.4.2. Separación de células NK.

La purificación de las células NK a partir de cultivos de PBMCs se llevó a cabo mediante el sistema de separación inmunomagnética MACS™. Este sistema selecciona la población celular a separar con una alta selectividad mediante anticuerpos, los cuales están unidos a microesferas metálicas. El método de selección de las células marcadas es a través de columnas superparamagnéticas, las cuales se introducen en un campo magnético, generado por la unión de dos potentes imanes. La suspensión de células se pasa por la columna, de forma que solo aquellas marcadas quedan retenidas.

Se utilizaron las columnas magnéticas LS (Miltenyi Biotec) y se siguió el protocolo de marcaje del fabricante. Se realizó una selección positiva de las células NK mediante el uso del anticuerpo anti-CD56 MicroBeads (Miltenyi Biotec). La proteína CD56 es expresada únicamente por células NK y NKT, por lo que con este método se aíslan estas poblaciones, siendo las células NK mayoritarias en la sangre. Se realizó una incubación durante 15 min a 4°C con una relación de 20 μ L de anticuerpo en 80 μ L de tampón MACS por cada 10^7 PBMCs totales. El tampón MACS es PBS con un 5% de SFB y 50mM de EDTA. Una vez colocadas las columnas en el campo magnético, se agregó la suspensión celular y se lavó tres veces con tampón MACS. Tras los lavados, se extrajo la columna del campo magnético y se eluyeron las células NK agregando 3 mL del tampón a alta presión mediante el uso del émbolo.

3.5. Expansión de células NK.

La expansión de células NK se realizó durante 14 días añadiendo cada 3 días IL-2 (100 U/mL, Miltenyi Biotec.), IL-15 (5 ng/mL \approx 10 U/mL, Miltenyi Biotec.) y células

estimuladoras K562 o R69 en ratio 1:10 PBMC:célula estimuladora en medio de cultivo RPMI completo. A continuación, se denominará “protocolo K562” y “protocolo R69” al descrito utilizando la línea celular K562 o R69 respectivamente, como células diana. La IL-15 está involucrada en el desarrollo, expansión y supervivencia de las células NK, mientras la IL-2 en su proliferación y citotoxicidad³⁷.

Las células estimuladoras fueron previamente tratadas con mitomicina-C (25 µg/mL) en RPMI sin SFB durante 90 min a 37°C y en oscuridad. Para inactivar la mitomicina-C se lavó con medio RPMI completo y se incubaron de nuevo en RPMI completo durante 30 min para eliminar los restos de la droga. El tratamiento con mitomicina-C arresta el ciclo celular, de forma que evita su proliferación para mantener el ratio deseado de células estimuladoras.

3.6. Incubación overnight de células NK.

Se realizaron incubaciones *overnight* (≈16 horas) de cultivos de PBMCs obtenidos de sangre periférica de donantes sanos, en medio RPMI completo con IL-15 (5 ng/mL ≈10 U/mL) o IL-15 junto con células K562 como células estimuladoras a ratio 2:1 PBMC:K562. Estas células posteriormente serán designadas células NK preincubadas.

3.7. Citotoxicidad de las células NK frente a células de neuroblastoma.

Para estudiar la citotoxicidad de las células NK, tanto expandidas como preincubadas (apartados 3.5 y 3.6) se enriquecieron los cultivos en células NK mediante selección de las células CD56⁺ por MACS (materiales y métodos 3.4.2) y se utilizó como diana células SH-SY5Y GFP o SK-N-BE(2)-C. Los co-cultivos se realizaron sembrando 20.000 células de NB en placas de 96 pocillos de fondo plano (Thermo Scientific Nunc) en el caso de cultivos 2D y en el caso del cultivo 3D, un esferoide de 20.000 células SH-SY5Y GFP en placa de 96 con fondo redondo tratado con solución antiadherente.

Las células NK preincubadas se enfrentaron a cultivos 2D utilizando ratios efectora:diana 6:1 y 1:1 con o sin el mAb Pembrolizumab (anti-PD1) a una concentración de 50 µg/mL. Se usó como control células SH-SY5Y GFP incubadas sin células NK. Se cuantificó el número de células viables a las 24 horas de co-cultivo mediante conteo celular del pocillo completo. Para ello se tomaron imágenes de la fluorescencia verde del fondo del pocillo completo con el Sistema de Microscopía Multidimensional Leica AF6000 LX y se analizaron con el software Fiji, basado en ImageJ. Previamente se había puesto a punto la técnica realizando el conteo de células SH-SY5Y en concentraciones crecientes (de 10.000 a 50.000 células/pocillo).

Las células NK expandidas 14 días se enfrentaron a cultivos 2D y 3D de células SH-SY5Y GFP en ratios efectora:diana 1:1 y 3:1. La citotoxicidad de las células NK expandidas también se testó contra cultivos 2D de la línea celular SK-N-BE(2)-C. Como control se usaron células incubadas sin células NK. En el caso de la citotoxicidad frente a esferoides se añadió IncuCyte® Anexina V-RED (Essen Bioscience, máximos Ex./Em. 593/614 nm) en dilución 1:200 o 7-Aminoactinomicina D (7-AAD, Immunostep, máximos Ex./Em. 546/647 nm) en dilución 1:100 en medio de cultivo completo. La

Anexina V es una proteína con afinidad de unión por la fosfatidilserina (PS), fosfolípido presentado en la parte exterior de la membrana celular únicamente en condiciones de apoptosis, por lo que la Anexina V se utiliza conjugada a un fluoróforo como marcador de apoptosis. El 7-AAD es un compuesto químico fluorescente que presenta una alta afinidad por el DNA, intercalándose con él, pero no permeabiliza a través de la membrana de células viables, por lo que se utiliza como marcador de necrosis. Ambos marcadores de muerte se seleccionaron para poder realizar un análisis de los parámetros de muerte. En condiciones fisiológicas, las células apoptóticas son fagocitadas al presentar PS en la membrana externa, pero en condiciones *in vitro*, estas degeneran hasta mostrar rasgos de necrosis, por lo que inicialmente las células apoptóticas marcan Anexina V y posteriormente tanto Anexina V como 7-AAD.

El co-cultivo de células NK expandidas y de neuroblastoma se mantuvo en incubación en el equipo IncuCyte® S3 (Essen Bioscience), tomándose imágenes cada 3 horas durante 48 horas en el caso del cultivo 2D de SH-SY5Y GFP y cada 45 minutos durante 72 horas en el caso del cultivo de esferoides. El sistema IncuCyte® de imagen y análisis de células vivas consta de un microscopio óptico con dos láseres de fluorescencia (filtro verde máx. Ex./Em. 460/524nm; filtro rojo máx. Ex./Em. 585/635nm) integrado en un incubador que permite la toma de imágenes a tiempo real de cultivos celulares manteniendo las condiciones óptimas para el crecimiento celular y reduciendo la manipulación de la muestra. Se tomaron imágenes del fondo del pocillo con un intervalo de 45 min con el objetivo de 10 aumentos, en campo claro, fluorescencia verde y roja. Las imágenes obtenidas fueron analizadas con el software IncuCyte.

3.8. Ensayo de degranulación de células NK.

Se estudió la degranulación de las células NK utilizando la proteína CD107a, previamente descrita como marcador de degranulación⁵⁴. Para ello se cuantificó la expresión en membrana de CD107a por citometría de flujo mediante el marcaje con el anticuerpo anti-CD107a-APC (materiales y métodos 3.3) tras 5 horas de incubación de los PBMCs con células diana a una ratio PBMC:diana 1:2, buscando favorecer el contacto entre la célula NK y la célula diana. Como células diana se utilizaron las líneas celulares K562 y SH-SY5Y. Como control se utilizó PBMCs sin células dianas. Durante el co-cultivo se añadió BD GolgiStop™ (BD Biosciences) que contiene monensina, un bloqueante del transporte proteico, que impide el reciclaje de esta proteína durante el ensayo, para así poder detectarla con el marcaje extracelular.

3.9. Marcaje de células NK viables con eFluor 670.

Para poder realizar el seguimiento de las células NK durante el co-cultivo con esferoides SH-SY5Y GFP se marcaron células NK purificadas con la sonda fluorescente roja eFluor 670 (eBioscience™, máx. Ex./Em. 633/670 nm). Esta sonda se une de forma covalente a proteínas celulares con aminas primarias, distribuyéndose de forma equitativa con la división celular.

El marcaje se realizó en tampón PBS 5% SFB de complementado, añadiendo una concentración final de 3 μ M de la sonda eFluor 670 y una densidad celular de 1×10^6

células/mL. Se resuspendieron las células en la mitad del volumen de marcaje necesario y se diluyó la sonda en un volumen igual para a continuación agregarlo lentamente a la suspensión celular. Se dejó incubar 10 min a 37°C y 5 min más a 4°C para detener el marcaje. Para eliminar el exceso de sonda, se realizaron lavados con medio RPMI completo y se realizó una incubación durante 40 minutos a 37°C en medio que después se retiró. Para evitar la pérdida de fluorescencia se trabajó en oscuridad, manteniendo esta condición en los experimentos posteriores con las células marcadas.

3.10. Inmunofluorescencia.

3.10.1. Preparación de cubreobjetos con poli-L-lisina.

Se prepararon cubreobjetos de 12 mm con poli-L-lisina (PLL). Para ello se dispusieron en placa de 24 donde tras limpiarlos con alcohol etílico se añadió solución de PLL (0.1mg/mL en PBS, Sigma) suficiente para cubrir toda la superficie y se dejó incubar durante 2 horas. Para evitar la evaporación de la solución la incubación se realizó en una cámara de humedad, un recipiente con tapa con papel humedecido en su interior. Tras la incubación se lavó por triplicado con PBS.

3.10.2. Preparación de muestra.

Se realizó el marcaje de las proteínas PD1, CD107a y CD3 sobre una población de células CD56⁺ seleccionadas por MACS. Se añadieron las células sobre cubreobjetos tratados con PLL en PBS y se dejó 30 min en incubador para su adhesión. A continuación, se fijaron las células con un PHA al 2% en PBS overnight. Se lavó por triplicado con PBS y se permeabilizaron las células con el detergente RIPA en dilución 1:2 durante 10 min a temperatura ambiente. Se lavó con 0.01% Triton X-100 (PBSRT) 5% SFB en PBS. Posteriormente se añadió la solución bloqueante (1mg/mL BSA, 5% SFB en PBS) durante 1 hora a 4°C para reducir el marcaje inespecífico. Una vez preparadas las células se realizó el marcaje con los anticuerpos CD3-VioGreen, CD107a-APC and CD159a (PD1)-VioBright FITC, todos de Miltenyi en dilución 1:200 en solución bloqueante, y desde entonces se evitó la luz directa sobre las muestras. Se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se lavó por triplicado con PBST 5% SFB y se añadió una gota de Fluoromount-G (Thermo Fisher), medio de montaje, adecuado para la preservación de la muestra ya que reduce la pérdida de fluorescencia por *quenching*. Durante todo el proceso se trabajó en cámara de humedad para evitar la evaporación excesiva.

Las muestras se visionaron por microscopía confocal de fluorescencia, con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan. El estudio de colocación de las imágenes se realizó mediante el plugin Coloc 2 del software Fiji, obteniendo el coeficiente de Manders entre las señales de CD170 y PD1 definiendo cada célula como región de interés (ROI). Las células NK y NKT se diferenciaron por la ausencia/presencia de marcaje para CD3.

3.11. Análisis estadístico.

El tratamiento estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad Prism versión 5 y IncuCyte. Los valores obtenidos en este trabajo se muestran como las medias \pm su

desviación estándar, incluyendo los representados en los diagramas de puntos y las gráficas de barras. Se consideró significativo una p menor de 0,05. En las variables de dos grupos se aplicó el test estadístico t-student y para las variables con más de dos grupos se le aplicó un test ANOVA de dos factores.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Revisión bibliográfica: inmunoterapia contra el neuroblastoma.

En los últimos años ha tenido un gran auge la investigación en inmunoterapia, generando en poco tiempo nuevas terapias efectivas contra el cáncer, lo que ha aumentado la relevancia actual de este campo. El desarrollo de la inmunoterapia ha pasado por varias fases, desde la primera vacuna contra el cáncer a finales del siglo XIX, cuando William B. Coley estudiaba la inyección de toxinas en tumores⁵⁵, infravalorada en el momento por el auge de la quimioterapia, el boom de los anticuerpos monoclonales y la etapa actual en la que se está evolucionando hacia la terapia celular^{22,29}.

En el tratamiento del NB de alto riesgo, la inmunoterapia más estandarizada es el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-GD2^{1,4,53}. El anticuerpo, ch14.18 o dinutuximab, es un anticuerpo quimérico de tipo IgG1⁵⁶ cuyo mecanismo de acción se basa en la actividad ADCC de las células NK que desencadena al unirse al tumor⁵⁷. Aunque en este caso el desencadenamiento de la actividad de las células NK se dé principalmente vía el receptor de activación CD16, en la eficacia de este anticuerpo también se ha visto la relevancia del haplotipo HLA y receptores KIR del paciente⁵⁸. El disialogangliósido GD2, se expresa durante el desarrollo embrionario, estando sobreexpresado en tumores del neuroectodermo como el NB. El glucolípido GD2 también se encuentra en algunas fibras nerviosas periféricas, causando graves dolores que deben ser tratados, por lo que se está trabajando en la selección de anticuerpos contra variantes de GD2 limitadas a NB⁵³. Otro efecto secundario perjudicial observado en esta terapia ha sido el síndrome de liberación de citoquinas⁵⁹. La sobreexpresión de GD2 en NB también se ha utilizado para vehicular liposomas con antineoplásicos al añadir fragmentos de anti-GD2 o linfocitos T, con anticuerpos bi-específicos para GD2 y CD3⁵³.

Actualmente las líneas de investigación en inmunoterapia contra NB son múltiples (Figura 4), siendo una de ellas el bloqueo de los puntos de control inmunitarios. La expresión de PD-L1 ha sido observada en NB, por lo que el bloqueo de la vía de inmunosupresión PD1/PDL1 combinada con otras terapias, es una de las líneas actuales de investigación. Actualmente se está desarrollando un estudio clínico en fase I (NCT01822652) y tres en fase II (NCT02304458, NCT02332668, NCT02541604) con estas características en pacientes de NB de alto riesgo¹. Además, la terapia adoptiva con células NK ha mostrado buenos resultados en cánceres infantiles, especialmente en neoplasias hematológicas, pero su aplicación en tumores sólidos como el NB comienza a mostrar resultados positivos⁴⁴.

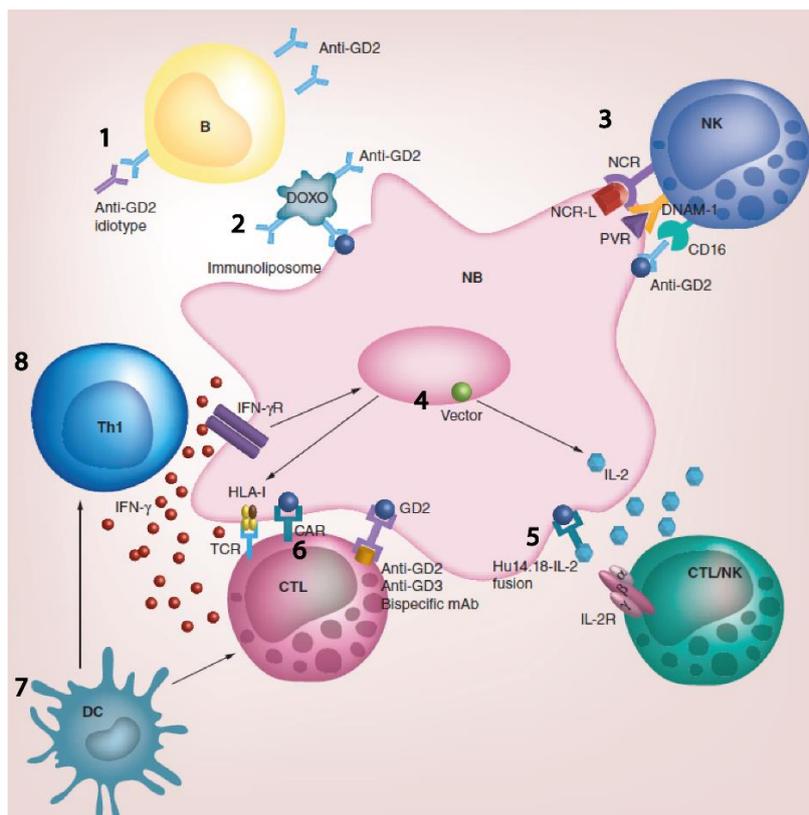


Figura 4. Diferentes enfoques de la inmunoterapia en neuroblastoma⁵³. 1) Anticuerpos anti-idiotipo activan linfocitos B para inducir la producción del anticuerpo anti-GD2. 2) Vehiculización de liposomas con antineoplásicos mediante anticuerpos anti-GD2. 3) Las células NK reconocen las células de NB a través de los receptores de citotoxicidad natural o DNAM-1 y también por CD16 por el reconocimiento de anticuerpos anti-GD2 mediante ADCC. 4) La modificación genética del NB induce la producción de citoquinas que desencadenan la actividad de células NK o CTLs. 5) La inmunocitoquina IL-2 fusionada con anti-GD2 activa a los linfocitos en el entorno tumoral. 6) Linfocitos T modificados genéticamente reconocen y lisan células de NB de forma independiente a la expresión de HLA. 7) Células dendríticas expuestas *in vitro* a NB inician la respuesta de linfocitos T contra el NB. 8) CTLs obtenidos por vacunación con antígenos, reconocen células de NB vía HLA-I en respuesta a INF- γ .

4.1.1. Las células NK y el neuroblastoma.

Entre los linfocitos citotóxicos, las células NK presentan un gran potencial antitumoral, siendo una herramienta prometedora contra tumores agresivos como el NB de alto riesgo. Diferentes estudios han mostrado la sensibilidad *in vitro* e *in vivo* de líneas celulares derivadas de NB y de cultivos primarios a la citotoxicidad ejercida por las células NK⁵⁹. Además, como ya se ha descrito, la inmunoterapia más estandarizada contra NB, la administración de anti-GD2, tiene como mecanismos de acción el desencadenamiento de la ADCC, debiendo su eficacia por lo tanto a la activación de las células NK mediante el receptor CD16.

Las señales que modulan la citotoxicidad de las células NK son numerosas y diversas. En el reconocimiento de un neuroblasto transformado por las células NK las principales señales de activación que recibe están mediadas por los receptores NKp30, NKp44 y

NKp46 pese a conocerse solo parcialmente sus ligandos^{53,60}. Entre los ligandos presentes en el NB, los que influyen mayormente en el desencadenamiento de la actividad citotóxica son las proteínas MHC-I, PVR y B7-H3⁵⁹. La proteína MHC-I tiene un papel importante inhibiendo la actividad de las células NK contra las células sanas del organismo. La reducción de su expresión por parte de los neuroblastos tumorales se traduce en una señal de activación para las células NK. La activación de estas células inmunes, no solo provoca la secreción de gránulos citotóxicos, sino que, además, producen INF- γ , el cual aumenta la expresión de MHC-I. Esto favorece que las células tumorales puedan ser reconocidas por los linfocitos T al presentar péptidos en el MHC-I, desencadenando una respuesta coordinada entre el sistema inmune innato y el adaptativo. Este efecto de modulación *in vivo* de la expresión de MHC-I podría darse tras la administración de mAb anti-GD2, siendo uno de los mecanismos que influyen en el éxito de la terapia. En un experimento con ratones se observó este efecto con el uso de IL-2 ligada a un mAb contra GD2, tras desencadenarse la respuesta de las células NK se observó un aumento de expresión de MHC-I⁶¹.

Para desencadenar la actividad citotóxica de las células NK, además de una reducción en las señales inhibitorias, se requiere una señal de activación, que supere un valor umbral³⁶. En un estudio sobre muestras de NB de pacientes, pese a los bajos niveles de MHC-I que expresaban, se observó heterogeneidad en cuanto a su susceptibilidad frente a las células NK. Los neuroblastos que mostraron mayor susceptibilidad a la lisis eran aquellos que presentaban un mayor nivel de expresión de la proteína PVR, ligando del receptor de coestimulación DNAM-1⁶². Se observó que estas células procedían de los pacientes que estaban en un estadio inicial de la enfermedad, mientras que menores niveles de PVR, junto con menor susceptibilidad a la lisis, correspondían a las muestras de pacientes con recidivas. Además, se vio que los tumores de pacientes en estadio M, expresaban B7-H3, molécula de la familia de los ligandos de los puntos de control inmunitario CTLA-4 y PD1, que, aunque se desconoce su receptor, se ha indicado como diana terapéutica contra el cáncer ya que parece estar implicada en los mecanismos de evasión del sistema inmune⁶³, cuyo bloqueo se ha visto potenciar la lisis del NB mediada por células NK⁶⁴. Tanto la disminución de PVR como la presencia de B7-H3 en las muestras de tumores en estadios más avanzados de la enfermedad, se explica mediante la presión selectiva que ejerce el sistema inmune en las células tumorales en el marco de la teoría de la inmunosedición del cáncer.

Además de las interacciones directas entre las células NK y los neuroblastos, existen diferentes mecanismos de inmunosupresión relacionados con el TME. La secreción de TGF- β 1 por parte del tumor, reduce la expresión de receptores de activación además de promover su conversión hacia células linfoides subtipo 1 (ILC-1), sin actividad citotóxica, seleccionándose la población beneficiosa para la progresión del tumor. Otro factor del TME con relevancia en la inmunosupresión del NB son los TAMs. Los TAMs infiltrados presentan predominantemente fenotipo M2, los cuales tienen propiedades inmunomoduladoras como la inhibición de las células NK. Sin embargo, se ha observado que estos macrófagos mantienen la plasticidad, pudiendo revertir hacia un fenotipo M1 con los estímulos adecuados, como el LPS, los cuales promueven una fuerte respuesta

antitumoral de las células NK. Además, se ha observado que una vez activadas las células NK autólogas eliminan selectivamente a la población de macrófagos M2, por el bajo nivel de expresión de MHC-I que les caracteriza^{59,65}.

Más allá del reconocimiento entre la célula inmune y la célula tumoral, la actividad de las células NK depende de otras condiciones del TME como la privación de nutrientes y oxígeno, así como las altas concentraciones de desechos metabólicos como el lactato y la adenosina⁶⁶ (Figura 5).

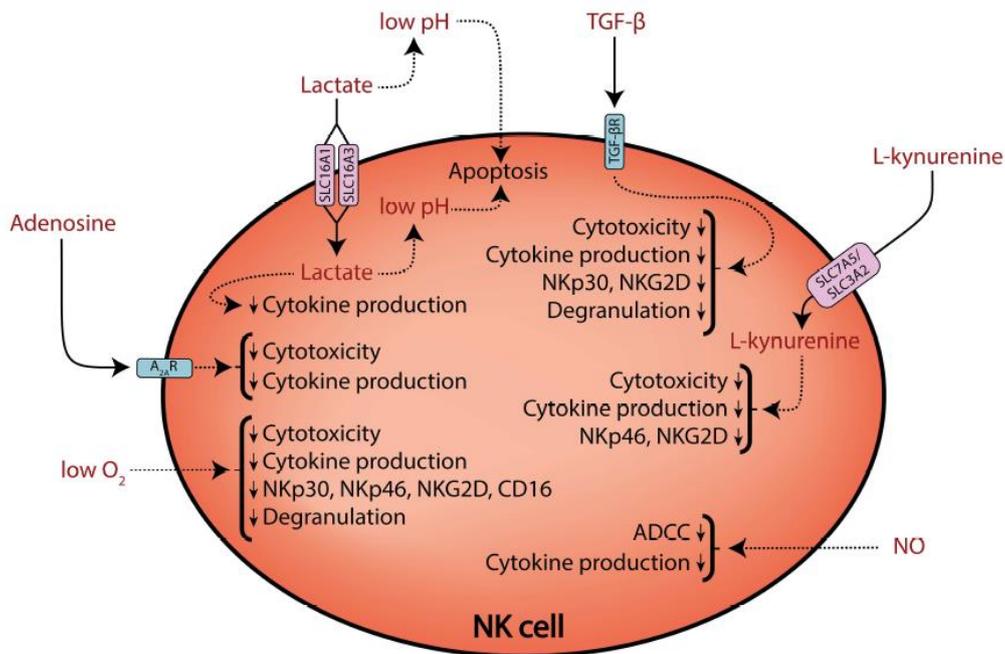


Figura 5. Metabolitos y factores presentes en el TME que limitan la actividad efectora de las células NK⁶⁶.

Estas restricciones metabólicas limitan las funciones efectoras de las células NK, por lo que su estudio también puede generar dianas para mejorar la actividad antitumoral de las células NK.

4.1.2 Inmunoterapia basada en células NK contra el neuroblastoma.

Las células NK tienen un importante papel en el control de crecimiento del NB, aunque linfocitos T y anticuerpos también contribuyen^{1,4,53}. La infiltración de células NK en el microentorno de tumores sólidos controla el crecimiento tumoral y confiere un pronóstico favorable⁴⁰. Por ello, la inmunoterapia basada en células NK contra NB de alto riesgo se presenta como una línea de investigación capacitada para el desarrollo de terapias efectivas. Entre las opciones disponibles, la terapia adoptiva con células NK se presenta como una herramienta particularmente efectiva en el tratamiento de condiciones residuales de la enfermedad, alcanzadas tras el tratamiento estándar en pacientes de NB de alto riesgo. Ensayos preclínicos han mostrado la eficacia de células NK adoptivas contra NB pese a mostrar limitaciones en la infiltración en el tumor⁶⁷. El reconocimiento del haplotipo de MHC propio tiene un importante papel en la activación de las células NK, por lo que el uso de células NK alogénicas presenta potentes ventajas frente a la

terapia adoptiva de células NK autólogas. Las células NK alogénicas pueden actuar tanto contra tumores con un nivel de expresión de MHC-I reducido, como contra tumores que mantengan su expresión, al enfrentarse contra células tumorales con un MHC haploidéntico, promoviendo el desemparejamiento entre los receptores inhibitorios KIRs y sus ligandos. El haplotipo MHC del paciente se han relacionado con diferencias en la respuesta al tratamiento del NB, por lo que es un importante factor a tener en cuenta en la hora identificar a los pacientes que puedan beneficiarse de inmunoterapia con células NK⁵⁸. En vista de la actividad contra el NB de las células NK, la terapia adoptiva con células NK expandidas *in vitro* se está testando actualmente en estudios clínicos en fase I y II⁵³. En un estudio en fase II con 12 participantes (NCT01807468) se estudia la administración de células NK alogénicas en casos de NB de alto riesgo tras no responder a los tratamientos estandarizados de quimioterapia a altas dosis y trasplante autólogo de células madres. En este estudio se selecciona el donante de células NK que presente un mayor grado de desemparejamiento KIR-KIR ligandos. En otro estudio en fase II con 5 pacientes se propone la mejora del tratamiento de anti-GD2 como tratamiento de consolidación combinándolo con células NK expandidas *in vitro* (NCT03242603), siendo varios los estudios similares que combinan células NK expandidas y anticuerpos o inmunocitoquinas (NCT03209869, NCT02573896). También se estudian nuevos regímenes de tratamiento sobre pacientes de NB de alto riesgo sin tratamiento previo, combinando inmunoterapia de baja intensidad con anticuerpos anti-GD2 y células NK alogénicas (NCT01857934, NCT00877110).

El NB de alto riesgo es un tumor sólido infantil con una alta tasa de mortalidad, por lo que urge la investigación de nuevas terapias efectivas. La inmunoterapia actualmente es una potente línea de investigación contra el cáncer mostrando buenos resultados, aun siendo mayormente sobre tumores hematológicos. Las condiciones restrictivas que se presentan en los tumores sólidos como el NB suponen una de las principales trabas para el tratamiento con inmunoterapia de estas neoplasias. El desarrollo de nuevas terapias pasa por lo tanto por el ensayo en modelos de estudio complejos que presenten características inmunosupresoras del TME como la presencia de hipoxia, limitaciones a la infiltración de células inmunes y la expresión de puntos de control inmunitario como PD1. La capacidad antitumoral intrínseca de las células NK mediante la lisis celular y la sensibilidad mostrada por el NB, presenta la terapia adoptiva con células NK como una prometedora herramienta para el tratamiento del NB de alto riesgo.

4.2. Caracterización del crecimiento y formación del núcleo necrótico en esferoides de la línea celular SH-SY5Y.

Con el objetivo de estudiar la influencia de factores presentes en el microentorno tumoral del NB, como la presencia de zonas necróticas, se trabajó en el desarrollo de un modelo de cultivo celular en 3D de NB con núcleo necrótico. Trabajos previos en nuestro laboratorio no obtuvieron pruebas concluyentes sobre la presencia o no de núcleo necrótico en esferoides de entre 2.000 y 10.000 células SH-SY5Y. Continuando con los trabajos anteriores, se sembraron esferoides de la línea SH-SY5Y GFP y se marcó con 7-AAD, aumentando el número de células iniciales por esferoide a 20.000 y tras los dos días en gota colgante requeridos para su formación, se visualizaron en tiempo real tomando imágenes cada 45 minutos durante 3 días por microscopía óptica de fluorescencia en el equipo IncuCyte®. A tiempo inicial, los esferoides se observaron como agregaciones densas, con una intensidad de fluorescencia verde homogénea y presencia de células necróticas en periferia (Figura 6A). Con el transcurso del tiempo, se redujo el marcaje necrótico en periferia, se observó un aumento del área del esferoide y una pérdida de intensidad de fluorescencia verde en la zona central. Al finalizar el seguimiento, los esferoides, de 5 días desde su formación, presentaban tinción del núcleo con 7-AAD, identificándolo como núcleo necrótico. La intensidad de la tinción con 7-AAD en el interior del esferoide fue menor a la observada al inicio en la superficie de este, pudiendo deberse a la barrera a la difusión que presenta la estructura tridimensional, así como a la matriz intracelular, efecto que ha sido caracterizado para la difusión de nutrientes y fármacos⁶⁸⁻⁷⁰. Otro factor que podría influir en la observación de fluorescencia roja menos intensa en el marcaje del interior del esferoide sería la barrera óptica que suponen las propias células del esferoide. La fluorescencia a 635 nm emitida por el 7-AAD tras su excitación, debe atravesar una densa capa de células hasta llegar al objetivo, produciéndose la difracción de la fluorescencia. Las características de grosor y densidad de estos cultivos limitan la calidad de las imágenes obtenidas mediante las técnicas de microscopía convencionales⁷¹.

De forma cuantitativa, se analizó el crecimiento de los esferoides con el software IncuCyte, observando un aumento del área en un $24\% \pm 2$ en tres días (Figura 6B), alcanzando un área final de $4 \cdot 10^5 \mu\text{m}^2 \pm 0,5 \cdot 10^5$. El crecimiento observado, muestra un máximo relativo entorno a las 60 horas, una caída del crecimiento y luego continua de forma lineal hasta finalizar el experimento. Esta forma de crecimiento fue descrita por Wallace *et al* en 2013, durante el desarrollo de un modelo matemático para el crecimiento de los esferoides⁷¹. El modelo define tres regiones del esferoide dispuestas en capas, una exterior de células proliferativas, una intermedia de células quiescentes y una región interior de células necróticas, por lo que concuerda con la observación de núcleo necrótico en el modelo desarrollado.

Para respaldar los resultados obtenidos, se estudió la viabilidad de los esferoides mediante el recuento celular en cámara de Neubauer y la tinción con Azul de Tripano (materiales y métodos 3.2.3). Se determinó la viabilidad de esferoides de 50.000 células tras dos días de consolidación del esferoide en gota colgante, así como a los 12 días desde su

formación. El porcentaje de muerte obtenido pasó de $4,3\% \pm 0,13$ a día dos, a $23\% \pm 16$ a día 12. Este dato, junto con las imágenes obtenidas por microscopía y la línea de crecimiento del esferoide, indican el aumento de muerte celular en el cultivo en función del tiempo, la cual, según las imágenes obtenidas y el modelo matemático descrito, se localizaría en el núcleo de esferoide, coincidiendo con la literatura previa sobre la formación de núcleo necrótico en esferoides celulares^{68,71,72}.

La necrosis tumoral se ha descrito como un factor de mal pronóstico relacionado con la invasión y progresión del tumor. La necrosis, al contrario que la apoptosis es un tipo de muerte celular que promueve la inflamación mediante la liberación de factores que desencadenan la respuesta inmune. La inflamación inicial, promueve la migración y maduración de las células inmunes, incluidas las células NK, mientras que, a largos tiempos, la inflamación tiene efecto inmunosupresor⁷³⁻⁷⁵. Por ello la necrosis tumoral podría modular la infiltración de células inmunes y regular la eficacia de la terapia adoptiva con células NK. Los resultados obtenidos, sugieren que el modelo de cultivo celular 3D desarrollado será adecuado para el estudio de la influencia de la necrosis tumoral en NB sobre la terapia celular con células NK.

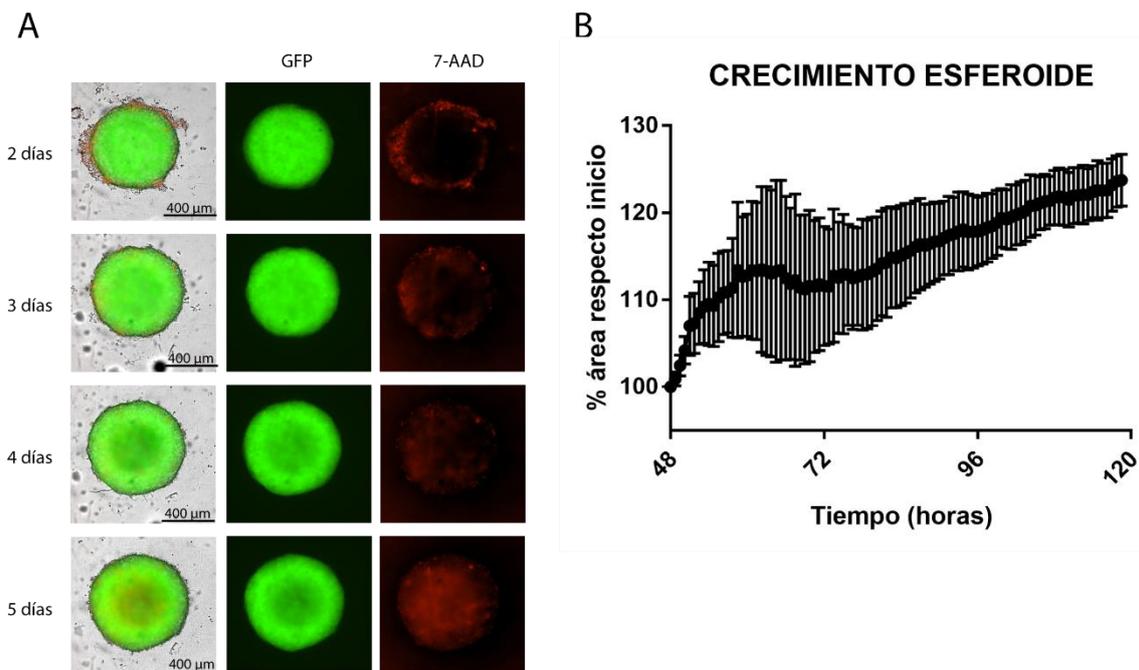


Figura 6. Crecimiento y generación de núcleo necrótico en esferoides de la línea SH-SY5Y GFP de 20.000 células. Se estudiaron esferoides tras dos días de su formación por el método de gota colgante (materiales y métodos 3.2.5) **A.** Imágenes obtenidas por microscopía óptica de fluorescencia con el sistema IncuCyte, indicando los días tras su formación. La primera columna muestra la suma de canales obtenidos: campo claro, fluorescencia a 524nm, de la proteína GFP de las células tumorales y fluorescencia a 635 nm, correspondiente a la tinción con 7-AAD añadido para el marcaje de necrosis. La columna central y derecha muestran la fluorescencia verde y roja de forma individual. **B.** Gráfica representando el porcentaje de crecimiento del área total del esferoide respecto al tiempo en horas desde su formación.

4.3. Expansión de células NK a partir de sangre periférica de donantes sanos.

Para estudiar la influencia del núcleo necrótico sobre la actividad de células NK se establecieron unos protocolos de expansión y activación de células NK. A partir de PBMCs de sangre periférica de donantes sanos proporcionada por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón (materiales y métodos 3.4.1) se realizaron expansiones de células NK siguiendo dos protocolos, protocolo K562 y protocolo R69 (materiales y métodos 3.5) con el objetivo de comparar la capacidad citotóxica de las células NK expandidas mediante ambos protocolos. Los protocolos consistían en la combinación de IL-2, IL-15 y células estimuladoras en ratio 10:1 PBMC:célula estimuladora. La diferencia entre protocolos era la línea celular usada como estimuladora, en un caso células K562 y en otro R69. Ambas líneas celulares se han descrito previamente como buenas estimuladoras para la activación de las células NK^{51,76}.

El seguimiento de la expansión se realizó por citometría de flujo mediante la caracterización de las poblaciones celulares presentes con el marcaje extracelular de las proteínas CD3 y CD56. Este marcaje permite definir la población de células CD3⁺ CD56⁻, correspondiente a los linfocitos T; CD3⁻ CD56⁺, células NK, y dobles positivos, correspondiente a células NKT. Los marcajes fueron realizados siguiendo el protocolo de marcaje extracelular descrito en el apartado 3.3 de materiales y métodos. Se observó un aumento del porcentaje de células NK en el cultivo a día 5 con el protocolo de expansión K562 llegando al 8% de células NK, mientras que el porcentaje en el cultivo expandido con células R69 se mantuvo similar al inicial, un 4% de células NK (Figura 7A). Sin embargo, a día 14, ambos protocolos alcanzaron un 22% de células NK por lo que, aunque la expansión con el protocolo K562, mostró una mayor proliferación de las células NK en los primeros días de la expansión esta se iguala en los dos protocolos al cabo de 14 días. No obstante, debido a que se trata de una sola réplica de un único paciente, los resultados no son concluyentes para poder afirmar si existen diferencias entre los protocolos. Debido a que el protocolo K562 utilizado, en el que además de las citoquinas IL-2 e IL-15 se utilizaban células K562 como células estimuladoras, era una modificación de los utilizados previamente en el laboratorio, se caracterizaron las células NK presentes en la población de PBMCs frescos y tras cinco días de expansión. Para ello se analizó la expresión en membrana de los receptores de activación, NKp30, NKp40, NKp46 y NKG2D, de los receptores de inhibición NKG2A y PD1 (Figura 7B). Se seleccionaron estas proteínas para la caracterización de las células NK expandidas ya que actualmente son las que presentan un papel más relevante tanto en la regulación de la activación e inhibición de la actividad citotóxica, como en la eficacia en inmunoterapia con células NK⁷⁷. Las proteínas NKp30 y NKp46 se expresaban en la mayoría de células NK y el porcentaje observado no varió con la expansión. Ambos receptores se expresan constitutivamente en las células NK por lo que su presencia en las células recién aisladas concuerda con lo ya descrito⁴³. Se observó un aumento estadísticamente significativo en el porcentaje de células NK que expresaban las proteínas NKp44, NKG2D, NKG2A y PD1.

La expansión de células NK con el protocolo R69 ha sido puesta a punto previamente en el laboratorio^{37,51} y durante este trabajo se obtuvieron resultados con el protocolo K562 similares a los observados en otros protocolos de expansión, como el aumento de NKp44 y NKG2A en las células NK activadas⁷⁷, o la relación positiva entre expresión de NKG2D y actividad citotóxica de las células NK⁷⁸. Durante las expansiones, las células NK mantienen su proporción inicial en el cultivo durante los primeros 5 días, periodo en el que se activan, pero no se multiplican. Posteriormente, se observa un aumento en el porcentaje de células NK, debido tanto a la muerte de otras poblaciones celulares presentes, como a la proliferación de las células NK³⁷. Los resultados obtenidos, con los protocolos de expansión estudiados, son por lo tanto similares a los obtenidos previamente en el laboratorio^{37,51}.

El aumento de NKp44 se relaciona con un fenotipo de células NK activadas por citoquinas⁷⁷ y cuyos ligandos, junto con los de NKG2D, se encuentran aumentados en células tumorales⁴³. Este aumento de receptores de activación, resultan en un fenotipo de células NK más propensas a desencadenar su actividad antitumoral, obteniendo durante la expansión, además de un mayor número de células, células con mejores características antitumorales. Por contrapartida, se observó también el aumento de las proteínas NKG2A y PD1 lo cual se relaciona con fenotipo de senescencia y agotamiento respectivamente⁷⁹. Ambas se estudian en el contexto de la inmunoterapia con células NK y la inmunomodulación del cáncer^{43,80}. El bloqueo de estas vías de inmunosupresión se utiliza actualmente como inmunoterapia siendo un factor a tener en cuenta para el desarrollo de terapias efectivas con estas células.

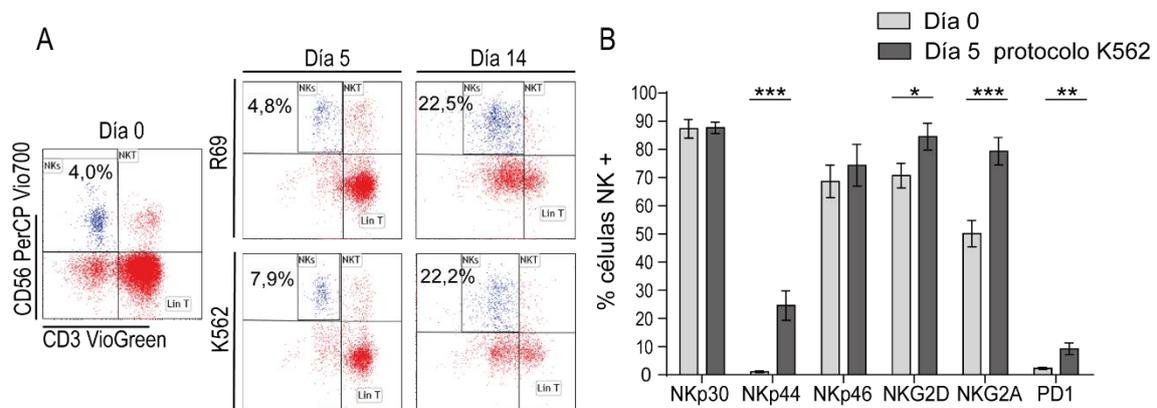


Figura 7. Caracterización de las células NK expandidas por citometría de flujo. Se expandieron células NK a partir de PBMCs de donantes sanos por dos protocolos (materia y métodos 5.6.). **A.** Diagrama de puntos de las poblaciones presentes en el cultivo de células NK en expansión enfrentando el marcaje anti-CD56 PerCP Vio700 y anti-CD3 VioGreen. Se muestran a día 0, PBMCs frescos, a día 5 y 14 de ambas expansiones. R69 indica la expansión de células NK con el protocolo de expansión R69 y K562 con el protocolo K562. Sobre los gráficos se indica el porcentaje de células NK de cada cultivo (n=1) **B.** Gráfico indicando el porcentaje de células NK con expresión positiva respecto al control sin marcar para las proteínas NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D y NKG2A. En gris claro se muestra el marcaje obtenido sobre células NK frescas y en gris oscuro tras 5 días de expansión con el protocolo K562 (n=3). Se muestra la media y la desviación estándar de las medidas. Se aplicó el test estadístico t-student, indicándose cuando se obtuvo diferencia significativa, donde ** indica un $p < 0,01$ y *** $p < 0,005$.

4.4. Citotoxicidad de células NK expandidas frente a cultivos de líneas celulares de neuroblastoma en 2D.

Una vez caracterizado el fenotipo de las expansiones, se estudió la citotoxicidad de las células NK expandidas 14 días. Como diana se utilizaron cultivos de la línea celular derivada de NB humano, SH-SY5Y, tanto en cultivos convencionales 2D como en cultivos 3D. Además, en cultivo 2D también se usaron células SK-N-BE(2)-C. Se obtuvo una población enriquecida de células NK mediante el sistema MACS (materiales y métodos 3.4.2) mediante la selección positiva de células CD56⁺ y se realizaron co-cultivos de células NK y SH-SY5Y GFP a ratios efectora:diana 1:1 y 3:1. Como control se utilizó un cultivo de células SH-SY5Y GFP sin células NK. Se incubaron en el sistema IncuCyte® de imagen y análisis de células vivas para el seguimiento de la citotoxicidad. En el caso de la citotoxicidad contra cultivos 2D se realizaron triplicados de cada condición y se estudiaron las células de dos donantes sanos, tomándose imágenes cada 3 horas durante 2 días. Se observó una disminución de la densidad celular en los co-cultivos respecto al control, en el que se observó crecimiento celular. En ambos protocolos el descenso observado a ratio efectora:diana 3:1 fue mayor que a 1:1 (Figura 8A). Se analizaron las imágenes con el software IncuCyte, obteniendo la intensidad de fluorescencia verde (524nm) integrada por imagen y normalizada respecto al tiempo cero de cada uno de los pocillos, parámetro que se interpretó como el porcentaje de células viables respecto al tiempo inicial (Figura 8B, izquierda). Las gráficas resultantes muestran la cinética de la citotoxicidad entre tiempo cero y 45 horas para todas las condiciones. En las primeras 6 horas se observa la mayor citotoxicidad y tras este tiempo el aumento de citotoxicidad es más lento, continuando prácticamente constante para la ratio 3:1 e incrementándose de nuevo a las 24 horas para la ratio 1:1. Comparando los protocolos de expansión de las células NK, el porcentaje de células se reduce en mayor medida para la expansión llevada a cabo con la línea celular K562 como células estimuladoras. Al estudiar los datos de los donantes sanos por separado, se observa que la diferencia entre los protocolos ocurre de forma más pronunciada únicamente para uno de los pacientes, en el que la citotoxicidad de las células NK expandidas con el protocolo R69 es menor (Figura 8B, derecha). Representando los datos de citotoxicidad como el porcentaje de reducción de fluorescencia respecto al control (Figura 8C), se observa que se alcanza un 95% de reducción para la ratio 3:1 con el protocolo K562 y un 77% para el protocolo R69, mientras que a ratio 1:1 en ambos casos se alcanza entorno a un 65% de disminución. En el trabajo de Sánchez-Martínez *et al.* 2014, se observó una citotoxicidad mayor para células NK expandidas con un protocolo utilizando únicamente células R69 como células estimuladoras, frente a otro utilizando IL-2 y células K562⁸¹. En cambio, en el experimento realizado, los resultados indican una citotoxicidad similar entre protocolos, presentando una tendencia de mayor citotoxicidad en la expansión llevada a cabo con el protocolo K562, pese a no mostrar significancia estadística. La diferencia obtenida respecto al trabajo de Sánchez-Martínez *et al.* 2014, podría deberse a que, en este caso, ambos protocolos contienen IL-2 e IL-15, por lo que la presencia de ambas citoquinas en los protocolos, favorecería preferencialmente la activación de las células NK estimuladas con la línea celular K562. Observando los resultados de la citotoxicidad

por donante (Figura 8B, derecha), se observó que, para uno de ellos, indicado como donante 1, la citotoxicidad de las células NK expandidas con el protocolo R69 fue marcadamente inferior a ambas ratios que con el protocolo K562. Esto señala la alta variabilidad entre células NK de individuos sanos, y la necesidad de seleccionar estímulos adecuados en función del fenotipo de las poblaciones. También indica la importancia de la alogenicidad de las células NK seleccionadas para cada paciente, ya que un mayor nivel de desemparejamiento entre los KIR y sus ligandos promueve una mayor activación de las células NK⁵⁸. Sería interesante estudiar los fenotipos de las células de los donantes durante la expansión de forma conjunta a la citotoxicidad, para poder observar que relación de receptores/ligandos pueden estar implicadas en los diferentes resultados.

Las dos ratios de células NK y células diana utilizados, 1:1 y 3:1 efectora:diana, mostraron una diferencia de citotoxicidad estadísticamente significativa, siendo mayor para las ratios con mayor número de células NK por diana. Esto señalaría la significativa influencia de la ratio efectora:diana en el éxito de la eliminación de las células tumorales, la cual no mostró una relación de proporcionalidad lineal. A tiempo final, no se obtuvo significancia estadística entre las ratios pudiendo deberse a la alta citotoxicidad alcanzada en todos los casos.

Complementariamente se realizó el experimento análogo utilizando como células diana la línea celular derivada de un neuroblastoma infantil SK-N-BE(2)-C, la cual presenta la amplificación del oncogén MYCN, una de las características del NB de alto riesgo. Los resultados se analizaron con el software IncuCyte realizando el recuento de las células SK-N-BE(2)-C debido a que estas células no expresan la proteína GFP. Aunque los resultados no son directamente comparables, mostraron la misma tendencia observada contra la línea SH-SY5Y, mostrando altos niveles de citotoxicidad, siendo esta dependiente de ratio y con una tendencia de citotoxicidad mayor para las células NK expandidas con el protocolo K562 (Figura 8D). Estos resultados reflejan que la citotoxicidad de las células NK no es exclusiva para la línea celular SH-SY5Y, con la que se ha trabajado principalmente, y que éstas son capaces de desencadenar su actividad contra otras líneas de NB con características de mal pronóstico. La obtención de un modelo más preciso sería el desarrollo de organoides derivados de pacientes⁸¹, siendo esta una línea en desarrollo actual en la investigación contra NB en nuestro laboratorio.

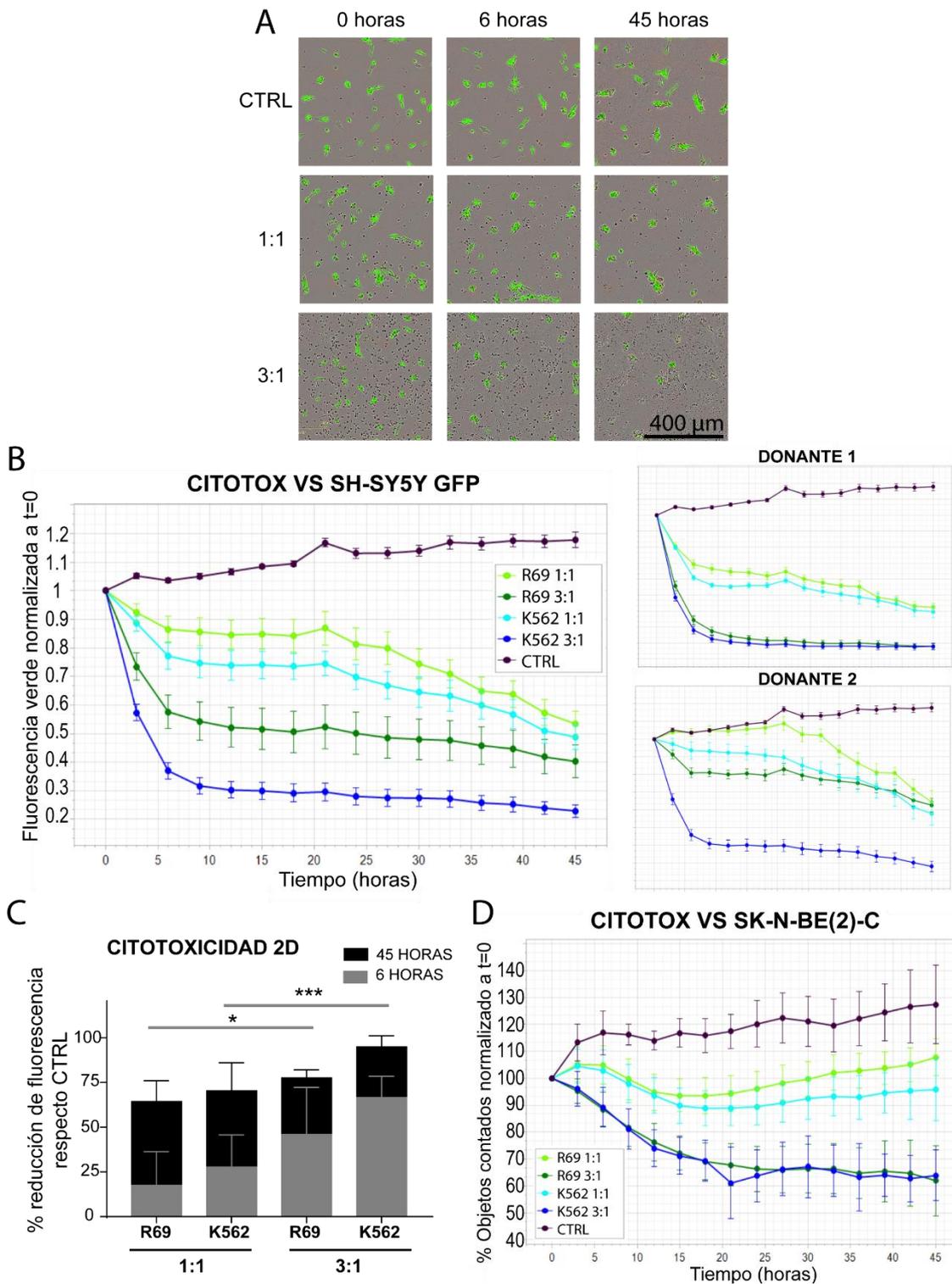


Figura 8. Citotoxicidad de células NK expandidas 14 días contra cultivos 2D. Citotoxicidad de células NK de dos donantes sanos expandidas 14 días con los protocolos R69 y K562, enfrentadas a cultivos 2D de líneas celulares de NB a ratio efectora:diana 1:1 y 3:1. Los controles son cultivos de líneas de NB sin células NK. **A, B, C.** Citotoxicidad de células NK sobre la línea celular SH-SY5Y GFP. **A.** Imágenes representativas de campo claro y fluorescencia a 524 nm de la proteína GFP, obtenidas con el sistema IncuCyte al inicio del co-cultivo, a las 6 y a las 45 horas. En verde se observan células SH-SY5Y GFP, mientras las células NK se observan como puntos negros. **B.** Gráficas representando ratio de fluorescencia verde a 524 nm integrada por pocillo

normalizada respecto al mismo pocillo a tiempo cero, en función del tiempo en horas. **Derecha**, media de datos obtenidos de dos donantes. **Izquierda**, datos obtenidos por donante. **C.** Gráfica del porcentaje de reducción de fluorescencia a 524 nm correspondiente a la proteína GFP en los co-cultivos respecto al control a ese mismo tiempo, indicándose la ratio y protocolo de expansión de las células NK, en gris a las 6 horas de co-cultivo y en negro a las 45 horas. Se aplicó un test estadístico ANOVA de dos factores, encontrándose diferencias significativas donde * $p < 0.05$ y *** $p < 0.005$, indicando el color de la línea el tiempo de la leyenda al que corresponde. **D.** Citotoxicidad de células NK sobre la línea celular SK-N-BE(2)-C, representando el porcentaje de objetos contados normalizado al mismo pocillo a tiempo cero, en función del tiempo. **B, D.** Leyenda: verde claro, células NK expandidas con protocolo R69 a ratio efectora:diana 1:1. Azul claro, células NK expandidas con protocolo K562 a ratio efectora:diana 1:1. Verde oscuro, células NK expandidas con protocolo R69 a ratio efectora:diana 3:1. Azul oscuro, células NK expandidas con protocolo K562 a ratio efectora:diana 3:1. Morado, control. En las gráficas se muestra la media y la desviación estándar de las medidas (2 donantes x 3 réplicas).

4.5. Citotoxicidad de células NK expandidas frente a cultivos de la línea celular SH-SY5Y en 3D.

Se estudió la citotoxicidad de las células NK expandidas contra cultivos 3D, con una mayor complejidad estructural respecto al cultivo 2D, con el objetivo de estudiar la influencia de esta en la capacidad efectora de las células NK. Se utilizaron como células diana esferoides de 20.000 células en origen tras dos días de su formación, de la línea celular SH-SY5Y GFP añadiendo Anexina V RED o 7-AAD como marcadores de apoptosis y necrosis respectivamente, ambos observados como fluorescencia roja a 635nm. Las células NK ejercen su citotoxicidad principalmente mediante el desencadenamiento de la apoptosis, ya sea mediante ligandos de muerte o exocitosis de gránulos con citotóxicos³⁷. Lo que se esperaba observar era un aumento de fluorescencia roja en las condiciones teñidas con Anexina V, mientras que en los teñidos con 7-AAD se observaría marcaje a tiempos más largos, por la degeneración de las células apoptóticas, las cuales comienzan a mostrar características de necrosis. Lo observado en el experimento fue un rápido incremento del marcaje a tiempos cortos tanto de Anexina V como de 7-AAD, indicando un incremento de ambos procesos de muerte celular, sin poder determinar si se trataban de las células NK o las tumorales (Figura 9A). De forma complementaria, la fluorescencia verde, señal específica de la viabilidad de las células tumorales, disminuyó a lo largo del tiempo, indicando por lo tanto la muerte de células SH-SY5Y GFP. En varios de los esferoides se observó la desaparición de fluorescencia verde en el centro, anteriormente definida como formación de núcleo necrótico (resultados y discusión 4.2). El núcleo necrótico mostró además no ser estático, observándose su desaparición con el progreso de la citotoxicidad (Figura 9A). Durante este proceso se obtuvo también información relevante para la caracterización del núcleo necrótico. En algunos casos durante el seguimiento de la citotoxicidad, se produjo la expulsión de restos celulares del interior del esferoide. Estas masas celulares no presentaron fluorescencia verde, indicativa de la viabilidad de las células SH-SY5Y GFP, y sí marcaje para 7-AAD, marcador de necrosis, pero no de Anexina V, marcador de

apoptosis. Esto respaldaría la presencia de células necróticas en este modelo, las cuales estarían presentes en la zona interna del esferoide (Figura 9A).

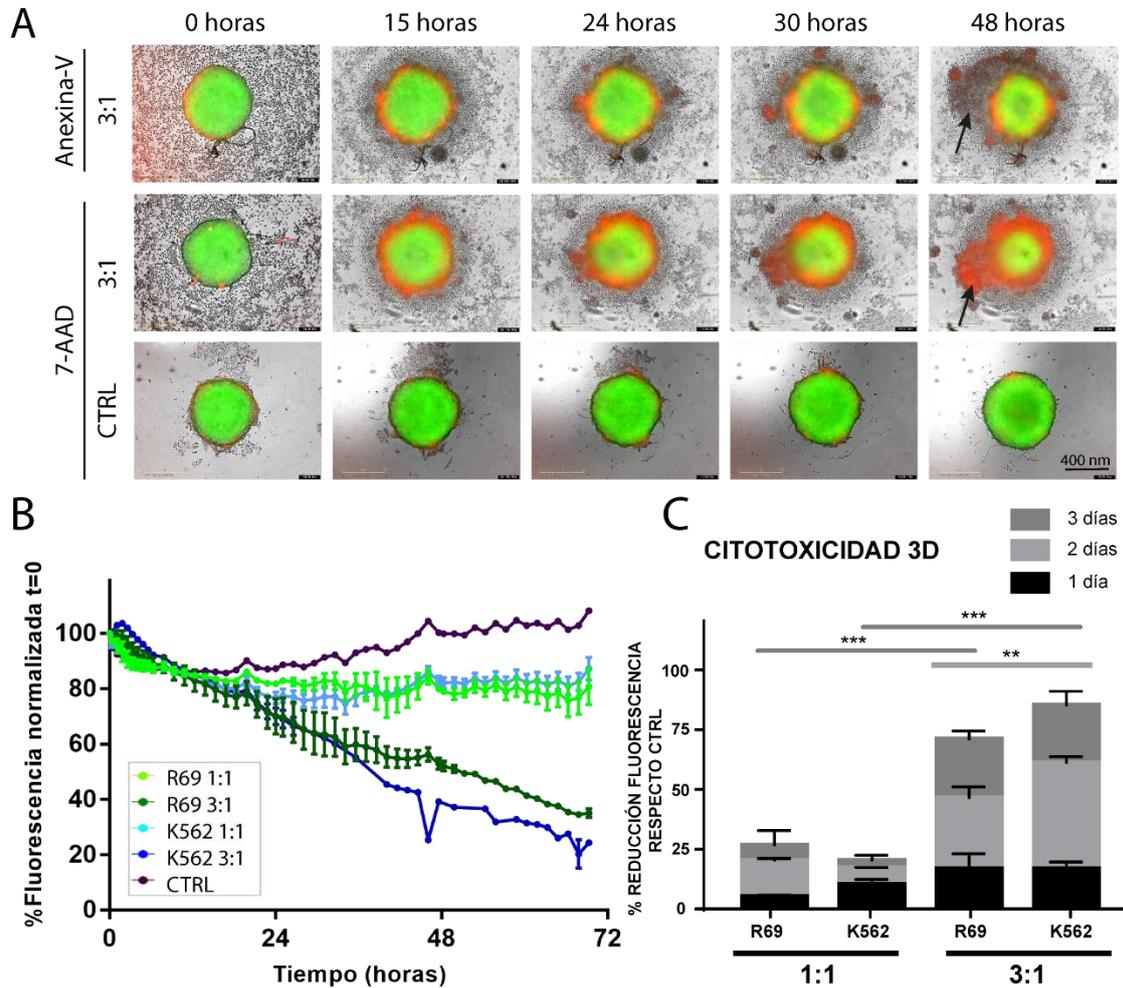


Figura 9. Citotoxicidad de células NK expandidas 14 días contra cultivos 3D. Citotoxicidad de células NK de un donante sano expandidas 14 días con protocolo R69 y K562, enfrentadas a ratios efectora:diana 1:1 y 3:1 a esferoides de 20.000 células SH-SY5Y GFP tras 2 días de su formación. Los controles son esferoides sin células NK. **A.** Imágenes obtenidas con el sistema IncuCyte al inicio del co-cultivo, 15, 24, 30 y 48 horas, indicándose la ratio efectora:diana o el control sin células NK. En verde, fluorescencia de la proteína GFP a 524 nm de las células tumorales, en rojo la fluorescencia a 635 nm del marcador de muerte, en la línea superior Anexina-V, marcador de apoptosis y 7-AAD en las inferiores, marcador de necrosis. Se indican con flechas la masa celular expulsada del interior del esferoide. **B.** Gráficas representando el porcentaje de intensidad de fluorescencia verde a 524 nm integrada del mayor objeto definido por campo claro respecto el mismo punto a tiempo cero en función del tiempo en horas. Verde claro, células NK expandidas con protocolo R69 a ratio efectora:diana 1:1. Leyenda: verde claro, células NK expandidas con protocolo R69 a ratio efectora:diana 1:1. Azul claro, células NK expandidas con protocolo K562 a ratio efectora:diana 1:1. Verde oscuro, células NK expandidas con protocolo R69 a ratio efectora:diana 3:1. Azul oscuro, células NK expandidas con protocolo K562 a ratio efectora:diana 3:1. Morado, control. **C.** Gráfica del porcentaje de reducción de fluorescencia verde de la proteína GFP en los co-cultivos respecto al control, indicándose ratio y protocolo de expansión de las células NK en el eje de las abscisas. En negro tras un día de co-cultivo, en gris claro a los 2 días y en gris oscuro a los 3 días. Se aplicó un test estadístico ANOVA de dos

factores, encontrándose diferencias significativas donde ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.005$, indicando el color de la línea el tiempo de la leyenda al que corresponde. En las gráficas se muestra la media y la desviación estándar de las medidas (1 donante x 2 réplicas).

Representando el porcentaje de intensidad de fluorescencia a 524 nm (verde) integrada del mayor objeto definido por campo claro respecto al tiempo inicial, interpretado como viabilidad, contra el tiempo (Figura 9B), se observó una disminución para todas las condiciones. Hasta las 20 horas, la cinética de la citotoxicidad fue similar para ambas ratios y desde ese punto, para la ratio efectora:diana 1:1 se mantuvo constante mostrándose una tendencia de crecimiento en los últimos tiempos medidos. Para la ratio 3:1 la citotoxicidad se observó constante durante el periodo estudiado. Entre los protocolos de expansión, los resultados obtenidos fueron similares. El porcentaje de reducción de fluorescencia respecto al control a día 3 de co-cultivo fue entorno a un 25% para la ratio 1:1 y entorno al 90% para la ratio efectora:diana 3:1 (Figura 9C). La citotoxicidad observada a los 2 días de co-cultivo entre las células NK expandidas con el protocolo K562 fue mayor a la observada con el protocolo R69, siendo esta diferencia estadísticamente significativa, aunque pequeña por lo que su relevancia biológica no está clara.

Comparando los resultados de la citotoxicidad entre los modelos de cultivo 2D y 3D de las células diana, se observan a un tiempo de co-cultivo de dos días, porcentajes de reducción de fluorescencia verde menores en el modelo 3D respecto al modelo 2D para todas las condiciones testadas (ratios y protocolos de expansión). La diferencia fue más marcada en la ratio 1:1, ya que para el modelo de cultivo convencional se obtuvo una reducción de 64 y 68% de la fluorescencia, mientras que en esferoides solo se alcanzó el 24 y 22% con los protocolos de expansión R69 y K562 respectivamente. La reducción de la citotoxicidad al utilizar modelos de cultivo tridimensionales concuerda con lo observado en otros estudios realizados sobre la citotoxicidad con células NK³⁷, así como en estudios con drogas⁷⁰. La barrera a la difusión presente por la estructura del cultivo en 3D, así como la presencia de otras características del TME, resulta en la reducción de la eficacia de los tratamientos testados. Por ello, el trabajo sobre modelos que muestren un nivel de complejidad más similar al presente *in vivo*, como es el modelo 3D, permitirá obtener resultados con mayor reproducibilidad *in vivo*.

La importancia de la ratio efector:diana en la eficacia de la citotoxicidad de las células NK, observada frente a ambos modelos cultivo de las células diana (2D y 3D), muestra la importancia del trabajo con métodos de expansión eficientes, con los que se pueda obtener cantidades de células NK suficientes para enfrentarse a los tumores *in vivo*, pudiendo traducirse en tratamientos viables y eficientes en la práctica clínica.

4.6. Infiltración en esferoides de células NK expandidas.

La infiltración de las células NK en los tumores sólidos infantiles se correlaciona con un pronóstico favorable⁴⁰, por lo que este proceso se estudió en el modelo desarrollado. Con el objetivo de poder seguir a las células NK expandidas con ambos protocolos descritos (materiales y métodos 3.5), se tiñeron con la sonda fluorescente roja eFluor 670 (materiales y métodos 3.9). Se enfrentaron a esferoides de 20.000 células SH-SY5Y GFP de 12 días, por lo cual presentan núcleo necrótico (Figura 6). Se obtuvieron imágenes por microscopía óptica de fluorescencia, por lo que no se pudo determinar el plano en el que se posicionaban las células NK, pero sí su distribución. Para la realización de este experimento se colaboró con el grupo de investigación del microentorno tisular (TME) del I3A, siendo el doctorando Héctor Castro quién realizó los esferoides y obtuvo las imágenes de microscopía. Se observó la formación de agregados de células NK en la periferia de los esferoides, organizándose generalmente en una agrupación principal, varias de menor tamaño y pequeños puntos que podrían tratarse de células individuales (Figura 10). A las 24 horas, la fluorescencia verde de la proteína GFP se observó disminuida en las áreas del esferoide donde se situaron las agrupaciones de células NK y en su entorno, mostrando que la citotoxicidad de las células NK se produce por el contacto directo con la célula diana. A día 3 de co-cultivo, la intensidad de fluorescencia verde disminuyó, pudiendo ser debido tanto a la disminución de células viables como a la menor compactación y densidad del esferoide, mostrando la ruptura de la estructura tridimensional y aumentando notablemente el área del esferoide. Las células NK expandidas con el protocolo K562 mostraron un menor número de agrupaciones formándose una agrupación predominante. A día 3, las células se presentaban de forma menos compacta y en zonas más centrales del esferoide. En cuanto a la infiltración, se observó fluorescencia roja en diferentes zonas, observándose menor intensidad de fluorescencia roja, lo que podría indicar la localización en zonas interiores de la masa celular, produciéndose el mismo efecto de difracción de la luz, descrito en el apartado 4.2. de resultados y discusión. Pese a que la fluorescencia roja se observó en toda el área del esferoide, no se pudo concluir si se había producido infiltración de células NK debido a las limitaciones de la técnica. En el trabajo de Lanuza *et al.* 2018 se observó la infiltración de células NK expandidas en esferoides de líneas de cáncer colorrectal⁸². En este estudio, se testaron los ratios efectora:diana 9:1, 6:1 y 3:1, utilizando como diana esferoides de 1.000 células en origen y se mostró infiltración para la ratio 3:1, sin apreciarse la formación de agrupaciones observadas durante este trabajo. El mayor número de células requeridas para la ratio 3:1 entre el trabajo en cáncer colorrectal y este trabajo, 3.000 células NK en contraposición a las 60.000 células utilizadas en este caso, debido al tamaño del esferoide diana, pudieron ser el motivo de la formación de agrupaciones celulares. La formación de estas agrupaciones se ha definido durante la activación de las células NK, como un mecanismo para asegurar la disponibilidad de IL-2 mediante la transpresentación⁸³, por lo cual podría estar dándose para contrarrestar la menor disposición de interleuquinas.

La infiltración de las células inmunes en el tumor es uno de los principales problemas por los que hasta ahora la inmunoterapia celular adoptiva en tumores sólidos no ha obtenido resultados tan buenos como en neoplasias hematológicas. Además, los tumores sólidos pediátricos como el NB presentan una menor carga mutacional y menor infiltración de células inmunes. Voeller *et al.*⁸⁴, estudiaron como la combinación de radiación con inmunoterapia aumentaba la infiltración de células inmunes en NB, siendo esta una de las nuevas líneas de investigación actuales para potenciar la infiltración y beneficiarse del potencial antitumoral del sistema inmune.

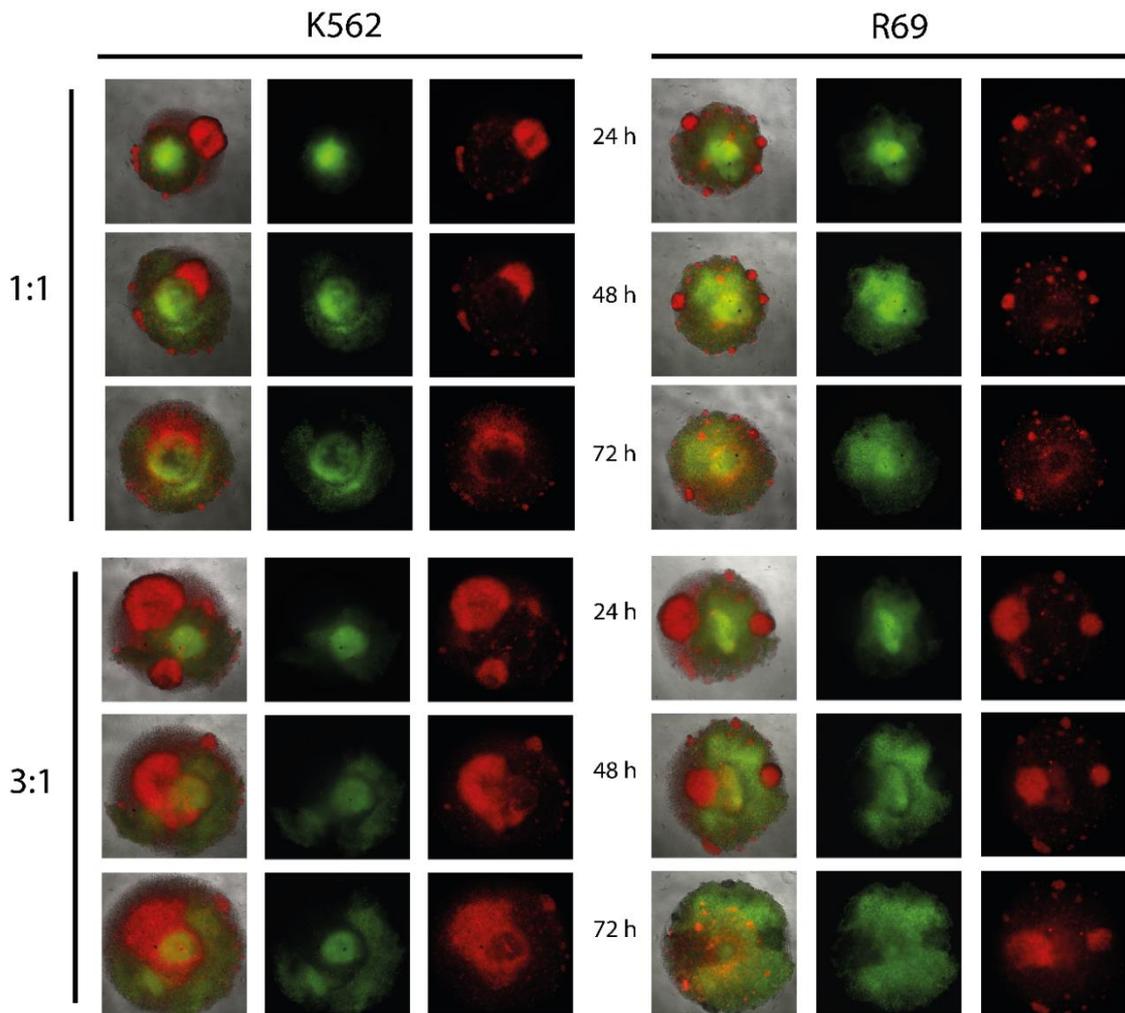


Figura 10. Infiltración de células NK expandidas 14 días en esferoides de la línea celular SH-SY5Y GFP. El número de células iniciales de los esferoides fue de 20.000 y se realizaron los co-cultivos tras 12 días de su formación, considerándose la presencia de núcleo necrótico. Se realizaron imágenes por microscopía óptica de fluorescencia, mostrándose en verde, la fluorescencia de la proteína GFP de las células tumorales y en rojo las células NK teñidas con eFluor 670, presentando la superposición de los canales y el campo claro, así como los canales por separado. En la parte superior, se indica el protocolo de expansión de las células NK, K562 para las células NK expandidas con el protocolo K562 y R69 para las células NK expandidas con el protocolo R69. En la parte derecha se indican los ratios NK:SH-SY5Y utilizados, 1:1 y 3:1. En la parte central se indican las horas desde el inicio del co-cultivo (1 donante x 3 réplicas).

4.7. Análisis de la proteína PD1 en las células NK.

Actualmente, la relevancia del punto de control inmunitario PD1 en las células NK comienza a ser estudiada, tras observarse su implicación en linfocitos T y su gran potencial en inmunoterapia. Con el fin de estudiar su influencia en la eliminación de células de NB, se estudió la expresión, en distintas condiciones, de PD1 en células NK de donantes sanos mediante citometría de flujo (materiales y métodos 3.3). Se observó que tanto en células NK recién aisladas como en células NK incubadas overnight con IL-15, el porcentaje de células que expresaban PD1 era entorno al 2%. Tras la incubación overnight con células K562 e IL15, la población de células NK que expresaban PD1 se triplicaba, alcanzado un 7% (Figura 11).

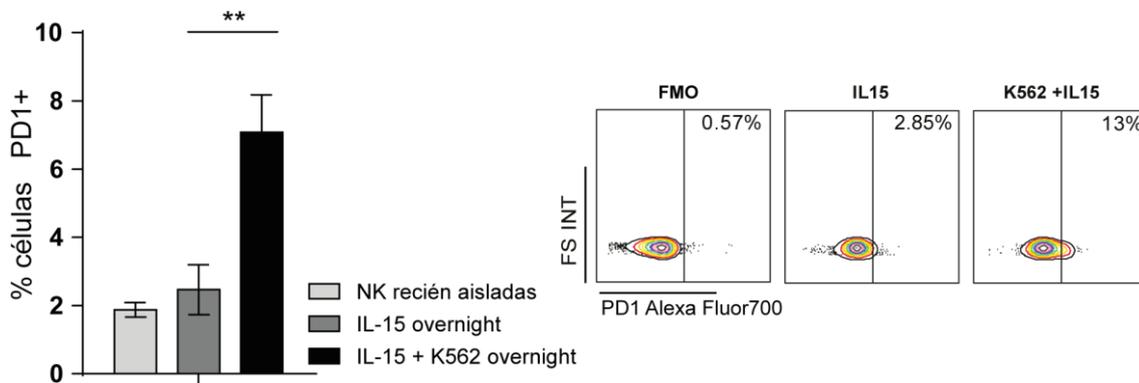


Figura 11. Expresión de la proteína PD1 en células NK de donantes sanos. Se analizó la expresión de la proteína PD1 por citometría de flujo sobre la población CD3- CD56+, tanto en el momento de la obtención de los PBMCs, como tras el cultivo overnight con IL-15 o IL-15 junto con células K562 en proporción 2:1 PBMC:K562 (materiales y métodos 3.6). **Izquierda**, gráfica del porcentaje de células CD3- CD56+ que presentaron marcaje para la proteína PD1. En gris claro, células NK recién aisladas, en gris oscuro, células NK incubadas overnight con IL-15 y en negro células NK incubadas overnight con IL15 y células K562. Se muestra la media de las medidas y la desviación estándar (3 donantes x 3 réplicas). El test t-student mostró significancia estadística, indicada como ** $p < 0.01$. **Derecha**, gráficos de densidades representativos de los datos obtenidos, mostrando FMO y marcaje para células NK expandidas overnight con IL-15 y con células K562 e IL-15. Se indica el porcentaje de células NK que expresan PD1 sobre el gráfico.

La vía PD1/PDL1 inhibe la respuesta antitumoral de los linfocitos T, pero su implicación esta menos caracterizada en el caso de las células NK. Pese a esto, son varios los estudios que muestran un nivel de PD1 incrementado en pacientes con cáncer, desde un $\approx 3\%$ de donantes sanos, hasta un 10% en pacientes con diversos cánceres^{48,49}. Los resultados obtenidos con la incubación de las células NK con células tumorales, muestran un aumento de expresión similar al observado en los pacientes con cáncer, indicando que el contacto entre la célula NK y la célula tumoral podría ser la causa del aumento de la exposición de PD1. La expresión de PD1 en la membrana se asocia a un fenotipo de agotamiento de las células NK⁷⁹, por lo que podría asociarse a la actividad citotóxica continuada de las células NK contra el tumor. El aumento de expresión de la proteína PD1 en las células NK observado tras el contacto con células tumorales señala la

relevancia de la vía PD1/PDL1 en la regulación de la actividad de las células NK y por lo tanto en los posibles tratamientos de inmunoterapia con estas células, siendo objeto de estudio actualmente^{42,85}.

El aumento de la proteína PD1 se vio en las células NK tras la incubación con células tumorales dianas de su actividad citotóxica. Para estudiar su relación con el mecanismo de exocitosis de gránulos citotóxicos se realizó un ensayo de degranulación y se estudió por citometría de flujo la expresión en membrana de PD1 y CD107a, marcador de degranulación en estas células⁵⁴. Para ello se co-cultivaron a tiempos cortos, 5 horas, PBMCs con células diana a ratio 1:2 PBMC:diana, favoreciendo el contacto entre las células NK y las células diana. Como diana se utilizaron las líneas celulares K562 y SH-SY5Y en experimentos independientes. Se observó que las células NK que habían degranulado, por lo que presentaban CD107a en la membrana, presentaban en mayor porcentaje PD1 en la membrana respecto al control sin degranular (Figura 12A); sugiriendo una relación entre la degranulación y la exposición de PD1 en la membrana. Así mismo, se analizó la localización intracelular tanto de PD1 como de CD107a en células NK recién aisladas por inmunofluorescencia. Se observó un 64%±14 de colocalización de PD1 y CD107a indicando la presencia de PD1 intracelular en los gránulos de células NK (Figura 12B).

Los resultados obtenidos indican la presencia de PD1 en los gránulos efectores, así como la movilización conjunta de CD107a y PD1 a la membrana celular tras exponer a tiempos cortos las células NK a dianas; relacionando la exocitosis granular de las células NK con la exposición del punto de control inmunitario PD1.

Esta rápida exposición de PD1 observada en el experimento de degranulación, explicaría también los resultados observados en los experimentos de citotoxicidad de las células NK expandidas. En el experimento de citotoxicidad se observó que tras seis horas de contacto a ratio efectora:diana 1:1, la citotoxicidad se veía temporalmente inhibida, reanudándose a partir de las 20 horas. Esto podría deberse al aumento de PD1 en membrana por una intensa exocitosis inicial de los gránulos citosólicos preformados de las células NK tras el contacto con células tumorales, recuperándose posteriormente, posiblemente debido al proceso de reciclaje de CD107a, reintroduciéndose junto con PD1 para la formación de nuevos gránulos. En la citotoxicidad observada en la ratio 3:1, en la que el número de dianas por célula NK es menor, no se observó esta inhibición temporal de la citotoxicidad de las células NK, pudiendo deberse a que no se alcanzó el fenotipo de agotamiento.

Se han realizado diversas aproximaciones del estudio de la implicación de PD1 en el agotamiento de las células NK, pero como concluye la extensa revisión de Judge *et al.* 2020, el estudio de cómo y cuándo se produce la disfunción de las células NK requiere de más investigación⁷⁹. Estos experimentos proponen el contacto con células tumorales como estímulo que desencadenaría la exposición de PD1 en membrana y la exocitosis granular de las células NK como el proceso por el que se da esta exposición.

La proteína CD107a es un marcador de exosomas, por lo que no permite delimitar la localización de PD1 a los gránulos citotóxicos, pudiendo presentarse en otro tipo de

vesículas. Para determinar la presencia de PD1 en los gránulos citotóxicos, pudiendo relacionar directamente el aumento de PD1 en membrana con la citotoxicidad de las células NK, se plantea realizar en trabajos futuros la colocalización entra las proteínas PD1 y granzima B, ya que esta última sí que presenta exclusivamente de estos gránulos.

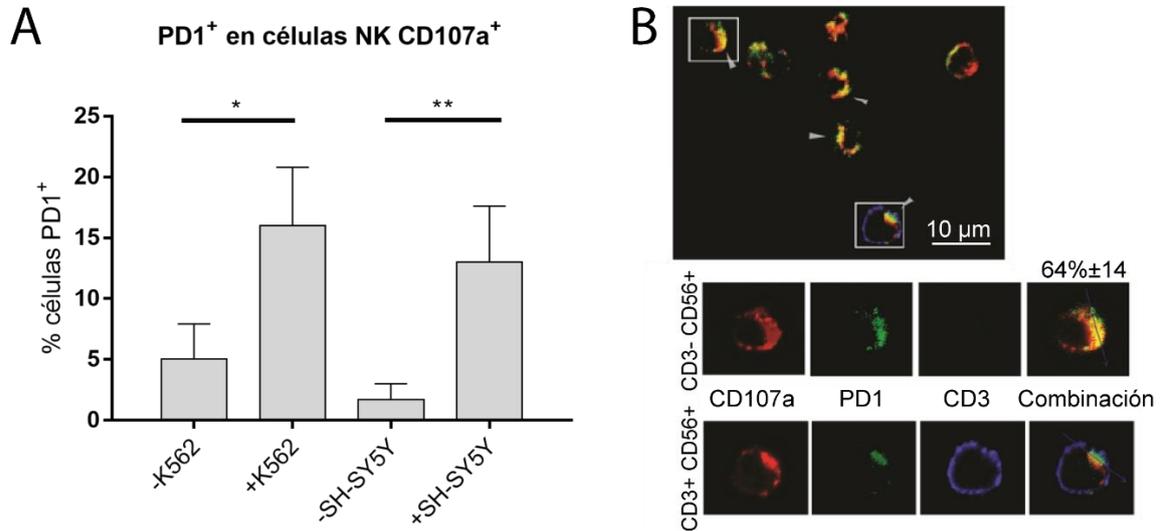


Figura 12. Estudio de la colocalización de PD1 con CD107a. **A.** Gráfica representando el porcentaje de células CD3⁻ CD56⁺ (NK) PD1⁺ que expresan CD107a tras un ensayo de degranulación (materiales y métodos 3.8) analizado por citometría de flujo (materiales y métodos 3.3). En el eje de las abscisas se representa las condiciones de incubación, con o sin células diana K562 o SH-SY5Y. Se muestra la media de las medidas y la desviación estándar (4 donantes x 1 réplica). El test t-student mostró significancia estadística, indicada como *** p<0.005. **B.** Imágenes obtenidas por microscopía confocal con el Microscopio Confocal Zeiss LSM 880 con Airyscan de las proteínas CD107a, PD1 y CD3 marcadas como se describe en materiales y métodos (apartado 3.10) sobre una población de células CD56⁺ enriquecidas por MACS (materiales y métodos 3.4.2). Arriba, campo completo con varias células, señalando con flechas los puntos donde se observó amplia colocalización (3 donantes x 1 réplica). Abajo, se muestran imágenes de una célula CD3⁻ CD56⁺ (NK) y una célula CD3⁺ CD56⁺ (NKT). Se muestra la fluorescencia obtenida a cada longitud de onda, así como la combinación de las tres señales. En rojo, CD107a, en verde PD1 y en azul CD3, marcaje que permitió la exclusión de las células NKT. Sobre la figura se indica el coeficiente de Manders indicando el porcentaje de colocalización obtenido de PD1 sobre CD107a y su desviación estándar (n=33).

4.8. Bloqueo de la vía PD1/PD-L1 en la citotoxicidad de células NK.

Estos resultados anteriores, indicaron la presencia de la proteína PD1 en las células NK, por lo que, como paso siguiente, se estudió el efecto de la proteína PD1 en la citotoxicidad de las células NK. Para ello se realizaron ensayos de citotoxicidad de células NK con un nivel de expresión de PD1 basal (células NK incubadas overnight con IL-15) y células NK con un nivel de PD1 aumentado, similar al observado en pacientes con cáncer (células NK incubadas overnight con IL-15 y células K562). Se trabajó con células CD56⁺ purificadas por MACS procedentes de tres donantes sanos y como diana se utilizó un cultivo convencional 2D de células SH-SY5Y GFP a ratios efectora:diana 1:1 y 6:1. La línea celular SH-SY5Y expresa en membrana el ligando de PD1, PD-L1, el cual también

ha sido observado en muestras de NB de pacientes⁸⁶, por lo cual se consideró una diana adecuada en este experimento. Se realizaron duplicados en los que se añadió el anticuerpo monoclonal utilizado en clínica Pembrolizumab (anti-PD1). Las células preincubadas con IL-15 mostraron una mayor citotoxicidad que aquellas que lo hicieron con IL-15 y células K562, siendo la diferencia estadísticamente significativa para ambas ratios estudiadas (Figura 13). Las células NK preincubadas con IL-15 y células K562 no mostraron citotoxicidad a ratio efectora:diana 1:1 donde incluso se observó crecimiento respecto al control (mostrado como cero). Para las mismas condiciones de preincubación, la ratio 6:1 mostró una citotoxicidad del 12%, que llegó al 67% en el caso de las células incubadas únicamente con IL-15. La preincubación con células tumorales, la cual incrementó la exposición de PD1, mostró la reducción de la citotoxicidad de las células NK, sugiriendo un efecto inhibitorio sobre la citotoxicidad de las células NK de esta proteína, pese a poder haber más mecanismos implicados.

El efecto positivo de la exposición a células tumorales observado durante la expansión de células NK se explicaría por la combinación de estímulos con la IL-2, con potentes efectos activadores en las células inmunes. Actualmente, se están comenzando a estudiar otros posibles fenotipos funcionales de las células NK para su uso en inmunoterapia, como las células NK de memoria inducidas por citoquinas, que presentan una actividad citotóxica aumentada y un mayor nivel de producción de INF tras la incubación durante 16 horas con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18³⁸.

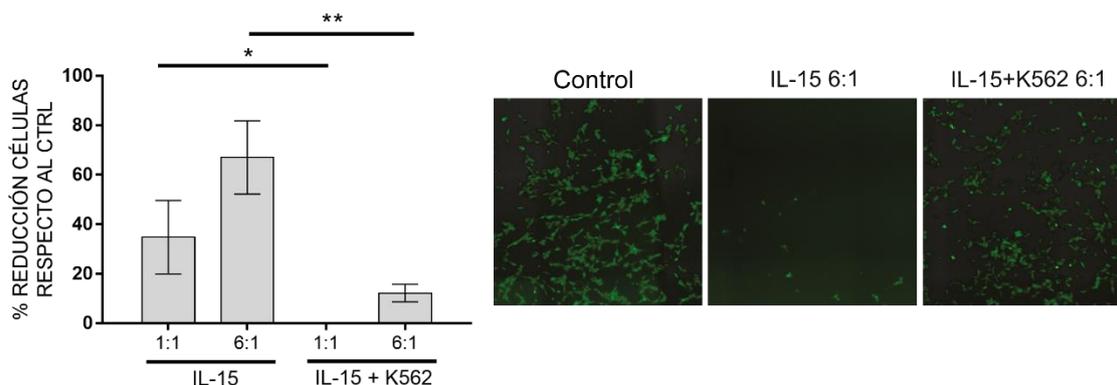


Figura 13. Citotoxicidad de células NK preincubadas con IL-15 o IL-15 y células K562 frente a células SH-SY5Y GFP. Se estudió la citotoxicidad de células NK preincubadas overnight con IL-15 o IL-15 y células K562 contra las células SH-SY5Y en cultivo 2D a ratios efectora:diana 1:1 y 6:1 (materiales y métodos 3.7). **Izquierda**, gráfica representando el porcentaje de reducción del número de células por pocillo respecto al control, a las 24 horas de co-cultivo. En el eje de las abscisas se indica las condiciones de preincubación overnight de las células NK, IL-15 e IL-15 junto células K562, así como las ratios células NK:células diana, 1:1 o 6:1. Se aplicó un test estadístico ANOVA de dos factores, encontrándose diferencias significativas entre las condiciones de preincubación, indicada como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$ (3 donantes x 3 réplicas). **Derecha**, imágenes representativas obtenidas por microscopía óptica de fluorescencia de las células SH-SY5Y que expresan GFP en verde. Sobre las imágenes se indica, control, para el cultivo de células SH-SY5Y GFP sin células NK y las condiciones de preincubación de las células NK y ratio a las que se enfrentaron a las células SH-SY5Y GFP en cada caso.

Para corroborar que el aumento de la expresión de PD1 detectado tras la preincubación con células tumorales afecta a la actividad citotóxica de estas células NK, realizó el ensayo de citotoxicidad en presencia de Pembrolizumab, el anticuerpo usado en clínica para bloquear la vía PD1/PDL1 (Figura 14). La adición de Pembrolizumab incrementó la citotoxicidad observada respecto a la condición sin Pembrolizumab en las células NK preincubadas con K562, aunque no llega a ser estadísticamente significativo. Es decir, aquellas células con un nivel de PD1 en membrana superior al basal, aumentaron su actividad citotóxica al bloquear PD1. Las medidas obtenidas tuvieron gran variabilidad, mostrando la variabilidad entre donantes, así como la posible implicación de otros mecanismos.

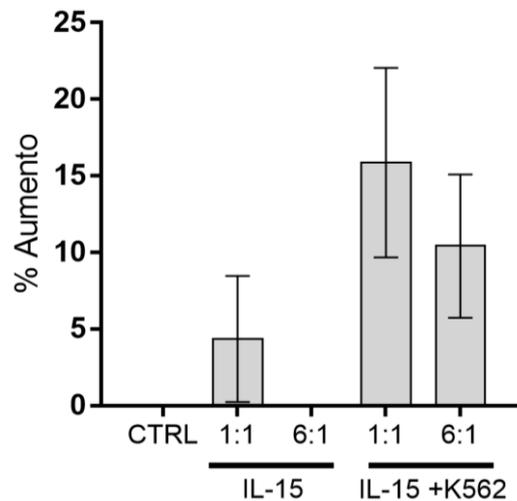


Figura 14. Citotoxicidad de células NK sobre células SH-SY5Y en presencia de Pembrolizumab. Se estudió la citotoxicidad de células NK preincubadas overnight con IL-15 o IL-15 más células K562 contra células SH-SY5Y en cultivo 2D a ratios efectora:diana 1:1 y 6:1 durante 24 horas. Las barras representan el incremento de citotoxicidad (porcentaje de células respecto al control sin células NK) de la condición con Pembrolizumab respecto a la condición sin Pembrolizumab. El monocultivo de células SH-SY5Y como control, representado como CTRL, indica que la presencia de Pembrolizumab no influye en la viabilidad del cultivo. Se aplicó un test estadístico ANOVA de dos factores, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos. En la gráfica se muestra la media de las medidas y su desviación estándar (3 donantes x 3 réplicas).

Los resultados señalan la relevancia de la vía de PD1/PDL1 en el contexto de la actividad antitumoral de las células NK, mostrándose como un parámetro a tener en cuenta en el desarrollo de tratamientos eficaces con células NK contra el NB, pudiéndose estudiarse la combinación de la terapia adoptiva de células NK alogénicas con la aplicación de anti-PD1. El anticuerpo Pembrolizumab se utiliza actualmente en la clínica contra diferentes cánceres en adultos⁴¹ y ha sido probado en diversos estudios sobre tumores sólidos infantiles, como el NB, mostrando poca actividad antitumoral en su aplicación como monoterapia⁸⁷.

5. CONCLUSIONES

La revisión bibliográfica realizada permite concluir el potencial de la terapia adoptiva con células NK contra el NB infantil de alto riesgo, así como la necesidad de potenciar la capacidad de estas células inmunes para superar las limitaciones presentadas por el microentorno tumoral.

Tras los experimentos realizados en este trabajo, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Esferoides de la línea celular SH-SY5Y de gran tamaño, en torno o 800 μm de diámetro, desarrollan núcleo necrótico, obteniéndose un modelo adecuado para el estudio de la influencia de la necrosis tumoral en el NB.
2. El protocolo de expansión de células NK con las interleuquinas IL-2 e IL-15 y células K562 fue eficaz en la expansión y activación de células NK.
3. Las células NK expandidas con ambos protocolos estudiados (IL-2 e IL-15 junto con células R69 o K562) muestran altos niveles de citotoxicidad contra cultivos 2D de las líneas celulares de NB humano SH-SY5Y y SK-N-BE(2)-C.
4. Las células NK expandidas mediante el protocolo K562 mostró un mayor nivel de citotoxicidad respecto a las células NK expandidas con el protocolo R69.
5. Los cultivos 3D de la línea celular SH-SY5Y mostraron mayor resistencia a la actividad citotóxica de las células NK respecto a los cultivos en 2D.
6. Las células NK aumentan la expresión de PD1 tras la incubación overnight con la línea celular tumoral K562 hasta niveles análogos a los observados en pacientes con cáncer.
7. El aumento de la expresión extracelular de PD1 en las células NK está asociado al mecanismo de exocitosis granular de las células NK.
8. El bloqueo de PD1 con Pembrolizumab potencia la citotoxicidad contra la línea celular de NB SH-SY5Y de aquellas células NK con un nivel de PD1 por encima del basal.

CONCLUSIONS

The bibliographic review carried out allows us to conclude the potential of adoptive NK cells therapy against childhood high-risk NB, as well as the need to enhance the capacity of these immune cells to overcome the limitations presented by the tumour microenvironment.

After the experiments carried out in this work, the conclusions that can be made with the obtained information are the following:

1. SH-SY5Y cell line spheroids of large size, around 800 μm in diameter, develop a necrotic nucleus, obtaining a suitable model to studying the influence of tumour necrosis on NB.
2. NK cell expansion protocol with interleukins 2, 15 and K562 cells, showed the expansion and activation of NK cells.
3. Expanded NK cells with both studied protocols showed high cytotoxicity levels against 2D cultures of SH-SY5Y and SK-N-BE (2)-C human NB derived cell lines.
4. Expanded NK cells using K562 protocol showed a higher level of cytotoxicity compared to expanded NK cells with R69 protocol.
5. SH-SY5Y cell line 3D cultures showed greater resistance to NK cell cytotoxic activity compared to 2D cultures.
6. NK cells increase PD1 expression after overnight incubation with K562 tumour cell line to analogous levels to cancer patients.
7. Increased extracellular PD1 expression in NK cells is associated with granular exocytosis NK cell effector mechanism.
8. PD1 blocking with Pembrolizumab enhances NK cells cytotoxicity of PD1-expression-above-baseline-NK cells against SH-SY5Y NB derived cell line.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Nakagawara, A. *et al.* Neuroblastoma. *Japanese Journal of Clinical Oncology* vol. 48 214–241 (2018).
2. Newman, E. A. *et al.* Update on neuroblastoma. *Journal of Pediatric Surgery* vol. 54 383–389 (2019).
3. Fundación Neuroblastoma - Cáncer infantil. <https://www.fneuroblastoma.org/>.
4. Berlanga, P., Cañete, A. & Castel, V. Advances in emerging drugs for the treatment of neuroblastoma. *Expert Opinion on Emerging Drugs* vol. 22 63–75 (2017).
5. Huang, M. & Weiss, W. A. Neuroblastoma and MYCN. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **3**, (2013).
6. Tumores de la cresta neural. <https://www.pediatriaintegral.es/publicacion-2016-09/tumores-de-la-cresta-neural-2016/>.
7. Rahal, Z., Abdulhai, F., Kadara, H. & Saab, R. *Genomics of adult and pediatric solid tumors*. *Am J Cancer Res* vol. 8 www.ajcr.us/ISSN:2156-6976/ajcr0079990 (2018).
8. Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) Classification System: An INRG Task Force Report. doi:10.1200/JCO.2008.16.6785.
9. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. & Cohn, S. L. Neuroblastoma. *The Lancet* **369**, 2106–2120 (2007).
10. Mlakar, V. *et al.* 11q deletion in neuroblastoma: A review of biological and clinical implications. *Molecular Cancer* vol. 16 (2017).
11. Pesini Martín, C., Pardo Jimeno, J. & Ramírez Labrada, A. Caracterización de un modelo de cultivo celular 3D de neuroblastoma para el estudio de inmunoterapia con células NK. (2019).
12. Cohn, S. L. *et al.* The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: An INRG task force report. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 289–297 (2009).
13. Sims, T. L. *et al.* Neural progenitor cell-mediated delivery of osteoprotegerin limits disease progression in a preclinical model of neuroblastoma bone metastasis. *Journal of Pediatric Surgery* **44**, 204–211 (2009).
14. Rastogi, P. *et al.* Bone Marrow Involvement in Neuroblastoma: A Study of Hematomorphological Features. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion* **31**, 57–60 (2015).
15. Bansal, D. *et al.* Management of Neuroblastoma: ICMR Consensus Document. *Indian Journal of Pediatrics* vol. 84 446–455 (2017).
16. Delfa, S. B., Rubio Aparicio, P. & Martínez Martínez, L. *Neuroblastoma*. vol. 31 (2018).
17. Rubie, H. *et al.* Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **29**, 449–55 (2011).

18. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* vol. 340 1546–1558 (2013).
19. Schleiermacher, G. *et al.* Emergence of new ALK mutations at relapse of neuroblastoma. *Journal of Clinical Oncology* **32**, 2727–2734 (2014).
20. Braekeveldt, N. & Bexell, D. Patient-derived xenografts as preclinical neuroblastoma models. *Cell and Tissue Research* vol. 372 233–243 (2018).
21. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. *The Hallmarks of Cancer Review evolve progressively from normalcy via a series of pre.* *Cell* vol. 100 (2000).
22. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* vol. 144 646–674 (2011).
23. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* vol. 21 309–322 (2012).
24. Borriello, L., Seeger, R. C., Asgharzadeh, S. & DeClerck, Y. A. More than the genes, the tumor microenvironment in neuroblastoma. *Cancer Letters* vol. 380 304–314 (2016).
25. Liberman, J. *et al.* Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PLoS ONE* **7**, (2012).
26. Ma, M., Ye, J. Y., Deng, R., Dee, C. M. & Chan, G. C. F. Mesenchymal stromal cells may enhance metastasis of neuroblastoma via SDF-1/CXCR4 and SDF-1/CXCR7 signaling. *Cancer Letters* **312**, 1–10 (2011).
27. Jögi, A. *et al.* Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: Induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior. *Experimental Cell Research* **295**, 469–487 (2004).
28. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research* **21**, 5047–5056 (2015).
29. Owen, J. A., Punt, J. & Stranford, S. A. *Kuby's Immunology*. (Winslow, Susan, 2013). doi:10.1084/jem.20091739.
30. Ara, T. *et al.* Critical role of STAT3 in IL-6-mediated drug resistance in human neuroblastoma. *Cancer Research* **73**, 3852–3864 (2013).
31. Khan, T. *et al.* Therapeutic Modulation of Akt Activity and Antitumor Efficacy of Interleukin-12 Against Orthotopic Murine Neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute* **98**, (2006).
32. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* **331**, 1565–1570 (2011).
33. Chen, R. L., Reynolds, C. P. & Seeger, R. C. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. *Cancer Immunology Immunotherapy* **48**, 603–612 (2000).
34. Raffaghello, L. *et al.* Multiple defects of the antigen-processing machinery components in human neuroblastoma: Immunotherapeutic implications. *Oncogene* **24**, 4634–4644 (2005).

35. Bonaventura, P. *et al.* Cold tumors: A therapeutic challenge for immunotherapy. *Frontiers in Immunology* vol. 10 168 (2019).
36. Holmes, T. D. *et al.* A Human NK Cell Activation/Inhibition Threshold Allows Small Changes in the Target Cell Surface Phenotype To Dramatically Alter Susceptibility to NK Cells. *The Journal of Immunology* **186**, 1538–1545 (2011).
37. Lanuza, P. Inmunoterapia de células NK para el tratamiento de cáncer colorrectal con mutaciones de resistencia a drogas Memoria presentada por. (2019).
38. Berrien-Elliott, M. M., Wagner, J. A. & Fehniger, T. A. Human Cytokine-Induced Memory-Like Natural Killer Cells. *Journal of Innate Immunity* vol. 7 563–571 (2015).
39. Fang, F., Xiao, W. & Tian, Z. NK cell-based immunotherapy for cancer. *Seminars in Immunology* vol. 31 37–54 (2017).
40. Chiossone, L., Dumas, P. Y., Vienne, M. & Vivier, E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* vol. 18 671–688 (2018).
41. Approved Immune-Checkpoint Inhibitors and Immunotherapies. <https://medipaper.com/us-fda-approved-immune-checkpoint-inhibitors-approved-immunotherapies/#toggle-id-2>.
42. Lanuza, P. M. *et al.* Recalling the Biological Significance of Immune Checkpoints on NK Cells: A Chance to Overcome LAG3, PD1, and CTLA4 Inhibitory Pathways by Adoptive NK Cell Transfer? *Frontiers in Immunology* vol. 10 (2020).
43. Miller, J. S. & Lanier, L. L. Natural Killer Cells in Cancer Immunotherapy. *Annu. Rev. Cancer Biol* **3**, 77–103 (2019).
44. Kimpo, M. S., Oh, B. & Lee, S. The Role of Natural Killer Cells as a Platform for Immunotherapy in Pediatric Cancers. *Current Oncology Reports* vol. 21 (2019).
45. Srpan, K. *et al.* Shedding of CD16 disassembles the NK cell immune synapse and boosts serial engagement of target cells. *Journal of Cell Biology* **217**, 3267–3283 (2018).
46. de Andrade, L. F. *et al.* Antibody-mediated inhibition of MICA and MICB shedding promotes NK cell-driven tumor immunity. *Science* **359**, 1537–1542 (2018).
47. Korde, N. *et al.* A phase II trial of pan-KIR2D blockade with IPH2101 in smoldering multiple myeloma. *Haematologica* vol. 99 e81 (2014).
48. Liu, Y. *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* **36**, 6143–6153 (2017).
49. Concha-Benavente, F. *et al.* PD-L1 mediates dysfunction in activated PD-1⁺ NK cells in head and neck cancer patients. *Cancer Immunology Research* **6**, 1548–1560 (2018).
50. Lotze, M. T. *et al.* In Vivo Administration of Purified Human Interleukin-2 to Patients with Cancer: Development of Interleukin-2 Receptor Positive Cells and Circulating Soluble Interleukin-2 Receptors following Interleukin-2 Administration. *Cancer Research* **47**, (1987).

51. Sanchez-Martínez, D. *et al.* All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreases CTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cell cytotoxicity. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **49**, 42–52 (2014).
52. Sánchez-Martínez, D. *et al.* Activated allogeneic NK cells preferentially kill poor prognosis B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Frontiers in Immunology* **7**, (2016).
53. Croce, M., Corrias, M. V., Rigo, V. & Ferrini, S. New immunotherapeutic strategies for the treatment of neuroblastoma. *Immunotherapy* vol. 7 285–300 (2015).
54. Alter, G., Malenfant, J. M. & Altfeld, M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* **294**, 15–22 (2004).
55. Coley, W. B. *Conservative Treatment based on the Use of Coley's Toxins in Operable Cases of Bone Sarcoma.* (1939).
56. Keyel, M. E. & Reynolds, C. P. Spotlight on dinutuximab in the treatment of high-risk neuroblastoma: Development and place in therapy. *Biologics: Targets and Therapy* vol. 13 1–12 (2019).
57. Tarek, N. *et al.* Unlicensed NK cells target neuroblastoma following anti-GD2 antibody treatment. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 3260–3270 (2012).
58. Erbe, A. K. *et al.* Neuroblastoma Patients' KIR and KIR-ligand Genotypes Influence Clinical Outcome for Dinutuximab-based Immunotherapy: A Report from the Children's Oncology Group HHS Public Access. *Clin Cancer Res* **24**, 189–196 (2018).
59. Bottino, C. *et al.* Natural killer cells and neuroblastoma: Tumor recognition, escape mechanisms, and possible novel immunotherapeutic approaches. *Frontiers in Immunology* vol. 5 (2014).
60. Sivori, S. *et al.* Involvement of natural cytotoxicity receptors in human natural killer cell-mediated lysis of neuroblastoma and glioblastoma cell lines. in *Journal of Neuroimmunology* vol. 107 220–225 (J Neuroimmunol, 2000).
61. Neal, Z. C. *et al.* NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **53**, 41–52 (2004).
62. Castriconi, R. *et al.* Identification of 4Ig-B7-H3 as a neuroblastoma-associated molecule that exerts a protective role from an NK cell-mediated lysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12640–12645 (2004).
63. Castellanos, J. R. *et al.* B7-H3 role in the immune landscape of cancer. *American journal of clinical and experimental immunology* **6**, 66–75 (2017).
64. Castriconi, R. *et al.* Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: Critical role of DNAX accessory molecule-1-poliiovirus receptor interaction. *Cancer Research* **64**, 9180–9184 (2004).
65. Bellora, F. *et al.* The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21659–21664 (2010).

66. Terrén, I., Orrantia, A., Vitallé, J., Zenarruzabeitia, O. & Borrego, F. NK cell metabolism and tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology* vol. 10 (2019).
67. Liu, Y. *et al.* Growth and Activation of Natural Killer Cells Ex Vivo from Children with Neuroblastoma for Adoptive Cell Therapy. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1243.
68. Nath, S. & Devi, G. R. Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacology & therapeutics* **163**, 94–108 (2016).
69. FRANKO, A. & FREEDMAN, H. Model of diffusion of oxygen to spheroids grown in stationary medium—I. Complete spherical symmetry. *Bulletin of Mathematical Biology* **46**, 205–217 (1984).
70. Achilli, T. M., McCalla, S., Meyer, J., Tripathi, A. & Morgan, J. R. Multilayer spheroids to quantify drug uptake and diffusion in 3D. *Molecular Pharmaceutics* **11**, 2071–2081 (2014).
71. Wallace, D. I. & Guo, X. Properties of tumor spheroid growth exhibited by simple mathematical models. *Frontiers in Oncology* **3 MAR**, (2013).
72. Pampaloni, F., Reynaud, E. G. & Stelzer, E. H. K. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 839–845 (2007).
73. Zitvogel, L. & Kroemer, G. The immune response against dying tumor cells: Avoid disaster, achieve cure. *Cell Death and Differentiation* vol. 15 1–2 (2008).
74. Zeh, H. J. & Lotze, M. T. Addicted to death: Invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death. *Journal of Immunotherapy* vol. 28 1–9 (2005).
75. Crusio, W. E., Lambris, J. D. & Radeke, H. H. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. <http://www.springer.com/series/5584>.
76. Perussia B, Ramoni C, Anegón I, Cuturi MC, Faust J, T. G. Preferential Proliferation of Natural Killer Cells Among Peripheral Blood Mononuclear Cells Cocultured With B Lymphoblastoid Cell Lines - PubMed. *Nat Immun Cell Growth Regul.* **6(4)**, 171–188 (1987).
77. Sánchez-Martínez, D. *et al.* Human NK cells activated by EBV+ lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *OncoImmunology* **4**, 1–13 (2015).
78. Muntasell, A., Magri, G., Pende, D., Angulo, A. & López-Botet, M. Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood* **115**, 5170–5179 (2010).
79. Judge, S. J., Murphy, W. J. & Canter, R. J. Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* vol. 10 (2020).
80. Sivori, S. *et al.* Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. (2019) doi:10.1038/s41423-019-0206-4.
81. Braekeveldt, N. & Bexell, D. Patient-derived xenografts as preclinical neuroblastoma models. *Cell and Tissue Research* vol. 372 233–243 (2018).

82. Lanuza, P. M. *et al.* Activated human primary NK cells efficiently kill colorectal cancer cells in 3D spheroid cultures irrespectively of the level of PD-L1 expression. *OncoImmunology* **7**, e1395123 (2018).
83. Kim, M., Kim, T. J., Kim, H. M., Doh, J. & Lee, K. M. Multi-cellular natural killer (NK) cell clusters enhance NK cell activation through localizing IL-2 within the cluster. *Scientific Reports* **7**, 1–8 (2017).
84. Voeller, J. *et al.* Combined innate and adaptive immunotherapy overcomes resistance of immunologically cold syngeneic murine neuroblastoma to checkpoint inhibition. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* **7**, (2019).
85. Hsu, J. *et al.* Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *Journal of Clinical Investigation* **128**, 4654–4668 (2018).
86. Dondero, A. *et al.* PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. *OncoImmunology* **5**, (2016).
87. Georger, B. *et al.* Pembrolizumab in paediatric patients with advanced melanoma or a PD-L1-positive, advanced, relapsed, or refractory solid tumour or lymphoma (KEYNOTE-051): interim analysis of an open-label, single-arm, phase 1–2 trial. *The Lancet Oncology* **21**, 121–133 (2020).