



**Universidad**  
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

**ACTIVACIÓN DE CÉLULAS NK  
HUMANAS PARA EL TRATAMIENTO DE  
LA LEUCEMIA**

Yaiza Cáceres Martell

Director: Alberto Anel Bernal

Facultad de Ciencias

2017

# ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT .....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1 Inmunidad mediada por células NK .....	2
2.2 Leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B) .....	3
2.3 Terapia antitumoral basada en células NK .....	4
• 2.3.1 Técnicas de aislamiento celular existentes .....	4
2.4 Células NKT .....	5
3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS .....	6
4. MATERIALES Y MÉTODOS .....	7
4.1 Cultivos celulares .....	7
• 4.1.1 Condiciones de cultivo .....	7
• 4.1.2 Medios de cultivo .....	7
• 4.1.3 Líneas celulares empleadas y mantenimiento del cultivo celular .....	7
• 4.1.4 Contaje y viabilidad celular .....	7
• 4.1.5 Conservación de células y descongelación .....	8
4.2 Expansión y activación de células NK .....	8
• 4.2.1 Centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque .....	8
• 4.2.2 Eliminación parcial de Linfocitos T mediante técnica inmunomagnética .....	9
• 4.2.3 Activación y expansión de células NK .....	10
• 4.2.4 Aislamiento de células NK .....	10
• 4.2.5 Evaluación de la proliferación y evaluación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. ....	11
5. RESULTADOS .....	12
5.1 Expansión de células NK .....	12
• 5.1.1 Experimento 1 .....	12
• 5.1.2 Experimento 2 .....	14
5.2 Aislamientos celulares con técnica inmunomagnética .....	16
• 5.2.1 Selección negativa- Eliminación parcial de células T .....	16
• 5.2.2 Aislamiento positivo de células NK .....	19
• 5.2.3 Cambios en el protocolo de aislamiento inmunomagnético CD56+ de Stem Cell. ....	21
6. DISCUSIÓN .....	22
7. CONCLUSIONES /CONCLUSIONS .....	24
8. BIBLIOGRAFÍA .....	25

## 1.RESUMEN/ABSTRACT

Las células asesinas naturales también conocidas como NK presentan actividad citotóxica frente a células infectadas por virus y frente a células tumorales del organismo. Se caracterizan a nivel fenotípico por la expresión del marcador CD56 en superficie y la ausencia de CD3, lo que permite diferenciarlas de otras poblaciones celulares mayoritarias en la sangre. Estos últimos años se ha planteado el uso de células NK obtenidas a partir de la sangre periférica de donantes sanos, para el tratamiento contra leucemias linfoides y mieloides resistentes a fármacos convencionales. Para que la actividad citotóxica sobre las células tumorales sea significativa, las *natural killer* deben ser activadas y expandidas y para ello se requiere seguir una serie de pasos previos entre los que se encuentran la eliminación parcial de linfocitos T de la muestra, la adición de células estimuladoras 721.221 y de interleuquinas IL-2 e IL-15 al cultivo y un aislamiento positivo de las células NK con el fin de enriquecer la muestra con las células de interés. La finalidad de este trabajo es expandir y activar las células en experimentos de 18 días de duración. Además, se ha comparado la eficiencia de dos kits de aislamiento inmunomagnético, procedentes de las casas comerciales Stem Cell y *Miltenyi*, con el fin de averiguar cuál de los dos permitía una mayor eliminación de linfocitos T y una mayor purificación de las células NK en el cultivo.

NK cells have cytotoxic activity against cells that have been infected by viruses or against tumor cells in the organism. At a phenotypic level, these cells can be characterized by the expression of CD56 in their cell surface and by the absence of CD3, which allows us to differentiate them from other cell populations in the blood. The use of NK cells obtained from peripheric blood of healthy donors has been proposed these past years, as an alternative treatment against lymphoid and myeloid leukaemia in patients which show resistance to conventional drugs. In order to obtain a significant cytotoxic activity from NK cells against the cancer cells, these natural killers require a previous activation and expansion. To achieve this, several steps, such as the removal of T lymphocytes, the addition of stimulator 721.221 cells and of interleukins IL-2 and IL-15 to the cell culture, and a positive isolation of NK cells from the sample, need to be previously performed. The purpose of this study was to expand and activate the NK cells during 18-day experiments. Moreover, two commercial immunomagnetic cell isolation kits from *Stem Cell* and *Miltenyi*, were compared in order to analyse which of them allowed the elimination of a higher percentage of T lymphocytes from the cell culture and a higher purification of NK cells in from this same cell culture.

## 2.INTRODUCCIÓN

### 2.1 Inmunidad mediada por células NK

Ante la exposición a un agente extraño, el sistema Inmune del organismo genera una respuesta de tipo innata como primera línea de defensa. Esta respuesta también conocida como no específica, implica la actividad de barreras anatómicas, pero también de varios tipos de células del sistema inmunitario, entre las que encontramos a las células asesinas naturales o células NK [1].

Estas células conocidas como “natural killer” son linfocitos granulares grandes que poseen actividad citotóxica contra células infectadas por virus y contra células tumorales. Constituyen entre un 5 y 10% de los linfocitos en sangre periférica humana y carecen de receptores específicos de antígeno, por lo que actuarán sobre células diana sin necesidad de una sensibilización previa y sin restricción por el complejo mayor de histocompatibilidad, lo que permite una reacción inmunológica rápida [1, 2]

Las NK proceden de precursores hematopoyéticos generados en la médula ósea, al igual que los linfocitos T, pero a diferencia de ellos no expresan CD3 en su superficie. Los marcadores característicos expresados en la superficie de las células NK son CD56 (NKH-1, Leu-19) y CD16 (Fc γ RIII) .CD56 no participa directamente en la eliminación de las células diana aunque se ha propuesto recientemente su participación en la adhesión de las NK a líneas de células tumorales CD56+ [3]. En definitiva, las NK son definidas fenotípicamente como CD56+ CD3-, lo cual se usará en técnicas de aislamiento celular, con el fin de enriquecer las muestras en células de este tipo.

A su vez, se distinguen dos poblaciones de células NK atendiendo a este fenotipo. Las CD56<sup>dim</sup> constituyen el 90% de las células NK y son consideradas como las de mayor actividad citotóxica. La otra subpoblación es conocida como CD56<sup>bright</sup> que supone el 10% restante de las células NK, con función mayoritaria en producción de citoquinas como IFN, TNFalfa, GM-CSF y RANTES tras la activación [4,5].

Para que las células adquieran citotoxicidad, requieren una activación previa, un proceso mediado por receptores de activación e inhibición, lo cual les permite distinguir a las células infectadas o alteradas por algún tipo de estrés de aquellas células normales o sanas.

Por un lado, las células NK expresan receptores de inhibición, como los KIRs o los NKG2A que reconocen al complejo mayor de histocompatibilidad tipo I (MHCI), normalmente expresados en la superficie de células sanas. Esta unión provoca una señal inhibitoria que evita la activación de la citotoxicidad de las células NK sobre las propias células del organismo [6].

Por otra parte, las células NK también expresan receptores de activación(AR) en su superficie. Algunos ejemplos son los receptores de la familia de las lectinas tipo C, donde el más común es el NKG2D. Esta molécula reconoce a las proteínas MIC-a y MIC-b presentes en células infectadas por virus o células tumorales de forma que se pone en marcha la actividad citotóxica de las células NK para eliminar dichas células diana [6].

En cuanto a los mecanismos por los cuáles las células asesinas destruyen a las células diana, encontramos dos procesos.

La primera vía de acción consiste en la exocitosis de gránulos citoplasmáticos. Estos contienen perforinas que facilitan la entrada, a través de la membrana de otras proteínas granulares llamadas granzimas. Estas últimas son serín proteasas que inician una secuencia de señales en la célula diana que le causan la muerte por apoptosis. [7].

La segunda vía de acción implica la unión de ligandos mortales presentes en la superficie de células NK tales como FasL o TRAIL con sus receptores mortales en las células diana (FAS/CD95). Esto resulta en una clásica muerte por apoptosis dependiente de caspasa [8].

Además, las “*natural killer*” presentan citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Esto es debido a que expresan el receptor de membrana CD16 que reconoce y se une a la región Fc de la IgG1. Solamente liga a las inmunoglobulinas que se encuentran fijadas a una célula, pero no a aquellas que se encuentran en circulación. Esta unión a los anticuerpos desencadena una síntesis de citoquinas, como IFN- $\gamma$ , al igual que promueve la descarga del contenido de los gránulos citoplasmáticos en la célula diana [6].

Esta actividad citotóxica descrita, permite que las células NK puedan ser utilizadas para tratamientos de inmunoterapia contra el cáncer.

## 2.2 Leucemia linfocítica crónica de células B (LLC-B)

La leucemia linfocítica crónica de células B(B-CLL) es una enfermedad caracterizada por la acumulación de células B CD5+ en la sangre y en los órganos linfoides secundarios. Se trata de la leucemia más frecuente en el adulto en países occidentales, siendo esta predominante en hombres. Durante las primeras fases, este cáncer es asintomático, por lo que dificulta el diagnóstico. Los síntomas comienzan a aparecer cuando las células tumorales desplazan a las hematopoyéticas normales de la médula ósea [9,10]

Entre pacientes con la misma enfermedad, se observa una clínica muy heterogénea. Se han descrito algunos marcadores que permiten predecir la progresión del cáncer, el índice de supervivencia y la posible resistencia a tratamientos de quimioterapia. Un gran porcentaje de pacientes presenta mutaciones en dos regiones del DNA no codificantes, una de ellas afecta al gen NOTCH1 y otra a un amplificador o *enhancer* del cromosoma 9, lo cual provoca una disminución en la expresión del factor de transcripción PAX5, que ejerce un papel central en la adhesión, migración y función de los linfocitos B [9].

Alteraciones cromosómicas como la delección del cromosoma 13 está relacionada con un pronóstico más favorable. Por el contrario, la delección en el cromosoma 17 que implica la ausencia del gen supresor de tumores p53, supone un pronóstico más desfavorable al igual que sobreexpresión de CD38 y ZAP70. También se ha asociado la mutación en IGHV a un mal pronóstico pues produce una falta de respuesta por parte de los receptores de las células B [9].

En cuanto al tratamiento, debido a la lenta progresión de la leucemia, no todos los pacientes requieren ser tratados de inmediato tras el diagnóstico. Normalmente, el tratamiento consiste en quimioterapia y anticuerpos monoclonales anti-CD20 que se unen a la membrana de linfocitos B. Sin embargo, estos fármacos provocan un gran número de efectos secundarios y no proporcionan una remisión total de la enfermedad en la mayoría de los casos [11].

## 2.3 Terapia antitumoral basada en células NK

La terapia celular, usando NK se propone como una alternativa efectiva y más segura para el tratamiento de leucemias mieloides y linfoides que no responden a terapias convencionales. Se basa en el uso de células NK activadas para eliminar células de neoplasias hematológicas [9].

Estudios proponen que la susceptibilidad de las células de B-CLL está significativamente relacionada con la compatibilidad de HLA entre las células NK del donante y la leucemia del paciente. Además, se ha demostrado recientemente, que la sensibilidad de las células tumorales a dicho tratamiento depende del pronóstico basado en las mutaciones del gen p53 y el IGHV, siendo estos los tumores de peor pronóstico y los más susceptibles a la terapia antitumoral descrita [9].

Los pacientes que padecen de leucemia linfocítica crónica de células tipo B, presentan células NK con una actividad citotóxica defectiva. Además, las células tumorales utilizan diversos mecanismos inmunosupresores para inhibir las funciones efectoras de dichas células del sistema inmune innato [12].

- 2.3.1 Técnicas de aislamiento celular existentes

En estudios previos sobre el uso de células NK en el tratamiento de la inmunoterapia contra la leucemia linfocítica crónica de células B, se llegó a la conclusión de que las células *natural killer* requieren una activación para que la actividad citotóxica contra células tumorales sea significativa [9].

Teniendo en cuenta que las células NK suponen de un 5% a un 20% de los linfocitos que forman parte de la sangre periférica humana [13], se requiere un previo aislamiento de las células asesinas naturales, con el fin de eliminar la mayor parte de otras poblaciones presentes en la sangre del donante y así enriquecer el cultivo en las células de interés para su posible uso como tratamiento.

Existen en la actualidad diversas técnicas de aislamiento de células NK. Entre las más destacadas encontramos la separación por centrifugación por gradiente de densidad y la técnica de aislamiento inmunomagnético.

La técnica de aislamiento por centrifugación de gradiente de densidad es la única técnica alternativa para el aislamiento de células NK que no usa anticuerpos contra las propias células *natural killer* [14]. Es una selección negativa de las células NK, en la que se consigue separar a estas células de interés, descartando a las demás poblaciones celulares mayoritarias de la muestra de sangre extraída, a lo largo de una serie de pasos que deben llevarse a cabo. En primer lugar, se eliminan los monocitos y las células B por purificación con un “ovillo de nylon”, posteriormente se eliminan las células T usando “*panning*” con anticuerpos anti-CD3 y finalmente se separan las células NK del resto de células no nucleares por la centrifugación de gradiente de densidad [14].

Otras técnicas hacen uso del método de aislamiento inmunomagnético. Se basa en el uso de anticuerpos específicos contra moléculas expresados en la membrana celular de las NK. Como se explica en el apartado 2.1, las células *natural killer* se describen fenotípicamente como CD56+ CD3-. Esta característica diferencial es aprovechada para la separación celular. Se usan

anticuerpos conjugados a *microbites* magnéticos, de forma que se hace una selección positiva en la que las células que expresen el antígeno CD56 en su superficie quedan unidas a dicho anticuerpo. Este queda retenido en el tubo de ensayo gracias a la aplicación de un campo magnético. El imán atrae a los anticuerpos unidos a las partículas magnéticas y, por tanto, las células de interés quedan retenidas, mientras que el resto de células CD56- son eluidas [15].

## 2.4 Células NKT

Las células *natural killer T*, son una subpoblación de las células T que comparten algunas propiedades de los linfocitos T y de las células NK, por lo que en su superficie expresan tanto CD56 como CD3 [16].

Al igual que los linfocitos T, las células NKT expresan receptores TCR en su membrana, sin embargo, estos no reconocen a péptidos antigénicos presentados por MHC, sino que reconocen a lípidos y glicolípidos presentados por moléculas de tipo CD1d. Esto les confiere actividad antimicrobiana a las células, participando en el reconocimiento de glicolípidos de membrana de algunos microorganismos patógenos [17].

Además, las células NKT juegan un importante papel en la supervivencia tumoral. Estas *natural killer T* tienen la capacidad de lisar células tumorales directamente por un mecanismo dependiente de la liberación de perforina. También intervienen en la eliminación de células tumorales por una vía indirecta, mediante la producción de citoquinas como IFN- $\gamma$ , (IL)-2, -4, -10, -13, -17, -21, y -22, entre otras. Estas moléculas activan a las células NK, los linfocitos T y B, potenciando la acción de las mismas [18].

La participación de las células NKT en la defensa contra las células tumorales del organismo ha provocado un creciente interés por continuar estudiando sus mecanismos de acción más detalladamente, pues, al igual que las células NK, pueden ser unas buenas candidatas para uso en inmunoterapia contra el cáncer [18].

### 3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

En el grupo de Apoptosis, Inmunidad y Cáncer de la Facultad de Ciencias, durante estos años previos se ha investigado sobre el empleo de células NK como tratamiento contra la leucemia linfocítica crónica de células B.

En trabajos anteriores, se comprobó que estas células NK humanas presentaban capacidad citotóxica tras ser activadas y se procedió a la optimización del protocolo de expansión de células *natural killer* obtenidas de sangre de cordón umbilical, con el fin de obtener la cantidad necesaria de las mismas para así poder tratar a un paciente con LLC-B [9].

Además, en nuestro grupo de investigación, se llevaron a cabo varios experimentos de expansión de células aisladas a partir de células mononucleares de sangre periférica obtenidas de donantes sanos. Estas células fueron cultivadas junto a células estimuladoras 721.221 combinadas con IL-2 e IL-15. Asimismo, se comprobó que la presencia adicional de interferón  $\alpha$  en el medio de cultivo no aportaba ningún beneficio significativo en la proliferación y activación de las células NK por lo que, para experimentos futuros, se decidió no utilizarlo [Calvo.T, *Comunicación Personal*; Gascón. M, *TFG Protocolos de expansión y activación de células NK humanas (2016)*].

En todos estos experimentos de expansión y activación de células NK, se aislaron las células empleando la técnica de separación inmunomagnética MACS de la casa *Miltenyi* con el fin de enriquecer los cultivos con las poblaciones celulares de interés e intentar descartar el resto de componentes del plasma.

Por otra parte, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad de las células NK expandidas sobre 30 muestras de pacientes de LLC-B, obteniendo resultados positivos.

Siguiendo la línea de investigación y con el objeto de mejorar el protocolo de expansión y purificación de las células NK para emplearlas en el tratamiento de la LLC-B, se establecen los siguientes objetivos:

1. Comparación de la eficacia en la eliminación de linfocitos T mediante técnicas inmunomagnéticas, llevadas a cabo por dos productos procedentes de las casas comerciales *Stem Cell* y *Miltenyi*.
2. Comparación de la eficacia del aislamiento de células NK mediante técnicas inmunomagnéticas llevadas a cabo por dos productos procedentes de las casas comerciales *Stem Cell* y *Miltenyi*.
3. Estudio de la evolución y análisis de las células NK durante los 18 días de expansión.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cultivos celulares

- 4.1.1 Condiciones de cultivo

Los distintos ensayos se llevaron a cabo con células eucariotas humanas, pero existe la posibilidad de contaminación del medio de cultivo por bacterias, levaduras o micoplasmas. Estos microorganismos pueden colonizar el medio llegando a provocar la muerte de las células de interés. Por ello, con el fin de evitarlo, se usan técnicas de trabajo que suponen la máxima asepsia, entre las que se destaca el uso de material estéril como puntas de micropipeta y pipetas graduadas de vidrio, esterilizadas por irradiación.

Además, el ambiente de trabajo también debe ser estéril por lo que la manipulación de los cultivos celulares se lleva cabo en una cabina de flujo laminar vertical, en la que el aire es filtrado a través de un filtro de 0,2µm.

Por otro lado, se requiere un extremo cuidado por parte del operario, que debe limpiar la superficie de trabajo con alcohol del 70%. También se recomienda el uso de guantes con el fin de evitar contaminaciones indeseadas del cultivo.

- 4.1.2 Medios de cultivo

Para los ensayos llevados a cabo se empleó el medio RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB) de complementado al 10% v/v y con Glutamax<sup>®</sup>. Este medio está destinado al cultivo de células humanas por lo que se añade penicilina y estreptomina que son antibióticos que intentan prevenir las contaminaciones bacterianas previamente descritas.

- 4.1.3 Líneas celulares empleadas y mantenimiento del cultivo celular

721.221 es una línea celular linfoblastoide humana transformada por el virus de Epstein-Bar y deficiente en la expresión de moléculas HLA-I. Es usada en co-cultivos con las células NK debido a su propiedad estimuladora en la activación de las células linfocitarias de interés [9].

Los cultivos de las células 721.221 se llevaron a cabo en el medio detallado en el apartado 4.1.2, en frascos de 25 o 75cm<sup>2</sup> con un tapón hermético que impide la entrada de microorganismos contaminantes, pero permite el intercambio de gases con el medio externo.

Estos cultivos se mantienen en un incubador termostatzado a una temperatura constante de 37°C y con un aporte fijo del 5% de CO<sub>2</sub>, realizando cambios de medio y diluciones cada tres días aproximadamente, con el fin de mantener la concentración adecuada de células.

- 4.1.4 Contaje y viabilidad celular

La tinción de células con azul Trypan, el empleo de la cámara *Neubauer* y el microscopio óptico fueron el método de elección para el contaje de las células en cultivo y para la evaluación de su viabilidad.

El colorante azoico, penetra en aquellas células que no conservan la integridad de la membrana celular, mientras que las células viables no incorporan el azul de Trypan. De esta forma, se pueden distinguir las células muertas, de las vivas por su distintivo color azul.

Para llevar a cabo esta técnica, se resuspenden 50µl de suspensión celular en 50µl del colorante en un *tubo eppendorf*. A continuación, se depositan 20µl de la mezcla en el interior de la cámara *Neubauer* y con el uso del microscopio óptico a 200 aumentos se cuenta el número total de células en los cuatro cuadrantes.

- 4.1.5 Conservación de células y descongelación

En los ensayos, se llevó a cabo la congelación de varios viales del cultivo celular de 721.221 con el fin de conservar las células, como medida de precaución, por si aparecía alguna contaminación indeseable en el cultivo original a lo largo del proceso. Se congelaron  $5 \cdot 10^6$  células en medio ml de medio por cada vial.

Para la congelación celular, se centrifuga la muestra durante 5 minutos a 1500rpm con el fin de eliminar el medio de cultivo. A continuación, se resuspende el precipitado en medio RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10% y enriquecido en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. El DMSO es un agente criopreservante que evita los efectos perjudiciales de formación de cristales de hielo en el interior de la célula.

Esta suspensión celular se trasvasa a viales de congelación que son introducidos en un congelador a -80°C. Para que la bajada de temperatura no sea muy radical se recomienda envolver los viales en papel antes de introducirlos al congelador, lo cual hará que el cambio de temperatura sea más gradual y provoque menos daños en las células. Una vez congelados, se introducen los viales en contenedores de N<sub>2</sub> líquido.

Para la descongelación de las células, el contenido de los viales se resuspende en 10ml de medio RPMI con 10% de SFB y se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm para eliminar el sobrenadante que contiene el DMSO y que es tóxico para las células. Tras descartar el sobrenadante, las células se resuspenden en medio de cultivo completo y se cultivan en frascos de 25cm<sup>2</sup>.

## 4.2 Expansión y activación de células NK

Para la obtención de las células NK se parte de los “*buffy coats*” humanos obtenidos a partir de donantes sanos anónimos, proporcionada por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón. Se trata de una capa procedente de la muestra de sangre, que está enriquecida en leucocitos y plaquetas. El contenido de este “*buffy coat*”, se diluye en 10 ml de PBS estéril.

- 4.2.1 Centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Paque

Mediante la técnica de centrifugación en gradiente de densidad se aislaron las células mononucleares de la sangre periférica humana (PBMC). Para ello se empleó el polisacárido comercial Ficoll-Paque cuya densidad es de 1,078g/ml, el cual permite la separación de las distintas poblaciones de células que componen la muestra sanguínea según un gradiente de densidad.

Se depositan los mililitros de dilución del *buffy coat* encima de 20ml de *Ficoll-Paque* en un tubo. Esto debe hacerse de forma cuidadosa, dejando caer la muestra por las paredes del tubo para que no se mezclen los dos componentes líquidos. El contenido del tubo se centrifuga durante 20 minutos a 1500rpm, quitando el freno de la centrifuga.

Una vez finalizada la centrifugación, se observan dos fases y entre ellas una interfase que conforma un anillo blanquecino que contiene las células de interés. Haciendo uso de una pipeta se trasvasa esta interfase a un tubo con PBS. Con el fin de intentar eliminar la máxima cantidad de de Ficoll y eritrocitos, este proceso se repite dos veces.

La población celular obtenida, denominada PBL (linfocitos de sangre periférica), se resuspende en medio RPMI 1640 al 10% con SFB de complementado.

- 4.2.2 Eliminación parcial de Linfocitos T mediante técnica inmunomagnética

Con el fin de llevar a cabo los protocolos de activación y expansión de las células NK, es preciso eliminar a los linfocitos T de la muestra pues son una población mayoritaria de los linfocitos totales de la sangre. Esta eliminación será parcial, y se lleva a cabo a día 0 de experimento.

Para la separación celular se usó la técnica inmunomagnética que utiliza anticuerpos que reconocen los antígenos CD3 expresados en la superficie celular de los linfocitos T específicamente.

En este trabajo se llevaron a cabo dos aislamientos a partir de la misma muestra utilizando dos kits de aislamiento inmunomagnético procedentes de dos casas comerciales distintas: *Miltenyi* y *Stem Cell*. En ambos casos se trata de una selección negativa de células NK, pues los anticuerpos reconocen a los linfocitos T y por tanto, las células de interés no quedan retenidas, sino que las podemos encontrar en el eluido junto a las demás poblaciones celulares de la muestra.

-Técnica de aislamiento inmunomagnética MACS® (Casa comercial Miltenyi)

Este producto de separación celular de la casa *Miltenyi*, utiliza columnas basadas en campos magnéticos. Emplea microsferas MACS que son partículas paramagnéticas conjugadas con anticuerpos que reconocen específicamente a la proteína de membrana CD3, que como se ya se ha descrito, está ausente en las células NK.

Antes de someter a las células a la separación, se resuspenden en 90µl de tampón MACS. A continuación, se añaden 10 µl de las microsferas conjugadas con anti-CD3 por cada 10<sup>7</sup> células totales y se incuban durante 15 minutos a 4°C.

Transcurrido el tiempo indicado, se centrifuga la muestra y se pasa por la columna magnética MACS, de forma que las células que expresan CD3 en su superficie (células T y NKT, quedan retenidas en la columna mientras que el resto de ellas, son eluidas. En el eluido tendremos una población celular más enriquecida en células NK.

-Técnica de aislamiento inmunomagnética EasySep™ Magnet (Casa comercial Stem Cell)

El otro producto de separación celular de la casa comercial *Stem Cell*, está compuesto por un imán y un kit de anticuerpos anti-CD3 conjugados a unas partículas magnéticas.

Para llevar a cabo dicho aislamiento es necesario llevar las células a una concentración mínima de 1·10<sup>8</sup>células/mL en un volumen de máximo 2mL. Esta muestra se trasvasa a un tubo de poliestireno y se añaden 100µl del cocktail de selección a la muestra, dejándolos incubar durante 3 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 60µl de partículas magnéticas y se dejan incubar durante otros 3 minutos.

La mezcla se resuspende en la cantidad de medio suficiente para llevarla a un volumen total de 2.5mL. A continuación, se pone el tubo con la muestra en el imán y se deja reposar durante otros tres minutos. Por último, se pasa el contenido del tubo a otro tubo de 15 ml. En este sobrenadante estarán las células NK y el resto de células de la muestra que sean CD3<sup>-</sup>. Aquellas células que presenten CD3 en la membrana celular, quedan unidas a los anticuerpos conjugados con las partículas magnéticas que están retenidos en las paredes del tubo gracias al campo magnético aportado por el imán.

El sobrenadante con las células de interés se vuelve a llevar hasta un volumen de 2.5 ml y se repite 2 veces el proceso a partir su posicionamiento en el imán.

Al final se obtiene una muestra en la que se han descartado una gran proporción de linfocitos T y por tanto está enriquecida en células NK.

- **4.2.3 Activación y expansión de células NK**

Las células estimuladoras 721.221, se deben tratar con mitomicina C antes de añadirlas al cultivo de células linfocíticas. Este quimioterápico impide que las células 721.221 proliferen en el cultivo, pero no afecta a la expresión de los receptores de membrana de las mismas por lo que conservan su actividad estimuladora.

Se añade 1ml de mitomicina C por cada  $10^7$  células 721.221 en 20 ml de RPMI 1640 y se deja actuar durante 2 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo se lavan las células para eliminar la mitomicina C.

Con el fin de expandir las células NK e incrementar su actividad citotóxica, se establecen cultivos celulares en los que se enfrentan las células NK con las 721.221 previamente inactivadas en una proporción 10:1 (células NK: 721.221). Concretamente, se añade una concentración de  $2 \cdot 10^6$  células/ml de células 721.221 en un frasco de 10 ml de medio RPMI al 10% en SFB con una concentración de  $20 \cdot 10^6$  células NK/ml. A estos cultivos se les añade 100UI/10ml de IL-2 y 25UI/10ml de IL-15, unas citoquinas estimuladoras que intervienen en la activación de las células NK.

Para los ensayos se establecieron dos cultivos diferentes para cada uno de los dos aislamientos llevados a cabo: uno de ellos serviría como control, pues solo contendría PBL y en el segundo se añadió tanto PBL, como células 721.221, IL-2 e IL-15. En definitiva, se establecieron dos cultivos para la muestra obtenida a partir del aislamiento con el kit de *Miltenyi* y dos cultivos para la muestra obtenida a partir del aislamiento con el kit de *Stem Cell*.

Estos cuatro cultivos celulares se mantienen una media de 18 días, en los cuáles se evalúa la viabilidad celular con el método de azul Trypan detallado en el apartado 4.1.4. Además, se hace un seguimiento de la proliferación celular y la evolución de las poblaciones mediante citometría de flujo los días 5,10,15 y 18 de experimento. En estos días se ajusta la concentración de las células en cultivo y se lleva a cabo un cambio de medio con el fin de evitar la muerte de las células de interés.

- **4.2.4 Aislamiento de células NK**

A día 18 de experimento, se lleva a cabo nuevamente un aislamiento, pero en esta ocasión, será una selección positiva de células NK. Se llevaron a cabo usando dos kits de separación

inmunomagnética de diferentes casas comerciales. Al ser una selección positiva, en este caso los anticuerpos son específicos contra CD56 expresado en las membranas de las células NK.

#### -Técnica de aislamiento inmunomagnética MACS® (Casa comercial Miltenyi)

Se emplean microesferas MACS conjugadas con anticuerpo anti-CD56, por lo que, al pasar la muestra del cultivo celular por la columna, las células NK quedarán unidas a ellos. Los tiempos de incubación de la muestra con el anticuerpo son de 15 minutos, al igual que para el kit con anticuerpos anti-CD3.

En esta ocasión se descarta el eluido. A continuación, debe lavarse la columna y eluir las células que quedan pegadas a ella pues son las de interés. Estas se centrifugan a 1500 rpm durante 5 minutos y se resuspenden en 10 ml de medio y se lleva a cabo una tinción con azul Trypan para evaluar la cantidad de células obtenidas.

#### -Técnica de aislamiento inmunomagnética EasySep™ Magnet (Casa comercial Stem Cell)

Para la técnica de aislamiento de la casa comercial *Stem Cell*, se requiere preparar la muestra a una concentración de  $1 \cdot 10^8$  células/ml. Se lleva a cabo el mismo protocolo que para la eliminación parcial de linfocitos T del apartado 4.2.2., con la diferencia de que esta vez los anticuerpos son anti-CD56, por lo que, al eliminar el contenido del tubo colocado en el imán, las células de interés quedarán unidas a las paredes del tubo de poliestireno pues han sido reconocidas por los anticuerpos. Los tiempos de incubación de la muestra con el cocktail de anticuerpos son nuevamente de 3 minutos cada uno. El proceso se lleva a cabo dos veces y finalmente se centrifuga el contenido del tubo a 1500 rpm y se resuspende en 5 ml de PBS y suero. Por último, se lleva a cabo un conteo de las células para su posterior análisis usando el citómetro de flujo.

- 4.2.5 Evaluación de la proliferación y evaluación de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo.

En los días 0,5,10,15 y 18 de experimento se llevó a cabo el conteo de las células viables por la técnica de Azul Trypan, lo que permite un análisis estimado de la proliferación de las células de interés.

Por otro lado, para analizar la evolución más específica de las distintas poblaciones celulares en cultivo, se llevó a cabo un análisis por citometría de flujo los mismos días en los que se hicieron los conteos. Para ello se realizó un marcaje en una placa de 96 pocillos, con anticuerpo anti-CD3 conjugado con el fluoróforo FITC y con un anticuerpo anti-CD56 conjugado con APC de la casa comercial Miltenyi. En cada pocillo se añaden 100.000 células de la muestra. A continuación, se centrifuga la placa a 3500 rpm durante 2 minutos, descartando el sobrenadante y resuspendiendo en 96  $\mu$ l de PBS con 5% de SFB. En cada pocillo se añaden 2  $\mu$ l de anticuerpo anti-CD3 y la misma cantidad de anticuerpo anti-CD56 y se incuban durante 15 minutos a 4°C.

Las distintas muestras se analizaron utilizando el citómetro de flujo y empleando el programa informático *CellQuest Pro*.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Expansión de células NK

Siguiendo el proceso detallado en el apartado anterior, se llevaron a cabo dos experimentos de 18 días de duración en los que se expandieron las células NK obtenidas a partir de los *buffy coats* de 5 donantes sanos distintos. En el primer experimento se pusieron en cultivo las células de los 3 donantes con mayor número de células *natural killer*, mientras que en el segundo caso se realizó el mismo experimento, pero esta vez con muestras procedentes de 2 donantes sanos. Para el análisis de la expansión se tomaron los resultados numéricos en forma de porcentajes obtenidos en el citómetro de flujo que correspondían a las células NK marcadas (CD3-CD56+) y se calculó el número total de células. Con el fin de determinar dicho valor, se multiplicó el porcentaje de células NK por el número de células totales en 1ml y por el número de mililitros del cultivo. Los resultados para cada uno de los experimentos se presentan a continuación.

#### • 5.1.1 Experimento 1

Los datos se tomaron a día 0, 5, 10, 15 y 18 de experimento para el donante 1 y 2. Los resultados representados en los siguientes gráficos muestran el número total de células NK y NKT frente al tiempo.

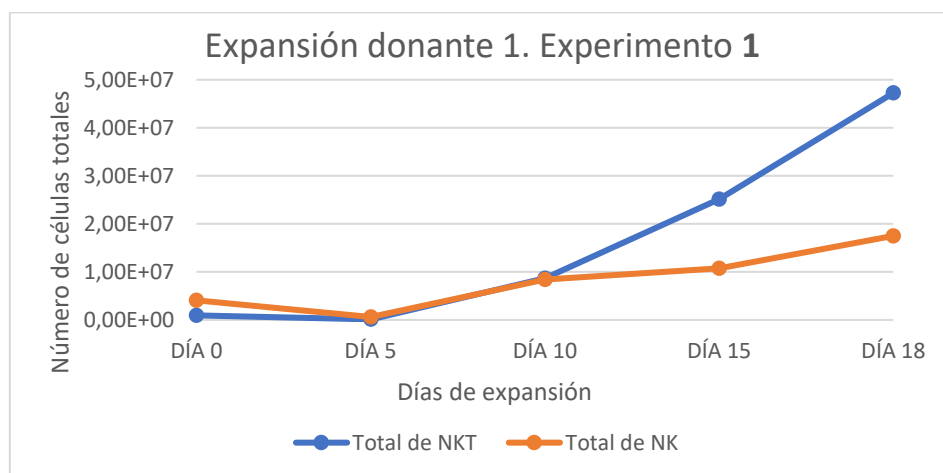


Figura 1. Expansión de las células NK y NKT del donante 1 en el experimento 1 en función del tiempo. Los datos que se muestran corresponden al número total de células presentes en el cultivo.

En la *Figura 1* se reflejan los resultados de la expansión del donante 1. Haciendo referencia a las células NK, se observa una disminución del número total de células del día 0 al día 5 de experimento. Esto se debe a que las células requieren de un tiempo fisiológico de adaptación antes de comenzar a proliferar nuevamente. Tras este día se observa como el número de células aumenta significativamente hasta el día 10 y se mantiene aproximadamente constante hasta el día 18 donde se lleva a cabo la última medición y se registra el número máximo de células NK.

En cuanto a las células NKT, estas siguen un patrón de aumento gradual desde el día 0 de experimento hasta el 18, llegando a alcanzar un número mayor de células que las células NK de interés.

En la expansión mostrada en la *Figura 2* se parte de un número inicial menor de células NK. La disminución de células totales observada a día 5 es bastante más significativa que en el donante 1. El día 10 se observa un aumento poco notable, pero el día 15 de experimento se registra una expansión máxima llegando a alcanzar 6 millones de células NK aproximadamente. A partir de

este día se observa una disminución importante del número de células totales. Por otro lado, las células NKT registran nuevamente un aumento gradual desde el día 0 de experimento alcanzando su máximo a día 18.

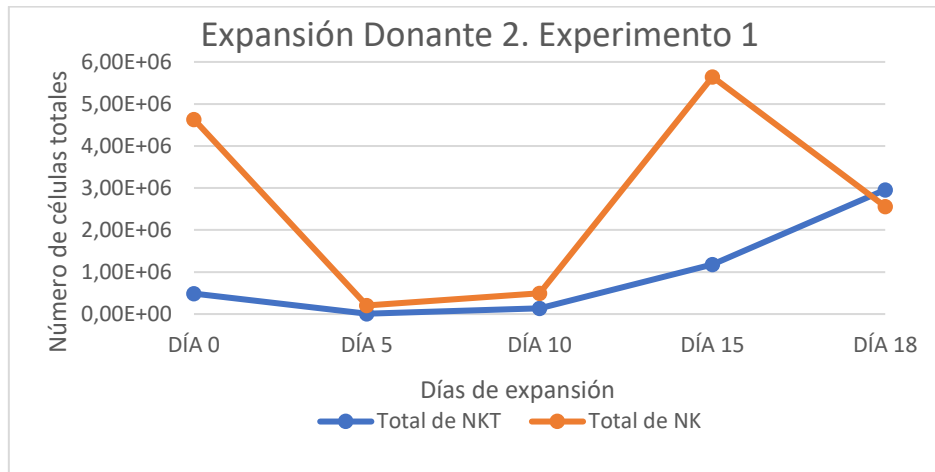


Figura 2. Expansión de las células NK y NKT del donante 2 en el experimento 1 en función del tiempo. Los datos que se muestran corresponden al número total de células presentes en el cultivo.

A continuación, en la Figura 3, se ha querido mostrar los resultados de la expansión obtenidos por citometría de flujo para los donantes 1 y 2 del experimento 1, reflejando de forma representativa, la evolución de las distintas poblaciones, por lo que se han plasmado los dot-plots de los días 0, 10 y 18 de experimento.

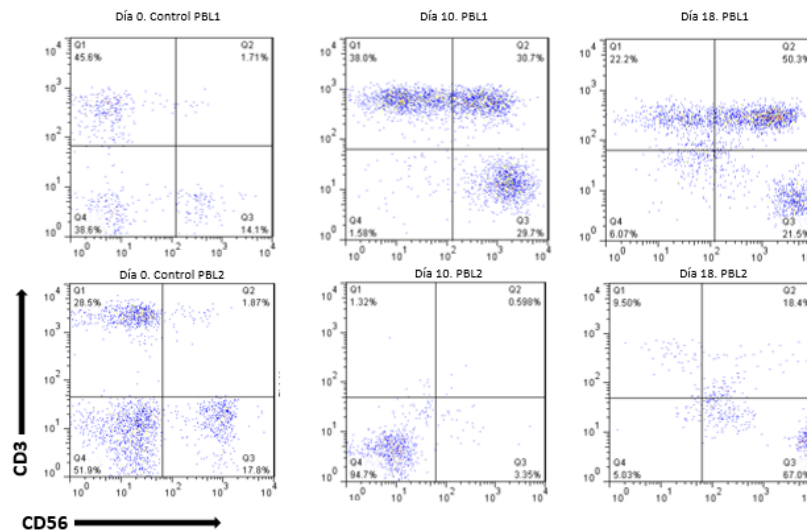


Figura 3. Gráficas de citometría de flujo mostrando los porcentajes de las distintas poblaciones celulares según la expresión de CD3 y CD56: linfocitos T ( $CD3^+CD56^-$ ), células NKT ( $CD3^+CD56^+$ ) y células NK ( $CD3^-CD56^+$ ).

Atendiendo a los porcentajes mostrados en la Figura 3, tanto para el donante 1 como para el 2, se puede observar un aumento del porcentaje de células NK con respecto a la muestra inicial, siendo este aumento más significativo en el segundo caso. Cabe destacar que, con el paso de los días, las células NK presenta un mayor nivel de expresión de CD56 por lo que podemos observar la población celular en cuestión más desplazada a la derecha en el cuadrante inferior etiquetado como Q3 (ver explicación Apartado 6).

- 5.1.2 Experimento 2

Para el experimento 2 se ha llevado a cabo el mismo estudio con muestras procedentes de 3 donantes sanos. Los resultados son los siguientes:

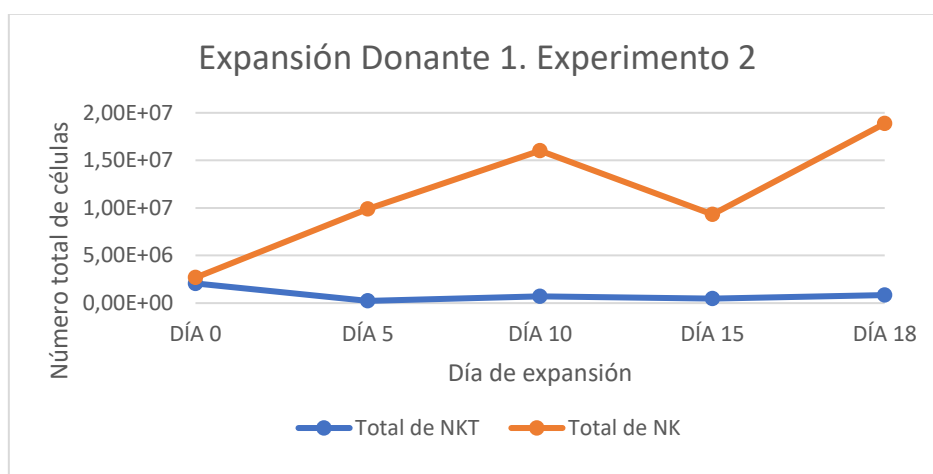


Figura 4. Expansión de las células NK y NKT del donante 1 en el experimento 2 en función del tiempo. Los datos que se muestran corresponden al número total de células presentes en el cultivo.

En la *Figura 4* se observa la expansión de las células procedentes del donante 1 en el experimento 2. En este caso las células NKT no solo no se han expandido, sino que presentan una disminución con respecto al total inicial. En cuanto a las células NK, se observa una expansión significativa del día 0 al 10 de experimento, y aunque el total de células disminuye a día 15, el día 18 de experimento se registra el máximo, alcanzando un total de  $1.89 \cdot 10^7$  células NK totales.

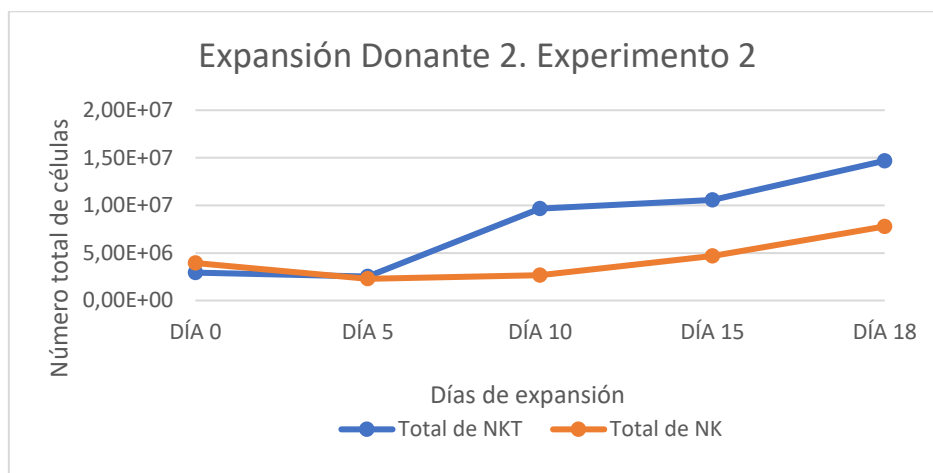


Figura 5. Expansión de las células NK y NKT del donante 2 en el experimento 2 en función del tiempo. Los datos que se muestran corresponden al número total de células presentes en el cultivo.

En la expansión de células del donante 2 (*Figura 5*), se observa nuevamente una mayor expansión de las células NKT que de las células NK. Las *natural killers* vuelven a presentar el característico patrón de disminución el día 5 de experimento debido a la adaptación fisiológica de las mismas al medio y una posterior expansión y proliferación de las mismas hasta alcanzar el máximo a día 18.



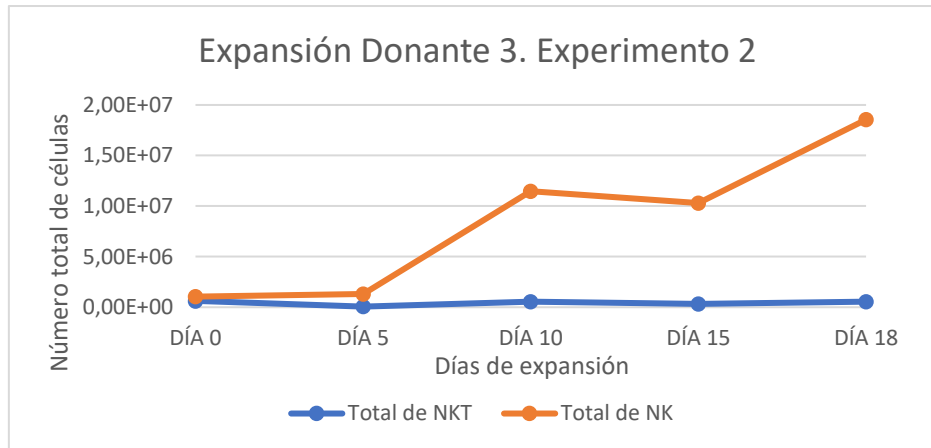


Figura 6. Expansión de las células NK y NKT del donante 3 en el experimento 2 en función del tiempo. Los datos que se muestran corresponden al número total de células presentes en el cultivo.

En la expansión de células del donante 3 (Figura 6), el número de células NKT permanece aproximadamente constante durante los 18 días de experimento. En cuanto a las *natural killer*, se partió de  $1.05 \cdot 10^6$  células NK iniciales, un número total menor que en las dos expansiones descritas anteriormente y finalmente se consiguió un máximo de  $1.89 \cdot 10^7$  NK totales.

En la Figura 7, se muestran los *dot-plots* representativos para las expansiones de las muestras de los donantes 1, 2 y 3 a día 0, 10 y 18 de experimento. En la muestra del donante 1 y 3 se observa un aumento significativo del porcentaje de células NK respecto al que se observaba a día 0 de experimento. Nuevamente se aprecia como con el transcurso de la expansión, las células NK expresan un mayor nivel de CD56 en su superficie (ver explicación Apartado 6). En los resultados del donante 2 no se observa una expansión significativa de las NK comparada con las demás poblaciones celulares, lo cual puede haberse debido a un deficiente aislamiento de las células T en este caso concreto, pues representan la población celular más grande de la muestra.

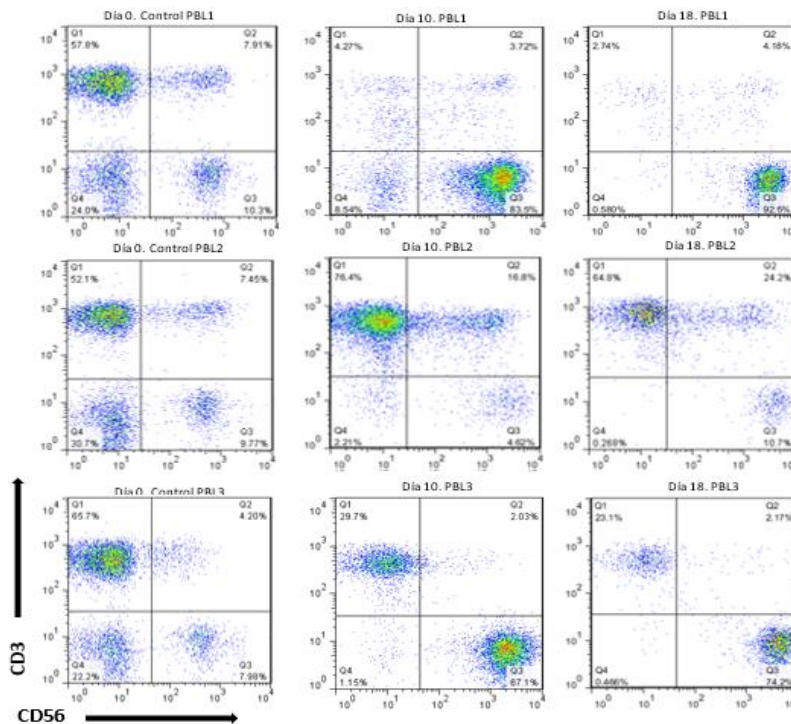


Figura 7 Gráficas de citometría de flujo mostrando los porcentajes de las distintas poblaciones celulares según la expresión de CD3 y CD56: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>).

## 5.2 Aislamientos celulares con técnica inmunomagnética

Como se explica en el apartado 4.2.2, a día 0 y día 18 de experimento se llevaron a cabo una selección negativa y una positiva de células NK respectivamente. En este trabajo de fin de grado se pretende comparar la eficacia obtenida en los aislamientos celulares de dos kits de aislamiento inmunomagnético procedentes de las casas comerciales *Miltenyi* y *Stem Cell*. Ambos productos se basan en la misma técnica, sin embargo, los protocolos a seguir son distintos, así como la composición de los kits. Los aislamientos se llevaron a cabo a partir de las mismas muestras iniciales de *buffy coats* de los distintos donantes.

### • 5.2.1 Selección negativa- Eliminación parcial de células T

Utilizando anticuerpos anti-CD3 conjugados con partículas paramagnéticas, se procedió a la eliminación parcial de las células CD3+ a día 0 de experimento, principalmente de los linfocitos T, que son los predominantes en la muestra inicial.

En los siguientes gráficos se comparan los porcentajes de células T, NK y NKT tras este primer aislamiento con los kits de *Stem Cell* y *Miltenyi*, con el fin de observar con cuál de los dos productos se consigue una eliminación más eficaz de las células T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>). Debido a que el objetivo principal de este punto del proceso es la reducción de los linfocitos T en cultivo, se analizarán principalmente las columnas de resultados referentes a esta población celular.

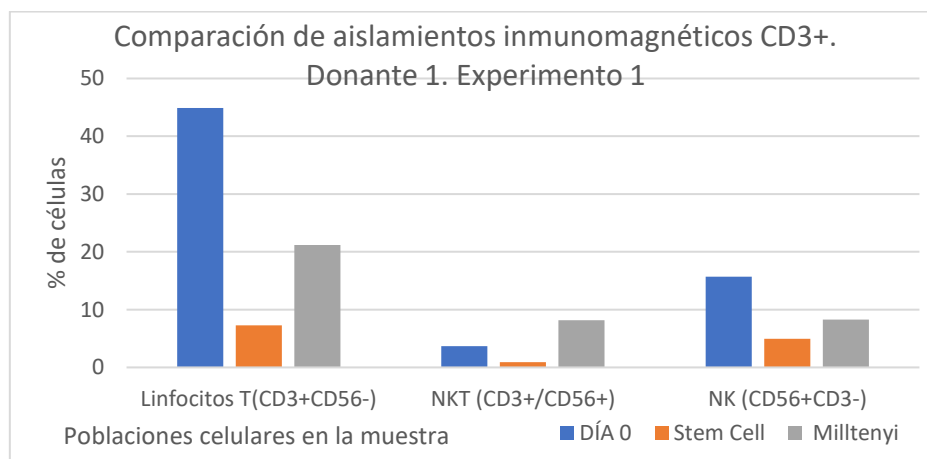


Figura 8. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Linfocitos T, NKT y NK) del donante 1 del experimento 1 tras el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD3. Se representan los resultados obtenidos para el kit de *Stem Cell* (naranja) frente a los obtenidos para el kit de *Miltenyi* (gris). En azul se muestran los porcentajes celulares previos al aislamiento.

Atendiendo a las primeras columnas de la gráfica, podemos observar como el aislamiento con el kit de *Stem Cell* ha sido más eficaz, pues se parte de un 44.9% de linfocitos T (*control*) y se consigue reducir hasta un 7.28%, mientras que con el kit de *Miltenyi* la población celular en cuestión se consigue reducir hasta un 21,2% del total. Por tanto, en este caso el kit de aislamiento *Stem Cell* ha resultado ser más efectivo en la reducción de la población de células CD3+CD56-.

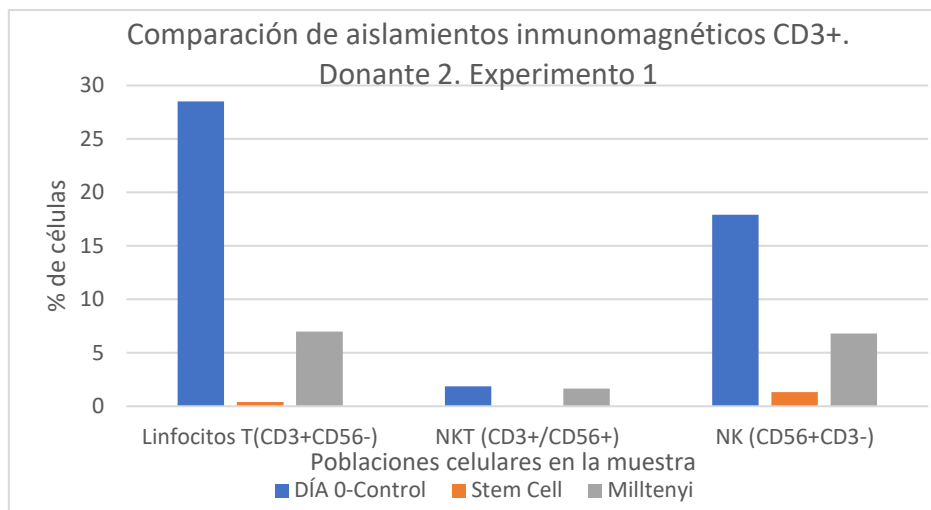


Figura 9. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Linfocitos T, NKT y NK) del donante 2 del experimento 1 tras el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD3. Se representan los resultados obtenidos para el kit de *Stem Cell* (naranja) frente a los obtenidos para el kit de *Miltenyi* (gris). En azul se muestran los porcentajes celulares previos al aislamiento.

En la Figura 9, se observa nuevamente una mayor eficacia en la eliminación de los linfocitos T llevada a cabo con el kit de *Stem Cell*, pasando de un 28.5% a un 0.4% de células T, tras el aislamiento. Por otro lado, con el kit de *Miltenyi* se consigue una reducción menos efectiva, aunque significativa de los linfocitos T (6.99% de linfocitos T).

En los dos gráficos anteriores (Figura 8 y 9) se presentan los resultados para el experimento 1. Los datos control fueron medidos a día 0 de experimento mientras que los datos tras el aislamiento fueron obtenidos a día 5 de experimento después de 4 días en cultivo, debido a motivos de planificación temporal. Esta puede ser una de las razones por las que se observa una disminución significativa de la población de células NK en ambos donantes frente al porcentaje de la muestra a día 0, pues a día 5 las células *natural killer* suelen disminuir en número debido a que se encuentran en un periodo de adaptación fisiológico al medio (ver apartado 5.1.1).

Por otro lado, en el experimento 2, tanto los análisis de la muestra control como los de las muestras tras el aislamiento, fueron llevados a cabo a día 0 de experimento, por lo que, en los resultados presentados a continuación, no se observa una disminución de la población de células NK respecto a la muestra original.

En la Figura 10 se puede observar como para el donante 1 del experimento 2 ha habido una mayor eficiencia en la eliminación de linfocitos T con el kit de *Miltenyi* (2.52% de células T), aunque con el kit de *Stem Cell* también se ha conseguido disminuir la población celular significativamente desde un 57.1% en la muestra original hasta un 16.3% tras el aislamiento. Cabe señalar que este ha sido el único dato registrado en los aislamientos inmunomagnéticos CD3+ en el que la eliminación de linfocitos T ha sido más efectiva e con el producto de la casa comercial *Miltenyi* que con el kit de *Stem Cell*.

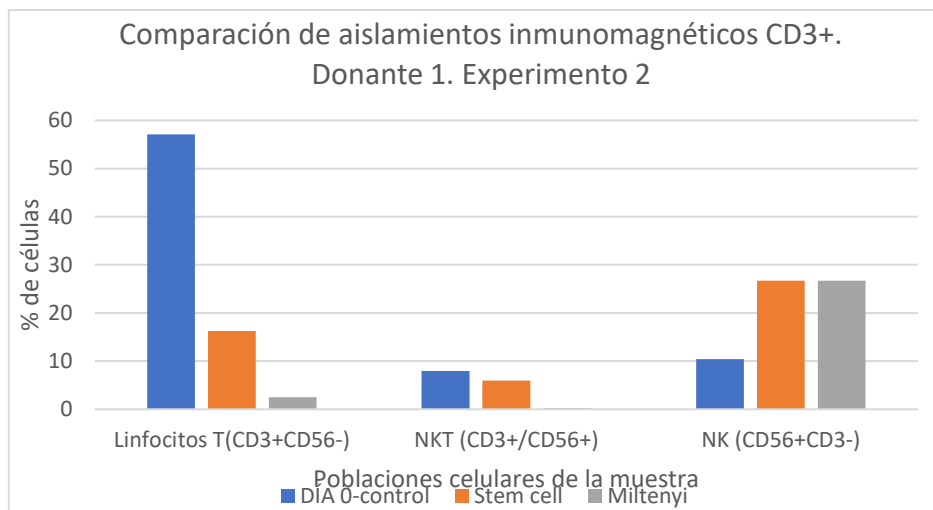


Figura 10. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Linfocitos T, NKT y NK) del donante 1 del experimento 2 tras el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD3. Se representan los resultados obtenidos para el kit de *Stem Cell* (naranja) frente a los obtenidos para el kit de *Miltenyi* (gris). En azul se muestran los porcentajes celulares previos al aislamiento.

En la Figura 11 se muestran los resultados del donante 2 del experimento 2. Una vez más se observa cómo es más efectiva la eliminación de células T llevada a cabo por el kit de *Stem Cell*. La diferencia obtenida entre la utilización de los dos productos comerciales es bastante significativa en esta ocasión, pues con *Stem Cell* se consigue una disminución de un 50% aproximadamente, mientras que con el kit de *Miltenyi* tan solo se consigue una disminución de linfocitos T del 15% con respecto a la muestra control.

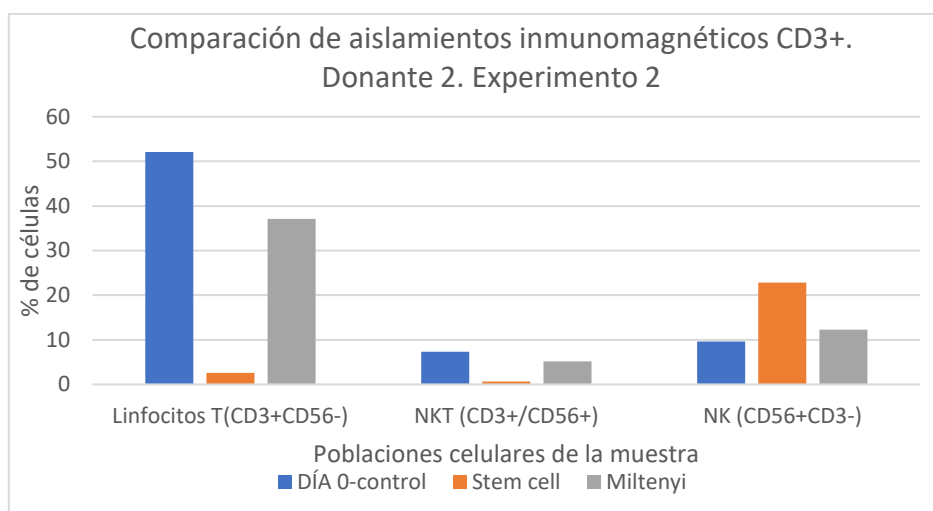


Figura 11. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Linfocitos T, NKT y NK) del donante 2 del experimento 2 tras el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD3. Se representan los resultados obtenidos para el kit de *Stem Cell* (naranja) frente a los obtenidos para el kit de *Miltenyi* (gris). En azul se muestran los porcentajes celulares previos al aislamiento.

Por último, en la Figura 12, se muestran los resultados del aislamiento con los anticuerpos anti-CD3 para la muestra del donante 3 del experimento 2. En ellos se puede observar cómo la eliminación de linfocitos T con los dos kits inmunomagnéticos, ha sido muy similar en cuanto a la eficiencia del aislamiento. Sin embargo, el kit de *Stem Cell*, vuelve a mostrar un mejor resultado pues ha conseguido eliminar un 3.9% más de linfocitos T de la muestra.

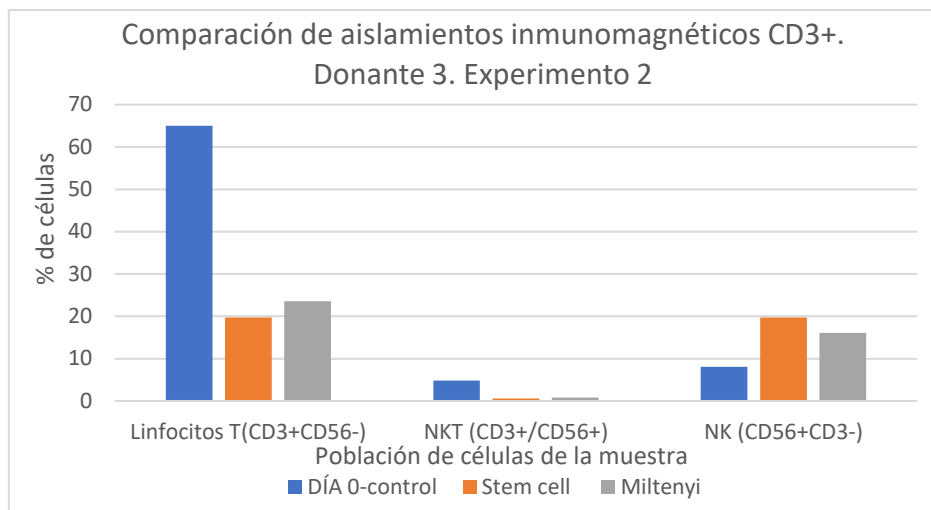


Figura 12. Porcentaje de las distintas poblaciones celulares (Linfocitos T, NKT y NK) del donante 3 del experimento 2 tras el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD3. Se representan los resultados obtenidos para el kit de *Stem Cell* (naranja) frente a los obtenidos para el kit de *Miltenyi* (gris). En azul se muestran los porcentajes celulares previos al aislamiento.

- **5.2.2 Aislamiento positivo de células NK**

Este segundo aislamiento consiste en la selección positiva de células NK empleando anticuerpos específicos anti-CD56, lo que implica que las células CD56<sup>+</sup>(NK y NKT) quedarán unidas a la columna magnética mientras que en el eluido encontraremos el resto de poblaciones celulares. Al llevar a cabo el experimento con el kit de la casa comercial *Miltenyi*, se obtuvieron resultados positivos, pues se consiguió enriquecer la muestra en células NK como se mostrará más adelante en la *Figura 13*. Sin embargo, al utilizar el kit de la casa comercial *Stem Cell* siguiendo el protocolo indicado, y al analizar la muestra que debía contener las células NK y NKT en el citómetro de flujo, no se observó ninguna población celular. Este resultado negativo llevó al análisis del eluido para observar su composición.

Al hacer el marcaje de esta muestra y realizar el estudio, se observó que en él se encontraban todas las poblaciones celulares, tanto los linfocitos T restantes, como las células NKT y las células NK. En el caso de que el kit hubiese funcionado de manera correcta, tanto las células *natural killers* como las células NKT, deberían haber quedado unidas a los anticuerpos y por tanto, la mayoría de ellas deberían detectarse en el extracto.

A continuación, se muestran los resultados en forma de dot-plots que se obtuvieron al analizar las muestras tras un marcaje con anticuerpo anti-CD3 conjugado con FITC y un anticuerpo anti-CD56 marcado con APC, para los donantes 1,2 y 3 del experimento 2.

Como puede comprobarse en la *Figura 13*, el kit de aislamiento de células NK de la casa comercial *Miltenyi*, proporciona resultados positivos, pues se observa un aumento y un enriquecimiento de las células NK en el extracto tras en el aislamiento en la muestra de los tres donantes. En el donante 1, las células NK pasan de conformar un 92.5% a un 96.4% de las células totales de la muestra. En el caso del donante 2, el aumento de células NK es más significativo aún, aumentando en una proporción de 26.9% respecto al control. Por último, se observa que en la muestra del donante 3, también ha habido un enriquecimiento significativo de las células de interés pasando de un 74,2% de las células totales a conformar un 93,1% de la muestra.

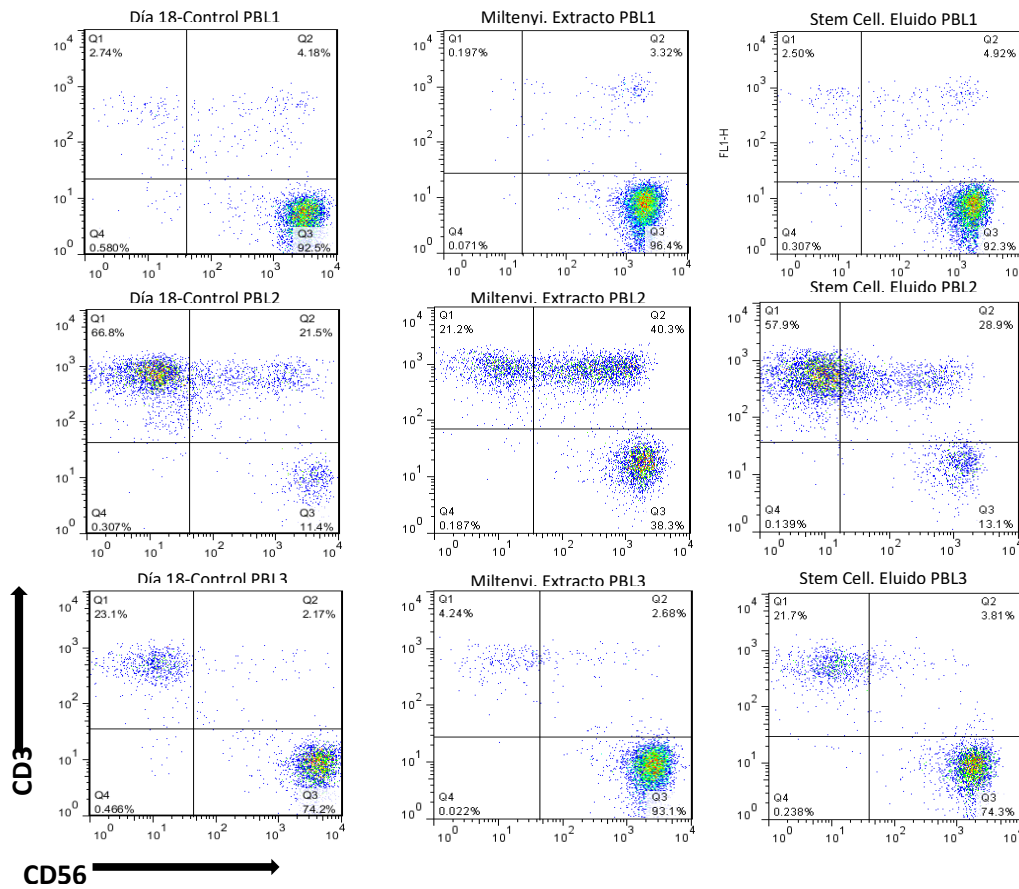


Figura 13. Gráficas de citometría de flujo mostrando los porcentajes de las distintas poblaciones celulares según la expresión de CD3 y CD56: linfocitos T ( $CD3^+CD56^-$ ), células NKT ( $CD3^+CD56^+$ ) y células NK ( $CD3^-CD56^+$ ). Como control, se muestran los resultados del día 18 antes del aislamiento. En segundo lugar, se observan los resultados positivos obtenidos con el kit de aislamiento  $CD56^+$  de *Miltenyi*. Por último, se observa el análisis del eluido obtenido con el kit de *Stem Cell*.

Por otro lado, tras obtener resultados nulos al analizar el extracto obtenido con el kit de *Stem Cell*, se procedió al análisis del eluido, como bien se ha explicado al inicio de este apartado. Los resultados obtenidos al analizar las distintas muestras en el citómetro de flujo concuerdan con la composición observada en el control, lo cual indica que no se ha producido ningún aislamiento significativo de las células NK por parte de los anticuerpos anti- $CD56$  del kit comercial (Figura 13).

Para ejemplificar los resultados negativos obtenidos con este kit de aislamiento, podemos atender a los dot-plots del donante 1 en la Figura 13. Si hacemos una comparación entre el porcentaje de células ( $CD56^+CD3^-$ ) en la muestra control y en el eluido (*Stem Cell. Eluido PBL1*), observamos que este es prácticamente idéntico en ambos casos. Las dos muestras contienen aproximadamente un 92% de células NK con respecto al total de la muestra, lo que confirma que no ha habido aislamiento y que todas las células NK de la muestra control están presentes en el eluido en vez de en el extracto.

- 5.2.3 Cambios en el protocolo de aislamiento inmunomagnético CD56+ de *Stem Cell*.

En vista de los resultados obtenidos al llevar a cabo el aislamiento inmunomagnético con anticuerpos anti-CD56 de la casa comercial *Stem Cell*, se procedió a analizar el protocolo establecido, observando si era posible realizar alguna modificación en algún punto del proceso.

En el protocolo detallado en el apartado 4.2.4 se indica que la incubación de la muestra con el cocktail de anticuerpos debe ser de tan solo de 3 minutos, frente a los 15 minutos que se indican en el protocolo de aislamiento del kit de *Miltenyi*. Por tanto, se repitió el proceso con el kit de *Stem Cell*, pero en este caso tanto los tiempos de incubación como los distintos tiempos de espera a lo largo del proceso de aislamiento con el kit de *Stem Cell* se aumentaron de 3 a 15 minutos. Este nuevo ensayo solamente se llevó a cabo para la muestra del donante 2. Los resultados obtenidos se presentan a continuación.

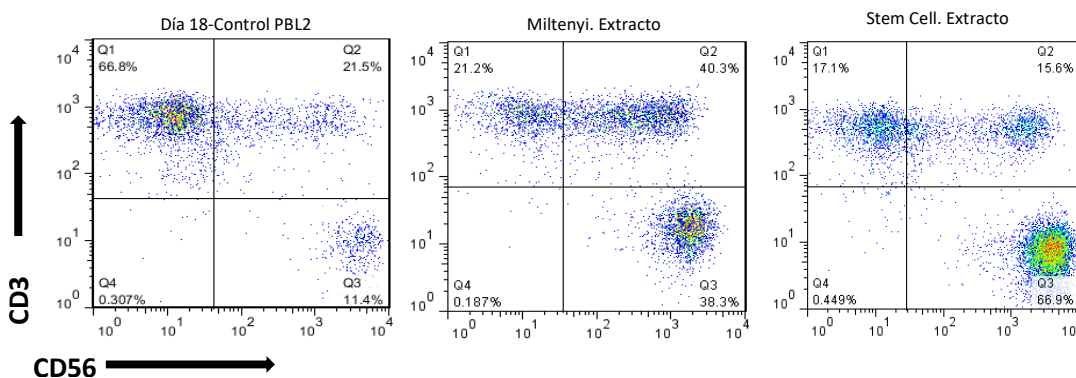


Figura 14. Gráficas de citometría de flujo mostrando los porcentajes de las distintas poblaciones celulares según la expresión de CD3 y CD56: linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Se representan las poblaciones celulares obtenidas tras el aislamiento con el kit de *Miltenyi* y con el kit de *Stem Cell* tras la modificación del protocolo.

En primer lugar, se muestra el dot-plot previo al aislamiento a día 18 de experimento usado como control. A continuación, se observa la composición de la muestra tras el aislamiento con los anticuerpos anti-CD56 del kit de *Miltenyi*. Por último, se observan los resultados obtenidos tras la modificación del protocolo de aislamiento del kit de *Stem Cell*.

Tras la modificación del protocolo, se detectan células NK en el extracto, por lo que ha habido una mejora con respecto al protocolo original. Se ha conseguido un aumento del porcentaje de células NK, desde un 11.4% (antes del aislamiento) a un 13.1%. Sin embargo, la efectividad es mucho menor que la obtenida con el kit de *Miltenyi* con el que se consigue enriquecer la muestra final en células NK hasta un 38.3% con respecto al total de células.

Al tratarse de un aislamiento con anticuerpos anti-CD56, también debería producirse un enriquecimiento de la muestra en células NKT, pues expresan CD56 en su membrana. Estas células se muestran en el cuadrante superior derecho. Con ambos kits se consigue aumentar el porcentaje de esta población celular respecto al control a día 18 antes de aislar, sin embargo, la eficiencia del kit de *Miltenyi*, vuelve a ser mayor llegando a duplicar el porcentaje de estas células respecto a la muestra inicial (de 21.5% a 40.3% de NKT).

## 6.DISCUSIÓN

El uso de células NK en la terapia contra el cáncer se ha planteado como una alternativa al uso de fármacos convencionales, por su efectiva capacidad citotóxica frente a tumores de mal pronóstico y resistentes a quimioterápicos convencionales.

Se estima que, para tratar a un paciente de una neoplasia hematológica, se requieren  $50 \cdot 10^6$  células NK/kg. Para conseguir esta cantidad de células, hasta día de hoy, se partía de un pool de distintos donantes, sin embargo, con la potente tasa media de expansión conseguida en estos ensayos, se podrían conseguir suficientes *natural killer* a partir de un solo donante. Teniendo en cuenta que para las expansiones mostradas en el ensayo se partía de varios mililitros de sangre del donante, se calcula que a partir de medio litro de sangre podríamos obtener suficientes células NK para tratar a un paciente medio adulto de 70 kg con leucemia linfocítica crónica de células B.

En cuanto al patrón de expansión de las células NK, en la mayoría de los casos, esta población celular sufre una disminución en número a día 5 de experimento debido al tiempo necesario de adaptación fisiológico al medio antes de comenzar a proliferar. Además, a partir del día 10 suelen mostrar una proliferación gradual hasta alcanzar el máximo a día 18 de experimento. Sin embargo, no se puede determinar un patrón generalizado de la expansión de células NK con el estudio de tan solo 5 donantes.

Por otro lado, atendiendo a la representación gráfica de los resultados, el número total de células NK y NKT alcanzadas depende en gran medida del donante del que proceda la muestra, pues no siempre se observa una relación directamente proporcional entre el número inicial de células en el *buffy coat* y las obtenidas al finalizar la expansión. Por ejemplo, si atendemos a los resultados del experimento 2 (*Apartado 5.1.2*), se observa que el donante 2 presenta mayor cantidad de células NK a día 0 que el donante 1, sin embargo, a día 18 se registran  $1,89 \cdot 10^7$  células NK totales para el donante 1, mientras que a partir del donante 2 tan solo se obtiene  $7,79 \cdot 10^6$  NK totales.

Tal y como se describe en la introducción, se pueden distinguir dos poblaciones de células NK atendiendo al fenotipo: Las CD56<sup>dim</sup> y las CD56<sup>bright</sup>. Como puede observarse en las Figuras 3 y 7, se han producido cambios en el fenotipo de las células NK. A día 0 la mayoría de las células *natural killer* pertenecen a la subpoblación NK CD56<sup>dim</sup>, mientras que conforme avanza el tiempo, las células de interés son en su mayoría CD56<sup>bright</sup>. Esto se debe a que el nivel de expresión de CD56 en la superficie de las células NK, aumenta durante la expansión y activación de las mismas, por lo que las poblaciones celulares en cuestión se observan cada vez más desplazadas a la derecha en el *dot-plot* obtenido por citometría de flujo.

Otro de los objetivos de este trabajo de fin de grado, consiste en comparar la eficiencia de dos kits de aislamiento celular inmunomagnéticos procedentes de las casas comerciales *Stem Cell* y *Miltenyi*. Como puede observarse en el apartado 5.2.1, los resultados indican que la eliminación parcial de linfocitos T es más eficiente con el kit de *Stem Cell*, pues en la gran mayoría de los casos, se consigue reducir significativamente la población celular, llegando a alcanzar en algunas ocasiones un porcentaje próximo al 0%. Con el kit de aislamiento de *Miltenyi* también se consigue una eliminación eficiente de los linfocitos T, sin embargo, en 4 de los 5 aislamientos



llevados a cabo, el porcentaje de estas células respecto al total es más significativo que en las muestras en las que se ha usado el producto de *Stem Cell*.

Por otro lado, al analizar los resultados obtenidos para el aislamiento positivo de células NK con los kits de las mismas dos casas comerciales anteriormente descritas, no solo se muestra mayor eficiencia por parte del kit inmunomagnético de *Miltenyi*, sino que siguiendo el protocolo indicado por *Stem Cell* para su producto, no se consigue aislar ninguna célula. Como se muestra en el apartado de resultados, todas las poblaciones celulares se detectaron en el eluido, a pesar de que las células CD56+ deberían haber quedado retenidas en la columna, debido a su unión a los anticuerpos anti-CD56 conjugados a partículas magnéticas.

Tras la obtención de estos resultados, se comparó el protocolo de aislamiento de *Stem Cell* con el de la casa comercial *Miltenyi* y se planteó la hipótesis de que probablemente los tiempos de incubación de 3 minutos indicados por *Stem Cell*, no fuesen suficientes para que el anticuerpo pudiese unirse al antígeno específico, por lo que se llevó a cabo un nuevo ensayo de aislamiento con una ligera variación. Se modificó el protocolo de la casa comercial *Stem Cell*, aumentando los tiempos de espera y de incubación de 3 a 15 minutos.

A pesar de que, como se muestra en la *Figura 14*, se obtuviesen resultados positivos con el kit de *Stem Cell* tras aumentar los tiempos de incubación, el enriquecimiento de la muestra en células NK no es suficiente comparado con el obtenido con el kit de aislamiento de *Miltenyi*.

Se observa que, tras la modificación del protocolo, los anti-CD56 retienen a las células NK, pero también a los linfocitos T de forma inespecífica, por lo que, la muestra final tras el aislamiento posee una composición de poblaciones celulares muy similar a aquella previa al aislamiento.

En definitiva, no solo no se puede afirmar que el aumento de los tiempos de incubación de la muestra con el anticuerpo resulten en una mayor afinidad de los anticuerpos por los CD56 expresados en la superficie celular, sino que es probable que la modificación del protocolo además, provoque una disminución en la especificidad de los anti-CD56. Sin embargo, teniendo en cuenta que esta modificación del protocolo tan solo se llevó a cabo con la muestra de un donante, no se pueden establecer conclusiones determinantes sobre la falta de especificidad del anticuerpo anti-CD56 de *Stem Cell*. Por tanto, para confirmar los resultados obtenidos, sería necesario repetir el ensayo incluyendo la modificación del protocolo con muestras de más donantes.

El tiempo necesario para que la unión antígeno-anticuerpo alcance el equilibrio depende de tres parámetros: la constante de asociación ( $k_a$ ), la constante de disociación ( $k_d$ ) y la concentración de anticuerpo usado (C)[19]. Se deduce que la casa comercial *Stem Cell* ha llevado a cabo un estudio determinando que el tiempo requerido por los anticuerpos del kit, para alcanzar el equilibrio es de 3 minutos solamente, por lo que la modificación de este parámetro en el protocolo no tendría que suponer una mejora en el aislamiento celular.

Atendiendo a los resultados obtenidos con el kit de aislamiento positivo de células NK de *Stem Cell*, se piensa que los fallos observados tampoco se deben al parámetro de concentración de anticuerpo utilizado, sino a los parámetros relacionados con la afinidad de dichos anticuerpos, por lo que puede que sea necesario llevar a cabo un análisis más detallado de su afinidad por los CD56 en presencia de otras células y antígenos, con el fin de mejorar la calidad del producto.

## 7. CONCLUSIONES /CONCLUSIONS

- **7.1** Se ha conseguido la expansión y activación de células NK humanas en presencia de citoquinas IL-2 e IL-15 y de células estimuladoras 721.221 a partir de *buffy coats* de donantes sanos.
  - **7.2** Durante la expansión y activación de las células NK, se ha detectado un aumento en el nivel de expresión de CD56, de forma que a día 0 de experimento, las células son NK CD56<sup>dim</sup> mientras que a día 10 y 18 de experimento, las NK obtenidas son mayoritariamente CD56<sup>bright</sup>.
  - **7.3** El kit de aislamiento inmunomagnético de la casa comercial *Stem cell* presenta mayor eficiencia en la eliminación de linfocitos T de la muestra que el kit de aislamiento de la casa comercial *Miltenyi*.
  - **7.4** El kit inmunomagnético de la casa comercial *Miltenyi* es más eficiente en el aislamiento positivo de células NK que el kit de la casa comercial *Stem Cell*.
  - **7.5** Se ha modificado el protocolo de aislamiento del kit de *Stem Cell*. Aumentando los tiempos de incubación de los anticuerpos anti-CD56 con la muestra de 3 minutos a 15 minutos, se ha obtenido mayor afinidad de dichos anticuerpos por las células NK, aunque la unión antígeno-anticuerpo no es suficientemente específica, ya que también se ha producido el aislamiento de células que no expresan CD56 en su superficie. Sin embargo, al haber realizado la prueba de aumento del tiempo de incubación tan solo con un donante, no se puede concluir con certeza sobre la falta de especificidad del anticuerpo.
- 
- **7.1** The expansion and activation of human NK cells has been achieved in presence of cytokines IL-2 and IL-15 and of stimulator cells 721.221. These NK cells have been obtained from *buffy coats* of healthy donors.
  - **7.2** During the expansion and activation of the NK cells, an increase of the expression level of CD56 has been detected. At day 0 of the experiment, the majority of the NK cells were CD56<sup>dim</sup>, while at day 10 and 18, most of the NK cells obtained were CD56<sup>bright</sup>.
  - **7.3** The immunomagnetic cell isolation kit from *Stem Cell* is more efficient in the removal of T lymphocytes than the kit from *Miltenyi*.
  - **7.4** The immunomagnetic cell isolation kit from *Miltenyi* is more efficient in the specific isolation of NK cells than the kit from *Stem Cell*.
  - **7.5** The protocol of the NK isolation kit from *Stem Cell* has been modified. When antibodies incubation periods are increased from 3 to 15 minutes, a higher binding affinity of this antibodies anti-CD56 to NK cells has been obtained, although this binding is not specific enough, as cells with no CD56 expression levels have also been isolated from the sample. Nevertheless, as this protocol variation has only been tried with one donor's sample, no resounding statements can be made about the lack of specificity of the antibody.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Kindt, T., Goldsby, R. and Osborne, B. (2007). *Kuby immunology*. New York: W.H. Freeman and Company.
2. Anel, A. et al. (2012). Protein Kinase C- $\theta$  (PKC- $\theta$ ) in Natural Killer Cell Function and Anti-Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 3.
3. Robertson, M. and Ritz, J. (1990). Biology and Clinical Relevance of Human Natural Killer Cells. *The Journal of The American Society of Hematology*, 76, pp.2421-2438.
4. Cooper, M., Fehniger, T. and Caligiuri, M. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*, 22(11), pp.633-640.
5. Michel, T. et al. (2016). Human CD56brightNK Cells: An Update. *The Journal of Immunology*, 196(7), pp.2923-2931.
6. Abbas, A., Lichtman, A. and Pillai, S. (2015). *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders, pp.66-70.
7. Smyth, M. et al (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42(4), pp.501-510.
8. Martinez-Lostao, L., Anel, A. and Pardo, J. (2015). How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells?. *Clinical Cancer Research*, 21(22), pp.5047-5056.
9. Sánchez-Martínez. et al. (2016). Activated Allogeneic NK Cells Preferentially Kill Poor Prognosis B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *Frontiers in Immunology*, 7.
10. Podhorecka, M. et al. (2016). Deregulation of Apoptosis - Is it Still an Important Issue in Pathogenesis of Chronic Lymphocytic Leukemia?. *Current Cancer Drug Targets*, 16(8), pp.652-658.
11. Keating, M. et al. (2005). Early Results of a Chemoimmunotherapy Regimen of Fludarabine, Cyclophosphamide, and Rituximab As Initial Therapy for Chronic Lymphocytic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23(18), pp.4079-4088.
12. Parry, H. et al. (2016). NK cell function is markedly impaired in patients with chronic lymphocytic leukaemia but is preserved in patients with small lymphocytic lymphoma. *Oncotarget*.
13. Cho, D. and Campana, D. (2009). Expansion and Activation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 29(2), p.89.
14. Voshol, H. et al.(1993). Human natural killer cells: a convenient purification procedure and the influence of cryopreservation on cytotoxic activity. *Journal of Immunological Methods*, 165(1), pp.21-30.
15. Miltenyibiotec.com. (2017). *CD56+CD16+ NK Cell Isolation Kit, human - Miltenyi Biotec*. [online]
16. Schmeel, L. et al. (2014). Cytokine-induced killer (CIK) cells in cancer immunotherapy: report of the international registry on CIK cells (IRCC). *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 141(5), pp.839-849.
17. Van Kaer, L. and Joyce, S. (2005). Innate Immunity: NKT Cells in the Spotlight. *Current Biology*, 15(11), pp.R429-R431.
18. Robertson, F., Berzofsky, J. and Terabe, M. (2014). NKT Cell Networks in the Regulation of Tumor Immunity. *Frontiers in Immunology*, 5.
19. Andersson, K. (2017). Antibody-antigen interactions: What is the required time to equilibrium?. *Naturepreceedings*.