



Universidad
Zaragoza



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Facultad de Ciencias (Universidad de Zaragoza)

Año 2022

TRABAJO FIN DE GRADO

Células NK para el tratamiento del Mieloma Múltiple. Efecto del Dinaciclib

NK-cells for Multiple Myeloma treatment. Dinaciclib effects

Autora:

Nuria Sancho Camón

Directores:

Luis Alberto Anel Bernal

David GiralDOS Jiménez

Agradecimientos

Me gustaría empezar agradeciendo a David GiralDOS, por su ayuda, paciencia y compañía durante todos estos meses de trabajo. Gracias por todo lo que me has enseñado y por hacerme más ameno el trabajo. Siempre es un placer conocer y trabajar con personas como tú.

Me gustaría agradecer también a Alberto Anel, por darme la oportunidad de conocer el trabajo de la investigación y realizar el Trabajo de Fin de Grado bajo su tutela. Así mismo, agradecer al resto de compañeros del Departamento y grupo de investigación, por su ayuda prestada y compañerismo.

Finalmente, agradecer a todas aquellas personas que han estado conmigo durante los 4 años de carrera. En primer lugar, a mi familia, por el apoyo recibido, la confianza y la atención prestada. En segundo lugar, al grupo de amigos tan espontáneo y natural creado en el Grado de Biotecnología. Y en último lugar, agradecer a las personas sin las cuales no habría sido posible todo este trabajo realizado: a mis compañeros y amigos de residencia y piso durante toda mi etapa en Zaragoza. Gracias por estar conmigo día a día, por aguantarme quejas y lloros, por sacar lo mejor de mí y, sobre todo, por crear una amistad tan sana y tan bonita, la cual jamás me habría imaginado.

Resumen

El mieloma múltiple (MM) es un tipo de cáncer hematológico que se caracteriza por la proliferación descontrolada de las células plasmáticas. Entre sus bases genéticas destacan la adquisición de hiperdiploidías y las traslocaciones que afectan al gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH), llevando a su sobreexpresión. Dado que ninguno de los tratamientos actualmente aprobados resulta completamente curativo, ha sido necesario el desarrollo de nuevas terapias para hacer frente a la gran heterogeneidad que presenta esta enfermedad. Entre ellas destaca Dinaciclib, un inhibidor de quinasa dependientes de ciclinas (CDK) que actúa desregulando el ciclo celular, o las terapias basadas en células NK.

Basándonos en resultados previos del grupo de investigación se planteó la idea de combinar las dos terapias nombradas para comprobar una posible sinergia resultante entre ellas. Se analizó la muerte celular producida al incubar dos líneas celulares de MM tratadas con Dinaciclib a distintas concentraciones junto a células NK-92-CD16 a distintos ratios de células efectoras-diana y tiempos de incubación. Para potenciar el efecto citotóxico de las células efectoras se adicionó Daratumumab, un anticuerpo monoclonal anti-CD38 aprobado para el tratamiento del MM.

Los resultados obtenidos muestran que las células NK-92-CD16 ejercen por sí mismas un potente efecto citotóxico que aumenta al añadir Daratumumab. Aunque en algunos casos se observa una tendencia hacia una mayor citotoxicidad al combinar Dinaciclib con las células NK-92-CD16, los efectos no llegaron a ser estadísticamente significativos. Estos efectos se contrastaron en muestras primarias de pacientes de MM. También se observó que, ante una recaída de la enfermedad, estos se volvían más resistentes a los tratamientos con células NK-92-CD16. Aunque las condiciones ensayadas no llegan a generar sinergia, no se descarta que otras combinaciones de quimioterapia con células NK puedan lograrlo.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is a type of hematological cancer characterized by uncontrolled proliferation of plasma cells. Among its genetic bases, the acquisition of hyperdiploidies and the translocations that affect the immunoglobulin (IgH) heavy chain gene stand out, leading to its overexpression. Since none of the currently approved treatments is completely curative, it has been necessary to develop new therapies to cope with the great heterogeneity that this disease presents. These include Dinaciclib, a cyclin-dependent kinase inhibitor (CDK) that acts by deregulating the cell cycle, or therapies based on NK cells.

Based on previous results of the research group, the idea of combining the two named therapies was raised to test a possible resulting synergy between them. Cell death produced by incubating two MM cell lines treated with Dinaciclib at different concentrations together with NK-92-CD16 cells at different ratios of effector-target cells and incubation times was analyzed. To enhance the cytotoxic effect of effector cells, Daratumumab, an anti-CD38 monoclonal antibody approved for the treatment of MM, was added.

The results obtained show that NK-92-CD16 cells exert by themselves a powerful cytotoxic effect that increases when adding Daratumumab. Although in some cases a trend towards greater cytotoxicity is observed when combining Dinaciclib with NK-92-CD16 cells, the effects did not become statistically significant. These effects were contrasted in primary samples from MM patients. It was also observed that, in the face of a relapse of the disease, they became more resistant to NK-92-CD16 treatments. Although the conditions tested do not generate synergy, it is not ruled out that other combinations of chemotherapy with NK cells can achieve this.

Índice

Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	3
Índice	4
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 El cáncer	6
1.1.1 Mieloma Múltiple	6
1.1.1.1 Bases moleculares y base genética del Mieloma Múltiple	7
1.1.1.2 Tratamiento del Mieloma Múltiple	7
1.1.1.2.1 Dinaciclib	8
1.1.1.2.2 Terapias basadas en células NK	9
1.1.1.2.3 Daratumumab	10
2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1 Líneas celulares	11
3.2 Materiales y medios de cultivo celular	11
3.3 Mantenimiento de cultivos celulares y determinación de su número y viabilidad	12
3.3.1 Mantenimiento de las líneas celulares NCI-H929 y U266	12
3.3.2 Mantenimiento de la línea celular NK-92-CD16	12
3.3.3 Determinación de la densidad y la viabilidad de los cultivos celulares	12
3.4 Congelación y descongelación de cultivos celulares	13
3.5 Extracción de PBMC a partir de aspirados de médula ósea	14
3.6 Determinación de la proliferación, citotoxicidad y apoptosis	14
3.6.1 Experimentos de citotoxicidad celular	15
3.6.2 Experimento con Daratumumab	16
3.6.3 Experimento con células primarias de pacientes de MM	16
3.6.4 Citometría de flujo	16
3.6.4.1 Marcaje celular con Anexina V para el análisis de la apoptosis	17
3.6.4.2 Análisis de la expresión de proteínas de membrana plasmática	17
3.6.4.2.1 Análisis de la expresión de CD38 en células de MM	17
3.6.4.2.2 Marcaje celular con el anticuerpo Anti-CD138	18
3.6.4.3 Análisis informático de los resultados	18
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1 Experimentos de citotoxicidad de las NK-92-CD16 combinadas con Dinaciclib	19
4.2 Proliferación celular con Dinaciclib	22
4.3 Combinación de Dinaciclib y ADCC	23

4.4 Ensayos sobre células de pacientes de MM	25
5. CONCLUSIONES	27
6. BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer

El término cáncer, tal y como se conoce comúnmente, engloba un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado o anormal de las células de cualquier parte del organismo. Puede surgir como consecuencia de la genética individual, el estilo de vida y la exposición a agentes cancerígenos del entorno. Generalmente las células cancerosas sufren mutaciones que las llevan a dividirse sin límite y perder la capacidad para morir, dando lugar a grandes masas corporales conocidas como tumores o neoplasias. Sin embargo, algunos cánceres, como los de origen sanguíneo, no forman tumores sólidos (1).

En España, los cánceres más frecuentemente diagnosticados son los de colon, recto, próstata, mama, pulmón y vejiga urinaria. Además, en estos últimos 20 años el número de tumores diagnosticados ha crecido exponencialmente debido a las técnicas de detección precoz y aumento de la esperanza de vida de la población. Paralelamente, el riesgo de mortalidad por cáncer ha disminuido gracias al desarrollo de nuevas terapias altamente efectivas (2).

Aunque algunos tipos de cánceres puedan presentar similitudes, generalmente son muy distintos entre sí en cuanto al desarrollo, propagación y respuesta al tratamiento. Comúnmente, el cáncer se clasifica en dos categorías:

- Cáncer de tumor sólido, desarrollado en cualquier órgano o tejido, como el de mama o el de próstata.
- Cáncer hematológico o cáncer de la sangre, como la leucemia, los linfomas o el mieloma múltiple, del que se hablará a continuación (1,2).

1.1.1 Mieloma Múltiple

El mieloma múltiple (MM) es el segundo tipo de cáncer hematológico más común en países desarrollados y se caracteriza por la proliferación descontrolada y acumulación de células plasmáticas en la médula ósea. Este cáncer cuenta con una incidencia de 4,5-6 por cada 100.000 personas al año; en países del oeste de Europa, América del Norte o Australia la incidencia es mayor que en Asia o el África Subsahariana debido a la posible existencia de mejores técnicas de detección. Generalmente se diagnostica en personas de aproximadamente 70 años de edad sintomáticas y entre sus factores de riesgo destacan la genética, la obesidad, la inflamación crónica y la exposición a pesticidas, solventes orgánicos y radiación (3).

Las células plasmáticas, localizadas en la médula ósea, son uno de los principales componentes del sistema inmunitario. La función de estas células consiste en la secreción de inmunoglobulinas (anticuerpos) para hacer frente a diversas infecciones y enfermedades. En el MM, estas células se caracterizan por proliferar de manera descontrolada y sobreexpresar una inmunoglobulina monoclonal, también conocida como proteína monoclonal (proteína M) o paraproteína, que será diferente para cada tipo de MM. Como consecuencia de la acumulación de células plasmáticas en la médula ósea, esta enfermedad cursa con anemia, trombocitopenia y neutropenia. Así mismo, la aglomeración de células plasmáticas generada desencadena fracturas o destrucción del hueso, hipercalcemia y parálisis, entre las consecuencias más destacadas (3,4).

Aquellos pacientes que sufran los signos y síntomas característicos anteriormente nombrados y les sea identificada una elevada expresión de proteína M en sangre u orina, serán diagnosticados de MM. Además, existen evidencias de que esta enfermedad se desarrolla tras episodios de gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) o mieloma múltiple

indolente (SMM) (Figura 1), trastornos proliferativos premalignos de células plasmáticas que carecen de la sintomatología característica de los MM (3).

La MGUS se caracteriza por la presencia de un nivel bajo y estable de proteína M en el suero o la orina de un paciente con menos del 10% de células plasmáticas en la médula ósea. Generalmente se piensa que el MM está precedido de esta patología, presente en el 1% de los individuos adultos mayores de 25 años (5). Así mismo, el SMM es un estadio intermedio del desarrollo a MM que no sufren todos los pacientes y se caracteriza por una elevada proliferación de células plasmáticas, a diferencia de MGUS (6).

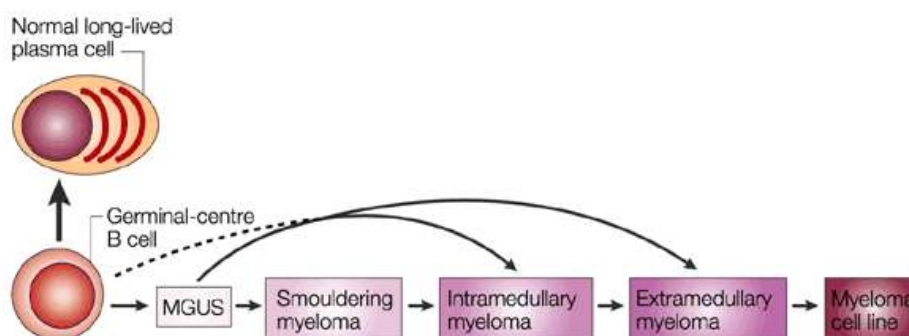


Figura 1. Estadios del MM. Imagen tomada de (5).

1.1.1.1 Bases moleculares y base genética del Mieloma Múltiple

A pesar de que las causas del MM no están claras, se estima que entre los eventos iniciales que conducen al desarrollo de la enfermedad tienen gran importancia la adquisición de hiperdiploidías (trisomías) o las translocaciones que incluyen el gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH, locus 14q32.3), como se indica en la Tabla 1 (3).

Tabla 1. Translocaciones más frecuentes en el MM y genes afectados. Tabla tomada de (3).

Translocación	Gen sobreexpresado	Proteína codificada
t(4;14)	Gen MMSET (NSD2)	Histona metiltransferasa
	Gen FGFR3	Receptor de crecimiento de fibroblastos 3
t(6;14)	Gen CCND3	Ciclina D3
t(11;14)	Gen CCND1	Ciclina D1
t(14;16)	Gen MAF	Factor de transcripción MAF
t(14;20)	Gen MAFB	Factor de transcripción MAFB

Las translocaciones señaladas desembocan en el desarrollo de oncogenes controlados por el promotor de IgH que provocan una desregulación del ciclo celular, proliferación descontrolada de las células y sobreexpresión de inmunoglobulinas (3). Cabe destacar que aproximadamente el 55-60% de los pacientes presentan un cariotipo hiperploide con trisomías en cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21) cuyo pronóstico tiende a ser mejor que el de los pacientes que sufren MM no hiperploide (7).

1.1.1.2 Tratamiento del Mieloma Múltiple

Entre los tratamientos actualmente aprobados para su uso clínico en pacientes con MM destacamos:

- Esteroides (Dexametasona, Prednisolona).
- Antraciclinas (Doxorubicina).
- Inhibidores de proteasoma (Bortezomib, Ixazomib).
- Inhibidores de histona-desacetilasas (Panobinostat).
- Fármacos inmunomoduladores o IMiDs.
- Anticuerpos monoclonales (Daratumumab, Isatuximab).

A pesar de que ningún tratamiento resulta completamente curativo o logra erradicar la enfermedad, en las últimas dos décadas se ha conseguido prolongar el tiempo de vida del paciente y disminuir la frecuencia de recaídas gracias a los nuevos tratamientos, sobre todo los inhibidores de proteasoma, los IMiDs y los anticuerpos indicados (3).

No obstante, las terapias más efectivas se basan en el trasplante autólogo de células hematopoyéticas (ASCT), aprobado en pacientes jóvenes y con buen pronóstico. Los expertos recomiendan someter a los pacientes a tratamientos combinados de fármacos (por ejemplo, bortezomib-talidomida-dexametasona) previos al ASCT. De hecho, existen ensayos en los que se ha demostrado que la adición de Daratumumab al tratamiento combinado de bortezomib-talidomida-dexametasona genera incluso mayores ratios de respuesta que sin el anticuerpo (3). Entre las futuras perspectivas anti-mieloma se encuentran también las terapias basadas en células CAR-T que tienen como diana el antígeno BCMA localizado en la superficie de las células plasmáticas y que actúa perpetuando el tiempo de vida de estas células (8).

Sin embargo, dada la gran heterogeneidad de la enfermedad y la adquisición de anomalías genéticas que impiden el correcto funcionamiento de los avances actuales, ha sido necesario el desarrollo de nuevas terapias con distinta diana y mecanismo de acción, como Dinaciclib (9).

1.1.1.2.1 Dinaciclib

Dinaciclib es un potente inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina (CDKs), una familia de serin/treonin quinasas que controlan la progresión del ciclo celular y cuya desregulación está relacionada con la proliferación incontrolada de células (9).

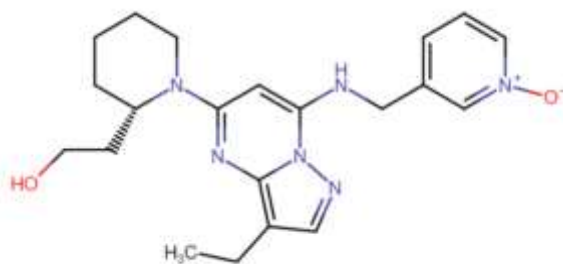


Figura 2. Molécula de Dinaciclib. *Imagen tomada de (10).*

Concretamente, Dinaciclib inhibe las quinasas CDK1, CDK2, CDK5 y CDK9, encargadas de regular el ciclo celular (CDK1, -2), controlar la polimerización de actina y función neuronal (CDK5), así como regular la RNA polimerasa II (CDK9) (11). Esta represión transcripcional resultante del tratamiento con Dinaciclib conduce a una desregulación de transcritos de RNA mensajero (mRNA) y proteínas como Mcl-1, miembro de la familia de proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, induciendo diferentes niveles de apoptosis (12).

Hay estudios que demuestran que el Dinaciclib tiene un IC₅₀ de concentración nanomolar para inhibir al 50% las CDK1, 2, 5 y 9 (9).

1.1.1.2.2 Terapias basadas en células NK

Además de los tratamientos nombrados en apartados anteriores, las terapias basadas en células natural killer (NK) han surgido como una solución prometedora contra el cáncer gracias a su potencial efecto citolítico y su sinergia con los tratamientos actuales (13).

Las células NK pertenecen a la familia de células del sistema inmunitario innato y se desarrollan en la médula ósea. Estas células se caracterizan por poseer citotoxicidad natural y ejercer una función antiviral y antitumoral, sobre todo sobre células que pierden la expresión de MHC-I (13).

Para ejercer su efecto citotóxico, las células NK deben discriminar entre las moléculas diana y las moléculas propias del organismo a través de un equilibrio de señales activadores e inhibitoras. Cuando los receptores de inhibición KIR de la membrana de las células NK interactúan con el complejo MHC-I se genera una señal inhibitoria que impide que la célula NK se active. En cambio, cuando una célula está estresada, como las células tumorales o infectadas, expresa en su superficie unos ligandos que son reconocidos por los receptores de activación KAR, NCR o NKG2D de las NK (14).

Si las señales de activación exceden a las de inhibición, las células NK se activarán y liberarán gránulos que contienen las proteínas con función citotóxica perforina y granzimas, que desencadenarán muerte celular por apoptosis. Las perforinas se encargan de formar poros en la membrana de las células diana a través de los cuales entrarán las granzimas e inducirán la apoptosis de la célula activando las caspasas (caspasa 3) y provocando la liberación mitocondrial del citocromo c o las moléculas inhibitoras de las proteínas inhibitoras de la apoptosis (IAP) (15). Así mismo, la secreción o presencia de Fas ligando (FasL) y TRAIL en la superficie de las NK promueve una vía alternativa a través de la apoptosis extrínseca para llevar a cabo su acción citolítica (16).

La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que le permite al organismo deshacerse de las células dañadas o infectadas que puedan interferir con un correcto desarrollo. Se caracteriza por la fragmentación oligonucleosomal, la fragmentación de la cromatina y la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la membrana de la célula apoptótica, y se ejecuta mediante dos vías:

- La vía extrínseca está regulada por la superfamilia de receptores TNF, que incluye TNFR, Fas y los receptores de TRAIL DR4 y DR5. La activación de estos receptores conduce a la estimulación de las caspasas 8 y 10, que seguidamente inducirán la caspasa 3, responsable del desmantelamiento celular.
- La vía intrínseca está regulada por proteínas de la familia Bcl-2 que, según su capacidad para inducir o inhibir la apoptosis, se clasifican en proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-B, Bcl-W y Bfl-1), proteínas proapoptóticas multidominio (Bax, Bak y Bok) y proteínas proapoptóticas BH3-only (Bim, Puma, Noxa, Bik, Bmf, Bad, Hrk y Bid).

Las alteraciones que sufren las células tumorales les confiere resistencia a los eventos apoptóticos por disminución de la expresión de las proteínas proapoptóticas y/o sobreexpresión de las antiapoptóticas (17).

Las células NK se caracterizan por presentar en su superficie CD56, una molécula que actúa como marcador molecular, y CD16, receptor de la fracción Fc de los anticuerpos a través del cual se induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o ADCC. Este mecanismo combina la inmunidad humoral con la inmunidad celular, desarrollándose al interactuar CD16 con la región Fc del anticuerpo unido a la célula diana, lo que provoca la activación de las células NK (18).

Debido a que el trabajo con células NK primarias muestra diversas limitaciones, muchos estudios han optado por utilizar la línea celular NK-92, derivada de un paciente con linfoma no Hodgkin, que además de tener una proliferación continua, carece de los receptores inhibitorios que reconocen MHC-I (19). Estas células carecen del receptor CD16, siendo incapaces de llevar a cabo la ADCC.

Por ese motivo, para sacarle partido a las terapias basadas en anticuerpos monoclonales el grupo de investigación generó, previamente a este trabajo, la línea celular NK-92-CD16 modificando genéticamente la línea parental NK-92 para que expresara dicho receptor. Esta nueva línea también ha sido modificada para expresar el fluoróforo verde ZsGreen (David Giraldo, Comunicación Personal)

1.1.1.2.3 Daratumumab

Daratumumab es un anticuerpo monoclonal tipo IgG1 κ completamente humanizado que ha sido aprobado por la FDA y la EMA como monoterapia en combinación de inhibidores de proteasoma y agentes quimioterápicos. Este anticuerpo tiene como diana la molécula de CD38 localizada en la superficie de las células plasmáticas. Su mecanismo de acción consiste en desencadenar la muerte de las células de MM por ADCC (13). Cabe destacar que, aunque la molécula de CD38 es un marcador molecular del MM, no solo se encuentra en la membrana de las células plasmáticas, sino también, aunque en menor medida, en otras células del sistema inmunitario, como las células NK. Esta circunstancia puede conducir en ciertos casos al fratricidio entre las células NK.

Similar al Daratumumab destacamos Isatuximab, un anticuerpo monoclonal quimérico de tipo IgG1 κ que también tiene como diana la molécula de CD38 y ha sido aprobado por la FDA, más recientemente, en combinación con pomalidomina en pacientes refractarios y en recaída (13).

2. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Como se ha comentado, actualmente existen varios tratamientos aprobados para la clínica del MM, pero ninguno ha conseguido erradicar completamente la enfermedad. A pesar de que los expertos recomiendan someter a los pacientes a tratamientos combinados de fármacos inhibidores de proteasoma (Bortezomib), esteroides (Dexametasona), IMiDs o anticuerpos monoclonales (Daratumumab), se requiere del desarrollo de nuevas terapias frente a distintas dianas.

Dinaciclib es un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) que ha demostrado provocar una desregulación en el ciclo celular de las células de MM que las conduce a la apoptosis

(9). Paralelamente, las terapias basadas en células NK han surgido como una solución prometedora contra el cáncer gracias a su elevado potencial citotóxico y la ADCC (13).

Según los antecedentes y dado que en el grupo se habían obtenido resultados prometedores en dos líneas de investigación que incluían Dinaciclib por un lado, y las células NK-92-CD16 por otro, se decidió combinar ambas terapias con el propósito de observar un posible efecto sinérgico entre ambas. Para ello, se establecieron los siguientes objetivos:

- Determinación de la muerte producida en líneas celulares de MM combinando Dinaciclib con las células NK-92-CD16.
- Dado que la ADCC aumenta la citotoxicidad de las células NK-92-CD16, repetir el estudio combinando ambos tratamientos en presencia de Daratumumab.
- Como la ADCC mediada por Daratumumab es dependiente de su diana CD38, monitorizar sus niveles de expresión en las células de MM.
- Realizar el mismo ensayo en muestras de pacientes para obtener resultados más próximos a la realidad clínica.
- En caso de producirse alguna diferencia al combinar los tratamientos, profundizar en sus posibles causas.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Líneas celulares

Para el presente Trabajo de Fin de Grado utilizamos las líneas celulares NCI-H929, U266 y NK-92-CD16, así como células primarias de pacientes de MM proporcionadas por el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

- NCI-H929: Línea celular productora de IgA κ establecida en 1986 a partir de un derrame pleural de una mujer con MM de 62 años de edad (20).
- U266: Línea celular de MM productora de IgE λ establecida en 1968 a partir de células plasmáticas de sangre periférica de un hombre de 53 años de edad (20).
- NK-92-CD16: Línea celular generada en el grupo de investigación modificando genéticamente la línea parental NK-92, derivada de un linfoma humano no Hodgkin (21) que carece de CD16. La producción de esta nueva línea celular tuvo como objetivo la expresión del receptor CD16 en la superficie de la línea parental NK-92 para permitir la ADCC.

3.2 Materiales y medios de cultivo celular

Para el cultivo de las líneas celulares de MM anteriormente nombradas se empleó medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco) suplementado con un 10% en volumen de Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco) y un 1% en volumen de antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Por otro lado, la línea celular NK-92-CD16 se mantuvo en medio MEM Alpha (Gibco) suplementado con 12,5% Suero Fetal Bovino (SFB, Gibco), 12,5% de Suero de Caballo (SC, Gibco), 1% de GlutaMAX™ (Gibco) y 1% de antibiótico (penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml, Sigma-Aldrich). Para las muestras primarias de MM se usó medio RPMI GlutaMAX™ (Gibco) con 10% de SFB de complementado y sin antibiótico.

A lo largo del ensayo los cultivos se mantuvieron en el incubador de CO₂ termostático (Heraeus HeraCell 150i, Thermo) a 37°C, con 5% de CO₂ y aire saturado de humedad.

Todas las manipulaciones de células se llevaron a cabo en la campana de flujo laminar vertical (Telstar Bio-II-A/P) y todo material localizado en su interior (material de vidrio, cajas de puntas de micropipetas, etc.) tuvo que ser esterilizado previamente en autoclave (Autester, Mod 4376, Selecta) durante 25 minutos a una presión de 1,2 atmósferas.

Durante el ensayo se manejó material de plástico estéril, como placas de 6, 12 y 96 pocillos y frascos de cultivo procedentes de la marca TPP, puntas de micropipetas, tubos criogénicos (CryoTube™ Vials, Thermo Scientific), tubos de fondo cónico (15 y 50 mL, Corning®), microtubos de 1,5 mL (Eppendorf) y pipetas serológicas (5, 10 y 25 mL, Corning Costar®).

Así mismo, se emplearon las centrifugas Beckman Coulter, Allegra® X-15R Centrifuge y Beckman Coulter, Microfuge® 16 Centrifuge.

3.3 Mantenimiento de cultivos celulares y determinación de su número y viabilidad

3.3.1 Mantenimiento de las líneas celulares NCI-H929 y U266

Las líneas celulares NCI-H929 y U266 son células que crecen en suspensión y se mantuvieron en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm² (TPP) con el medio anteriormente comentado. Los subcultivos periódicos de las líneas celulares se realizaron estableciendo una densidad celular de $1,5 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^5$ células por cada mililitro de medio.

De forma regular y con ayuda de un microscopio invertido (Nikon, Eclipse Ts2) se comprobó el estado morfológico de los cultivos.

3.3.2 Mantenimiento de la línea celular NK-92-CD16

El mantenimiento de estas células tuvo lugar en frascos de cultivo de 25 cm² o 75 cm² (TPP). Dado que esta línea celular crece formando agregados en suspensión, los frascos se dejaron de forma vertical para favorecer la agrupación celular sobre una cara con menor superficie.

Para los subcultivos, se recomienda mantener su densidad celular entre $2 \cdot 10^5$ y $5 \cdot 10^5$ células/mL, sin llegar a exceder las $8 \cdot 10^5$ células/mL. Por lo tanto, entre semana, los pases de mantenimiento se realizaban cada 48h y las células se diluían 1/3 del volumen total. De cara al fin de semana (72h sin manipulación), los viernes se efectuaban diluciones de 1/5 del volumen. Para mantener su proliferación y citotoxicidad en cada intervención se añadían 25 UI/mL de IL-2 por cada mililitro de medio de volumen total.

3.3.3 Determinación de la densidad y la viabilidad de los cultivos celulares

La densidad y la viabilidad de los cultivos celulares son parámetros que deben evaluarse de forma rutinaria en toda investigación que trabaje con ellos, como es el caso de este Trabajo de Fin de Grado.

El azul Trypan es un colorante que permite determinar la viabilidad celular gracias a su capacidad para penetrar en las células muertas cuya membrana plasmática se encuentre dañada;

es decir, este colorante no es capaz de teñir las células con la membrana intacta, como son las células vivas o las células apoptóticas primarias. A pesar de que la tinción con azul Trypan es un método subjetivo dependiente del operario, permite cuantificar de forma rápida estos parámetros.

Para determinar la densidad y viabilidad celular, se combinaron 50 μL del cultivo celular previamente resuspendido y 50 μL del colorante azul Trypan (Sigma-Aldrich) en un tubo Eppendorf. A continuación, se añadieron 10 μL de la mezcla a una cámara de Neubauer o hemocitómetro con la que contar y diferenciar las células viables y no viables a través de un microscopio óptico (Nikon, Optiphot).

La densidad celular se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Densidad} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = \frac{N^{\circ} \text{ células viables} \cdot \text{Factor de dilución} \cdot 10^4}{N^{\circ} \text{ cuadrantes}}$$

Respecto a la fórmula anterior, las células viables son aquellas cuya membrana no se encuentra dañada y, por tanto, no se encuentran teñidas de azul. El factor de dilución empleado es 2, ya que mezclamos 50 μL del cultivo celular con 50 μL de azul Trypan. El factor de conversión 10^4 permite escalar el volumen comprendido en el hemocitómetro a 1 mL.

Por otro lado, la viabilidad celular se calculó con la siguiente expresión:

$$\text{Viabilidad}(\%) = \frac{N^{\circ} \text{ célula no teñidas}}{N^{\circ} \text{ totales}} \times 100$$

El porcentaje de viabilidad aceptable que se establece para seguir con el experimento debe ser mayor o igual al 85%.

3.4 Congelación y descongelación de cultivos celulares

En los periodos de inactividad durante los meses de trabajo se llevaron a cabo procesos de congelación y descongelación de las líneas celulares. La congelación permite generar reservorios de las células utilizadas para que, en caso de tener que repetir el experimento tiempo después, se mantenga la reproducibilidad.

Para las líneas celulares de MM, se centrifugó el volumen correspondiente a la cantidad de células que se deseaba congelar y se resuspendió el pellet resultante en una mezcla de SFB, medio celular y dimetil sulfoxido (DMSO, Sigma) al 50%, 40% y 10%, respectivamente. En el caso de las células NK-92-CD16, al tener un medio que ya de por sí contiene mucho suero, se resuspendió el pellet en una mezcla del 90% de medio celular correspondiente y 10% de DMSO. Las resuspensiones obtenidas se trasvasaron a un criotubo previamente rotulado y se almacenaron inicialmente, en un congelador a -80°C y, posteriormente, en un tanque de Nitrógeno líquido.

El DMSO añadido a las muestras para congelar es un compuesto químico que actúa como crioprotector celular evitando la formación de cristales de hielo del agua intracelular. Sin embargo, este agente es tóxico a temperatura ambiente y su manipulación durante los procesos de congelación y descongelación debe ser rápida.

Para la descongelación de los criotubos que contienen las líneas celulares congeladas se pipetearon de forma sucesiva volúmenes de aproximadamente 650 μ L del medio celular correspondiente atemperado hasta la completa descongelación de las células. A continuación, la suspensión resultante se trasvasó a un tubo Falcon de 15 mL que contenía 10 mL de medio y se sometió a una centrifugación de 114 xg. Finalmente, tras descartar el sobrenadante se resuspendieron las células en 5-10 mL de medio de cultivo nuevo, se trasvasaron a nuevos frascos de cultivo y se incubaron en la estufa para su posterior mantenimiento.

3.5 Extracción de PBMC a partir de aspirados de médula ósea

La extracción por gradiente de densidad, comúnmente llamado Ficoll, es una técnica que se emplea generalmente para separar los componentes de la muestra que corresponda en cada caso y así poder extraer la fracción de células mononucleares de la sangre periférica (PBMC). Entre estas células, se encuentran linfocitos, células plasmáticas y células NK. Concretamente, en el presente Trabajo de Fin de Grado nos interesaba extraer los PBMCs de las muestras de aspirados de médula ósea de los pacientes, que contienen las células de MM, y así poder emplearlas para los experimentos.

Para llevar a cabo este proceso, transferimos la muestra de cada paciente procedente del Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa a un tubo Falcon de 15 mL y la diluimos con RPMI 1640 de complementado. A continuación, añadimos lentamente la muestra sobre los 15 mL de Ficoll-PaqueTM PLUS ($\rho = 1,078$ g/mL) depositados en otro tubo Falcon de 15 mL y centrifugamos a 524 xg durante 15 minutos a 18-20°C, habiendo quitado el freno de la centrifuga. Tras la separación de los componentes de la muestra, pasamos el anillo blanco a otro tubo Falcon de 15 mL y añadimos 10 mL de medio RPMI para lavar y eliminar posibles restos del Ficoll-PaqueTM PLUS. Finalmente, centrifugamos a 233 xg durante 10 minutos, decantamos el tubo y resuspendemos en medio nuevo.

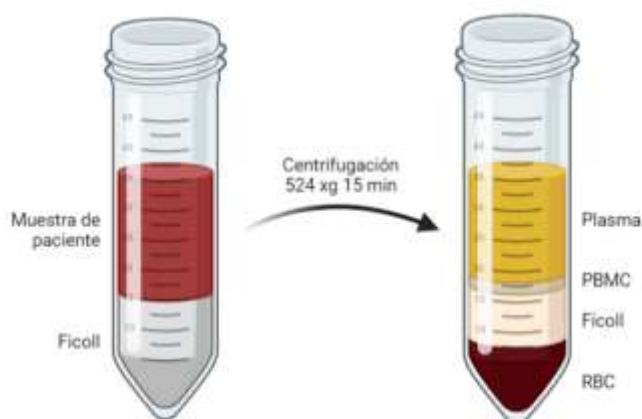


Figura 3. Extracción de PBMC a partir de aspirado de médula ósea. Sometemos la muestra de paciente sobre el Ficoll-PaqueTM PLUS a una centrifugación de 524 xg durante 15 minutos. Los componentes se separan en función de su densidad, quedando en el fondo los eritrocitos, y los PBMC entre el reactivo y el plasma sanguíneo.

3.6 Determinación de la proliferación, citotoxicidad y apoptosis

3.6.1 Experimentos de citotoxicidad celular

Durante el presente Trabajo de Fin de Grado nos dedicamos a enfrentar células efectoras contra células diana en placas de 96 pocillos (50.000 células diana/pocillo) a distintos ratios efector-diana en experimentos de 4 y 24 horas.

Antes de enfrentarlas con las células NK-92-CD16 (células efectoras), las células diana de MM fueron preincubadas durante 24h con Dinaciclib (STOCK 200 μ M) a distintas concentraciones para comprobar el efecto que ejercía sobre ellas:

- La línea celular NCI-H929 se incubó con concentraciones de Dinaciclib de 1 nM y 3 nM.
- La línea celular U266 se incubó con concentraciones de Dinaciclib de 2 nM y 5 nM.

Para la incubación de las células de MM con las distintas concentraciones de Dinaciclib se sembraron $2 \cdot 10^5$ células totales por pocillo en 6 pocillos de una placa de 12 en un volumen final de 1 mL por pocillo ($2 \cdot 10^5$ células/mL). Tras completar el volumen a 1 mL total con el medio correspondiente, se añadió la cantidad de Dinaciclib adecuada a cada pocillo. Al tratarse de volúmenes tan pequeños e imposibles de pipetear, se realizó una dilución intermedia 1/100 con el medio correspondiente que constaba de 0,5 μ L del STOCK de Dinaciclib en 50 μ L totales. Ambos volúmenes de Dinaciclib se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Volúmenes de Dinaciclib iniciales o teóricos, y realmente añadidos tras la dilución intermedia.

Condición	Volumen inicial	Volumen de la dilución intermedia
NCI-H929 + Dinaciclib 1 nM	0,005 μ L del STOCK	0,5 μ L
NCI-H929 + Dinaciclib 3 nM	0,015 μ L del STOCK	1,5 μ L
U255 + Dinaciclib 2 nM	0,010 μ L del STOCK	1 μ L
U255 + Dinaciclib 5 nM	0,025 μ L del STOCK	2,5 μ L

Una vez transcurridas las 24h de incubación, se realizó un conteo para determinar la densidad celular de cada pocillo. El volumen final de los pocillos se centrifugó a 233 xg durante 5 minutos y el pellet resultante se resuspendió en un volumen de medio correspondiente tal que la densidad celular total fuera de $1 \cdot 10^6$ células/mL. Además, las densidades obtenidas se compararon entre sí para ver si la presencia del fármaco afectaba a la proliferación de cada condición experimental.

Paralelamente, se analizó la densidad de las células NK-92-CD16 de las que disponíamos y se resuspendió la cantidad necesaria para realizar el experimento a la misma densidad celular que las células diana de MM ($1 \cdot 10^6$ células/mL). Así, la proporción entre volúmenes es igual a la proporción entre cantidad de células totales de cada tipo.

Finalmente, se sembraron placas de 96 pocillos que incluyeran controles y ratios diferentes de enfrentamiento efector-diana, dejando en todos los casos un volumen final de 200 μ L por pocillo.

Ratios altos	Ratio 1-1	50 μ L células + 50 μ L NK + 100 μ L RPMI
	Ratio 3-1	50 μ L células + 150 μ L NK
Ratios bajos	Ratio 1-2	50 μ L células + 25 μ L NK + 125 μ L RPMI
	Ratio 1-3	50 μ L células + 16,5 μ L NK + 133 μ L RPMI

Cabe destacar que, paralelamente a los experimentos de citotoxicidad, se llevó a cabo una prueba para comprobar la posible sensibilidad de la línea celular U266 a TRAIL soluble (sTRAIL). Para ello, las células U266 se incubaron durante 24 horas con Dinaciclib a concentraciones de 2 nM y 5 nM, así como con sTRAIL (1 µg/mL).

3.6.2 Experimento con Daratumumab

Daratumumab es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al antígeno CD38 localizado en la membrana de las células de MM. En este caso, solo se trabajó con la línea celular NCI-H929, ya que vimos que la línea celular U266 no expresaba la suficiente cantidad de CD38 en su superficie.

Los experimentos se realizaron con las mismas indicaciones del apartado anterior con el único distintivo de que, antes de sembrar las células NK-92-CD16 en la placa, el experimento requiere de una incubación previa de 15 minutos del anticuerpo con las células de MM para favorecer la unión de Daratumumab a su diana. La concentración que se utilizó de Daratumumab fue de 5 µg/mL para un volumen final de 200 µL/pocillo.

Transcurrido el tiempo de incubación, se añadieron las células NK-92-CD16 correspondientes y se dejaron reaccionar durante 24 horas.

3.6.3 Experimento con células primarias de pacientes de MM

Para los experimentos de citotoxicidades con las muestras de MM primario, se determinó el porcentaje de MM contenido en los PBMCs extraídos por la técnica de Ficoll, haciendo uso de la citometría de flujo. La densidad celular para el experimento se recalculó en base a ese porcentaje. Posteriormente, se pusieron a incubar $3 \cdot 10^5$ células totales de MM 24h con Dinaciclib 3nM y sin Dinaciclib en 2 pocillos de una placa de 6, a un volumen final de 3 mL por pocillo y densidad $1 \cdot 10^5$ células/mL. Pasadas las 24h, se contaron, se calculó la densidad, se resuspendieron a $1 \cdot 10^6$ células de mieloma/mL y se incubaron a $5 \cdot 10^4$ células diana/pocillo con Daratumumab y las células NK-92-CD16 correspondientes.

Cabe destacar que, durante las 24h de incubación de las células de MM de paciente con Dinaciclib, cada pocillo debe estar suplementado con 1 µL/mL de IL-6 (100 UI/mL) para que la viabilidad de las células primarias se mantenga en la medida de lo posible.

Una vez transcurridos los tiempos de incubación, para determinar la muerte que se produce en este y en los experimentos previamente descritos marcamos las placas para su análisis por citometría de flujo.

3.6.4 Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar y cuantificar las células que pasan una a una a su través y son incididas por un láser. Estos aparatos aportan información sobre el tamaño, la rugosidad y la fluorescencia de las muestras cuando éstas se encuentran marcadas por fluoróforos. El parámetro FSC (Forward Scatter) detecta la luz que se dispersa frontalmente

y da idea del tamaño celular, mientras que el parámetro SSC (Side Scatter) detecta la luz que se dispersa lateralmente indicando la morfología de la muestra (22).

La fluorescencia de las células marcadas con fluoróforos se procesa en distintos fotomultiplicadores. El citómetro empleado en este trabajo (FACScalibur™, BD Biosciences) presenta dos láseres de excitación ($\lambda = 488$ nm y $\lambda = 635$ o 638 nm) y cuatro detectores de fluorescencia: el detector FL1 identifica la $\lambda = 530 \pm 25$ nm, el FL2 detecta la $\lambda = 585 \pm 21$ nm, el FL3 la $\lambda = 670$ nm y el FL4 la $\lambda = 661 \pm 8$ nm.

Para el análisis de los resultados se emplean los histogramas o Dot plot (gráfico de nube de puntos); este último, permite estudiar dos parámetros al mismo tiempo. Además, la utilización de sondas fluorescentes basadas en la exclusión o incorporación del fluoróforo permiten determinar la viabilidad celular por citometría de flujo.

3.6.4.1 Marcaje celular con Anexina V para el análisis de la apoptosis

Durante la apoptosis tiene lugar la exposición de la fosfatidilserina (PS) en la membrana de la célula apoptótica. En base a esta translocación, la identificación de las células apoptóticas podrá ser detectada con Anexina V, una molécula capaz de unirse a la fosfatidilserina. En este caso, se utilizó conjugada con el fluoróforo DY-634 ($\lambda_{ex} = 635$ nm; $\lambda_{em} = 658$ nm).

Para el marcaje con Anexina V se preparó en un tubo Eppendorf una mezcla de 25 μ L/pocillo de ABB y 0,05 μ L/pocillo de Anexina V-DY-634. A continuación, se añadieron 25 μ L de la mezcla preparada a cada pocillo de la placa de estudio y se incubó a oscuras durante 10-15 minutos. Pasado el tiempo de incubación se pipetearon las muestras de los pocillos a tubos de citómetro (FALCON) y se analizaron los resultados en el citómetro de flujo FACScalibur™, BD Biosciences.

Hay que tener en cuenta que en los experimentos de citotoxicidad las células diana y efectoras han sido incubadas juntas. Ambas poblaciones celulares se diferencian en el citómetro de flujo gracias a la fluorescencia verde que muestran las células NK-92-CD16 como consecuencia de la expresión de ZsGreen. De esta forma, se puede determinar la muerte de las células de MM seleccionando en primer lugar aquella población que sea verde negativa.

3.6.4.2 Análisis de la expresión de proteínas de membrana plasmática

3.6.4.2.1 Análisis de la expresión de CD38 en células de MM

Este tipo de marcaje se realizó tanto con las líneas celulares establecidas, como con las muestras primarias, aunque con distintos objetivos. En el caso de las líneas establecidas, para asegurarnos de una correcta actuación de Daratumumab en la ADCC, primero se comprobó si las células expresaban la diana CD38. Después, se comprobó el mantenimiento de la expresión del antígeno CD38 al tratar las células con Dinaciclib. En cuanto a las muestras primarias, ya que lo que se extrae del Ficoll es una muestra de PBMCs totales, se utilizó este marcaje para saber con exactitud la fracción de MM contenida y recalcular su densidad relativa.

En los tres casos se realizó un marcaje con los anticuerpos APC Mouse IgG1 κ Isotype Control (isotipo) y APC Mouse Anti-Human CD38, ambos de la marca BD PharmingenTM. Las dos moléculas son anticuerpos monoclonales murinos conjugados con el fluoróforo de alofococianina (APC) que comparten el mismo isotipo (IgG1 κ). Concretamente, el isotipo es un anticuerpo que actúa como blanco o control negativo del análisis dado que proporciona una señal base debida a uniones inespecíficas. Combinando ambos anticuerpos determinamos la fracción de células de MM que tienen la molécula de CD38 en su superficie, así como su nivel de expresión.

La preparación del análisis se basó en centrifugar las células de MM o los PBMC a 2851 xg durante 2 minutos, descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 100 μ L de PBS suplementado con 5% de SFB para bloquear las interacciones inespecíficas de los anticuerpos. Seguidamente, se añadieron 2 μ L de ambos anticuerpos a cada uno de los pocillos con las células solas y combinadas con Dinaciclib, y se incubaron durante 30 minutos.

3.6.4.2.2 Marcaje celular con el anticuerpo Anti-CD138

Cuando trabajamos con muestras de MM primarios de pacientes, lo hacemos con la mezcla de PBMCs totales, luego para poder determinar la muerte producida exclusivamente sobre las células de MM, debemos realizar un marcaje específico. Las células plasmáticas se caracterizan por la coexpresión de los antígenos CD38 y CD138. En la mayoría de los casos, los pacientes que sufren MM presentan un fenotipo característico CD38⁺ - CD138⁺ (23). La razón por la cual utilizamos CD138 como marcador molecular específico en lugar de CD38 es porque en los experimentos realizados con pacientes se incluye Daratumumab, que como hemos comentado anteriormente, es un anticuerpo monoclonal dirigido contra CD38. Por lo tanto, si quisiéramos marcar esta molécula, nos encontraríamos con el epítipo ya ocupado.

Para el marcaje se añadieron 2 μ L por pocillo del anticuerpo PE Mouse Anti-Human CD138 (BD PharmingenTM) a la mezcla de ABB y Anexina V explicada en el apartado anterior.

3.6.4.3 Análisis informático de los resultados

El análisis de los resultados obtenidos en la citometría de flujo se evaluó con los programas informáticos FlowJo 7.6.1 y GraphPad Prism 8.0.1. En este último se interpretaron y representaron los resultados gráficamente, y fueron analizados estadísticamente por el test 2way ANOVA.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para el presente Trabajo de Fin de Grado empleamos las líneas celulares NCI-H929 y U266 enfrentadas con células NK-92-CD16 a ratios distintos de células efector-diana. El objetivo del ensayo consistió en determinar si la adición de Dinaciclib a las líneas celulares previamente al enfrentamiento era capaz de potenciar la citotoxicidad de las células NK-92-CD16.

El establecimiento de las concentraciones de Dinaciclib con las que trabajar en cada línea celular está basado en resultados previos obtenidos por el grupo de investigación. En base a ellos, cultivamos las células NCI-H929 con concentraciones de 1 nM y 3 nM, y las células U266 con

concentraciones de 2 nM y 5 nM de Dinaciclib. Estas concentraciones se eligieron por no ser, a priori, tóxicas en sí mismas, o al menos no más de un 15%.

Disponíamos de datos previos del grupo de investigación que indicaban que las células NCI-H929 no presentaban sensibilidad a los ligandos FasL y TRAIL de las células NK en general, pero no sabíamos si las células U266 compartían esta característica. Por lo tanto, se comprobó mediante un pequeño ensayo. Los resultados de esta prueba preliminar mostraron que las células U266 tampoco presentaban esta sensibilidad, al menos para TRAIL en forma soluble, al no aumentar éste la muerte celular ni en solitario, ni en combinación con Dinaciclib (Figura 4). Además, se observó que, a pesar de los resultados previos, Dinaciclib inducía cierto grado de toxicidad a la concentración de 5 nM, quedando en el límite de un 15% de muerte celular (Figura 4).

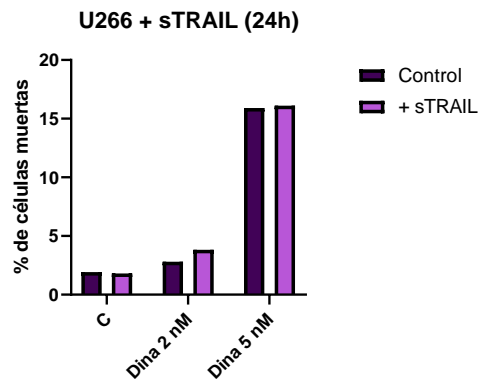


Figura 4. Sensibilidad de la línea celular U266 a TRAIL soluble (sTRAIL) sólo o combinado con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina). Las células se incubaron durante 24 horas en sTRAIL. Los resultados muestran el porcentaje de muerte celular de un único experimento.

Como los experimentos previos realizados en el grupo con células NK-92-CD16 fueron mayoritariamente a ratios efector-diana 1-1 y 3-1, a 4 horas de incubación, se decidió realizar los primeros experimentos del presente trabajo siguiendo las mismas condiciones.

4.1 Experimentos de citotoxicidad de las NK-92-CD16 combinadas con Dinaciclib

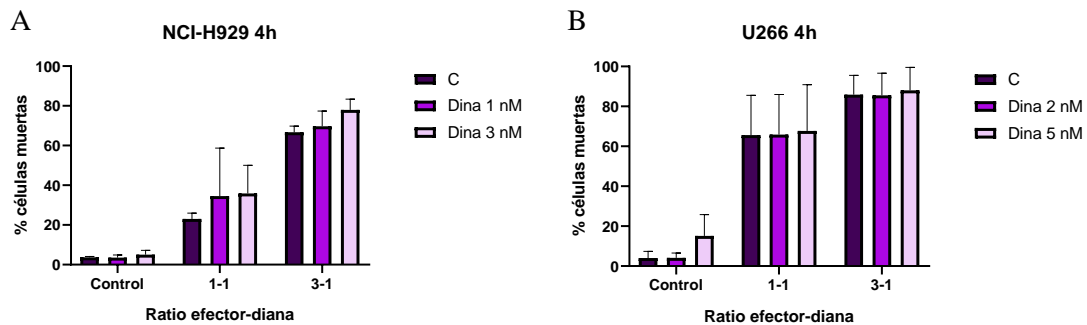


Figura 5. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina) y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-

diana. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar (SD) de la muerte celular producida de dos experimentos diferentes.

Respecto a la línea celular NCI-H929, como podemos apreciar en la Figura 5A, las concentraciones de Dinaciclib seleccionadas parecen no ser tóxicas por sí mismas, ya que los controles no muestran un efecto observable. A pesar de que la media de muerte a ratios 1-1 sea mayor en las células incubadas con Dinaciclib que en las células control, la desviación estándar es tan alta que no podemos decir que exista una diferencia significativa.

Como cabría esperar, a ratios 3-1 la muerte es mayor que a ratios 1-1 dada la mayor cantidad de células NK-92-CD16. En este caso, puede apreciarse una cierta tendencia en la muerte celular al aumentar la concentración de Dinaciclib, especialmente a 3 nM, pero la diferencia no llega a ser estadísticamente significativa.

A diferencia de lo que ocurre en las células NCI-H929, en la Figura 5B la concentración de Dinaciclib a 5 nM sí parece tener un cierto efecto tóxico por sí misma sobre el control de células U266, pero sin ser significativo. Sin embargo, al combinar las células NK-92-CD16 con Dinaciclib, no se aprecia efecto sinérgico alguno, siendo la citotoxicidad muy alta ya a la relación efector-diana de 1-1.

En comparación con la línea anterior, los valores de muerte celular se incrementan en gran medida cuando se enfrentan con las células NK-92-CD16, lo cual indica que la línea celular U266 es más sensible a estas células que la línea NCI-H929. Este fenómeno concuerda con la mayor expresión que presentan las células U266, respecto a las NCI-H929, de MICA/MICB, ligandos activadores de las células NK en general (24). Además, se plantea el hecho de que las células U266, a diferencia de las células NCI-H929, puedan sobreexpresar la proteína antiapoptótica Mcl-1, ya que hay estudios que han comprobado que cuando esta proteína actúa como diana terapéutica las células U266 mantienen una viabilidad del 75% y las NCI-H929 del 0-15% (25). Este hecho podría explicar también que Dinaciclib, que conduce a una desregulación de transcritos de mRNA y proteínas como Mcl-1, tuviera más efecto sobre las células U266 control reduciendo la sobreexpresión característica de Mcl-1. Del mismo modo, cabe destacar que el mismo estudio identificó las distintas traslocaciones que afectaban a estas líneas celulares: mientras U266 sufre la traslocación t(11;14), las células NCI-H929 experimentan la t(4;14) (25), cuyos genes afectados se encuentran indicados en la Tabla 1.

Así mismo, cualquier alteración genética que afecte a las proteínas nombradas en el mecanismo de acción de las granzimas, como la sobreexpresión de IAPs, podría explicar el hecho de que las células U266 fueran más sensibles a las células NK-92-CD16 que las células NCI-H929, como se deduce en los resultados.

El hecho de no ver sinergia entre los tratamientos podría ser debido al fuerte efecto citotóxico que tienen por sí solas las células NK-92-CD16, principalmente sobre la línea celular U266.

Cabe la posibilidad de que en tan solo 4 horas de coincubación no dé tiempo a apreciarse el efecto sinérgico. Por ello, se llevó a cabo un segundo experimento a ratios efector-diana iguales, pero a 24 horas.

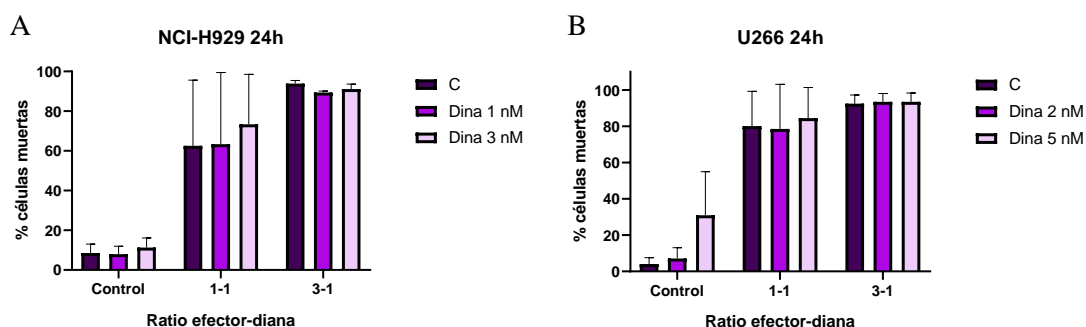


Figura 6. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 24 horas sobre las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina) y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana. Los resultados muestran la media \pm SD de la muerte celular producida de dos experimentos.

En la Figura 6 se puede observar que pasadas 24 horas, como es lógico, la muerte celular es mayor que a las 4 horas porque las células NK-92-CD16 tienen más tiempo de actuación. De hecho, aumenta tanto que podría decirse que las células NK-92-CD16 ejercen un efecto citotóxico tan potente por sí solas sobre las células de MM que no deja ver la sinergia con Dinaciclib, en caso de que la haya.

Además, en este segundo experimento se confirma la toxicidad que presenta la concentración de Dinaciclib de 5 nM sobre las células U266 (Figura 6B).

Vista su elevada toxicidad, se decidió repetir el mismo tipo de experimento a 4 horas, pero con una cantidad menor de células NK-92-CD16 que de células de MM. En este caso se eligieron ratios de células efector-diana de 1-3 y 1-2.

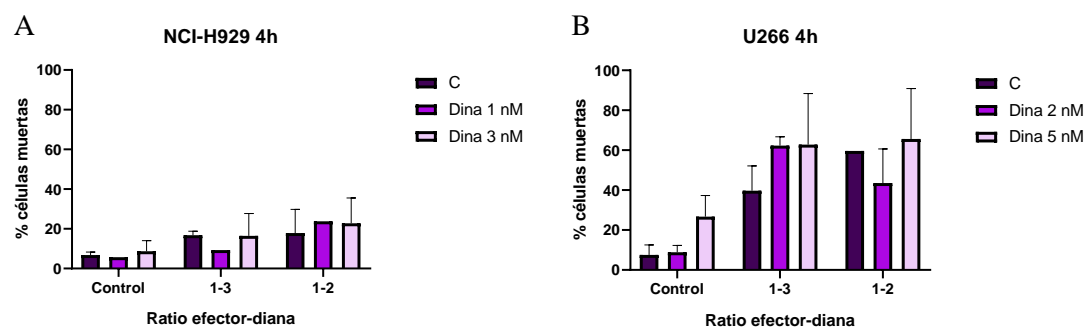


Figura 7. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina) y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana, menores de los anteriormente ensayados. Los resultados muestran la media \pm SD de la muerte celular producida de dos experimentos.

En este caso, se observa que la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 sobre las células NCI-H929 es baja y no resulta aumentada por Dinaciclib (Figura 7A). Sin embargo, en el caso de las células U266, la muerte celular no se aleja tanto de la observada para ratios 1-1 (Figura 7B).

En la línea celular U266 se vuelve a observar una tendencia de aumento de la muerte celular al combinar las células NK-92-CD16 con Dinaciclib 5 nM (Figura 7B). No obstante, si comparamos con el control de Dinaciclib 5 nM sólo, vemos que este incremento de muerte puede ser un efecto aditivo producido por la toxicidad del fármaco en sí mismo.

Aplicando la misma lógica que en el experimento hecho con ratios 1-1 y 3-1, realizamos un cuarto experimento a 24 horas dejando un tiempo mayor para que las células efectoras tuvieran más margen para ejercer un posible efecto combinado o sinérgico con Dinaciclib.

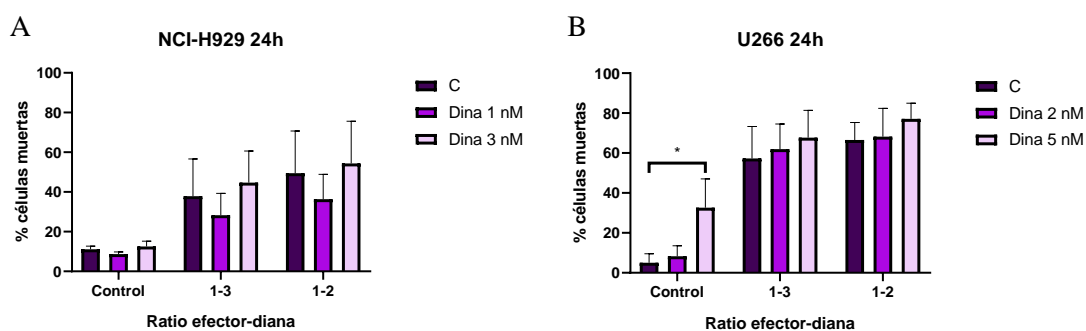


Figura 8. Citotoxicidad de las células NK-92-CD16 durante 24 horas sobre las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina) y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana, menores de los anteriormente ensayados. Los resultados muestran la media \pm SD de la muerte celular producida de dos experimentos. * $p < 0,05$.

Nuevamente, la muerte celular pasadas 24 horas es mayor que la mostrada para 4 horas (Figura 8). Paralelamente, la muerte a ratios 1-2 es mayor que a ratios 1-3.

En esta figura puede verse una toxicidad significativa para Dinaciclib sobre las células U266 a 5 nM. El aumento en la citotoxicidad de las células NK-92-CD16 en comparación con esta concentración de Dinaciclib puede ser, de nuevo, debida a la propia toxicidad del fármaco.

4.2 Proliferación celular con Dinaciclib

Como ya se ha explicado anteriormente, Dinaciclib es un inhibidor de proteínas que controlan la progresión del ciclo celular. Por ello, a lo largo de los anteriores experimentos se fueron comparando los valores de las densidades celulares de los MM obtenidas tras 24h de incubación con Dinaciclib para ver si la presencia del fármaco afectaba a su proliferación.

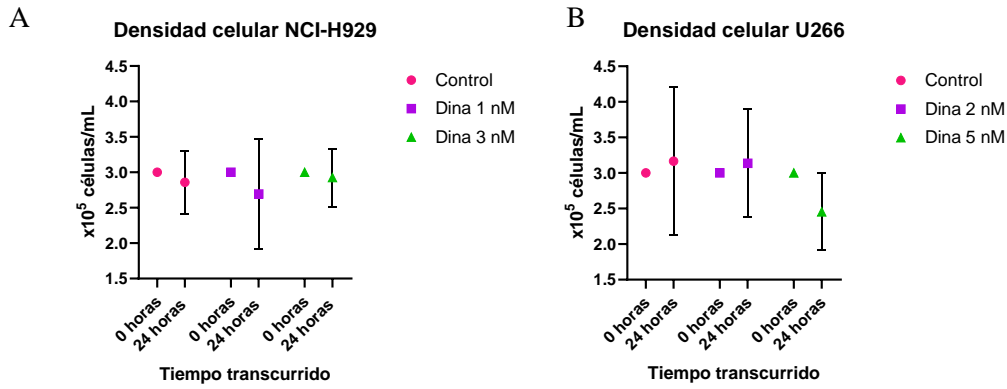


Figura 9. Efecto de la incubación durante 24h con distintas concentraciones de Dinaciclib (Dina) sobre la proliferación de las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Los resultados muestran la media \pm SD de la densidad de células vivas de 8 experimentos.

Según muestra la Figura 9, las medias de la densidad no se ven prácticamente afectadas, lo cual quiere decir que la adición de Dinaciclib perjudica a la proliferación de las líneas ya que, en una situación normal, esperaríamos que esta llegara a duplicarse pasadas 24 horas.

4.3 Combinación de Dinaciclib y ADCC

Hasta el momento, a lo largo de los experimentos se ha ido viendo el efecto de la citotoxicidad basal que presentan las células NK-92-CD16. Sin embargo, estas células del sistema inmunitario pueden ser activadas por los anticuerpos vía el receptor CD16 y dirigirse específicamente a su diana efectuando la ADCC.

Tal y como se comenta anteriormente, se decidió utilizar Daratumumab, un anticuerpo monoclonal humano de tipo IgG κ que se dirige contra la molécula de CD38 localizada en la superficie de las células de MM. Previamente a los experimentos, analizamos por citometría de flujo la expresión de esta molécula en la superficie de las líneas celulares utilizadas.

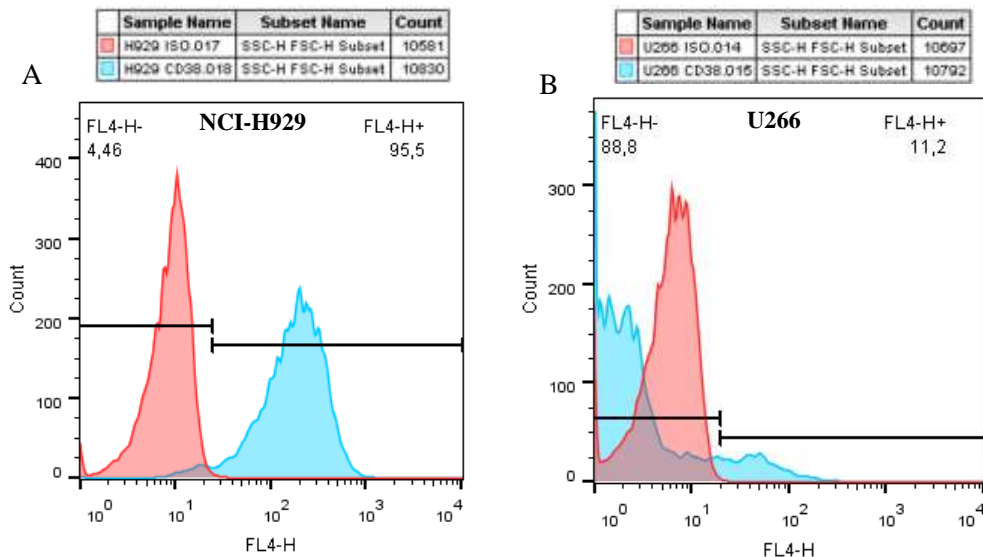


Figura 10. Nivel de expresión de CD38 en las líneas celulares NCI-H929 (A) y U266 (B). Los histogramas rojos muestran la señal base del marcaje con el control de isotipo. Los histogramas azules, por su parte, muestran el nivel de expresión de CD38, considerando positivo aquello con mayor fluorescencia que el control isotipo. Histogramas representativos en los dos experimentos. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de las células y, el eje de ordenadas, el número de células que presentan la misma intensidad de fluorescencia.

Como se puede observar en la Figura 10, mientras que las células NCI-H929 expresan unos niveles elevados de CD38 en la práctica totalidad de su población celular, las células U266 expresan un nivel bajo de CD38 en una subpoblación que solo supone el 11% del total. Dada la baja expresión de CD38 en la membrana de las células U266, se decidió realizar los siguientes experimentos únicamente con la línea NCI-H929. La concentración de Dinaciclib escogida para este nuevo experimento fue 3 nM.

La ADCC depende de la diana del anticuerpo utilizado; en este caso, CD38. Por esta razón, paralelamente al experimento, se analizó si la expresión de CD38 en la superficie variaba o no en las células NCI-H929 al pretratarlas 24 horas con Dinaciclib.

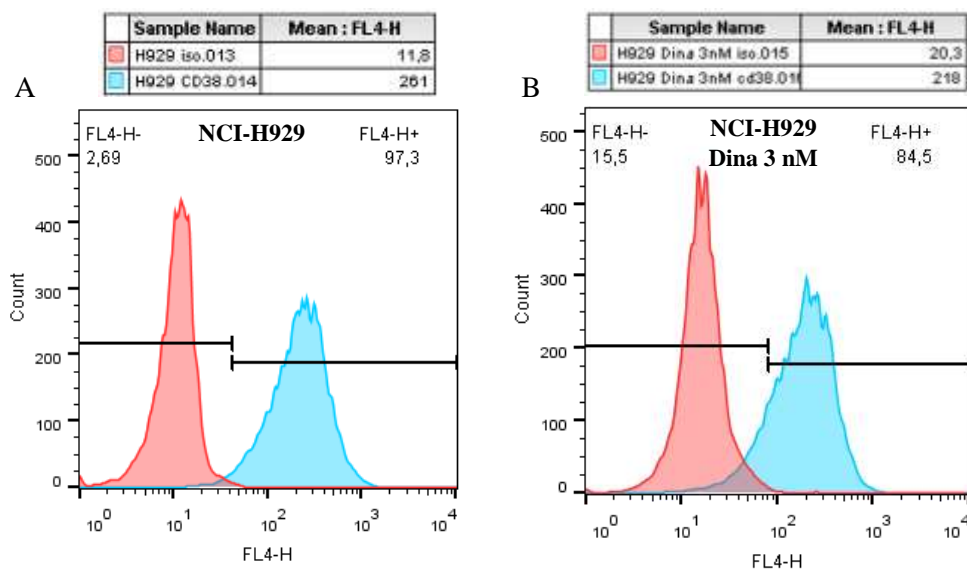


Figura 11. Nivel de expresión de CD38 en la superficie de las células NCI-H929 tras 24 horas de cultivo sin Dinaciclib (A) y con Dinaciclib 3 nM (B). Los histogramas rojos muestran la señal base del marcaje con el control de isotipo. Los histogramas azules, por su parte, muestran el nivel de expresión CD38, considerando positivo aquello con mayor fluorescencia que el control isotipo. Histogramas representativos de dos experimentos. El eje de abscisas representa la intensidad de fluorescencia de las células, mientras que el eje de ordenadas muestra el número de células que presentan la misma intensidad de fluorescencia.

Como se observa en la Figura 11, la expresión de CD38 se reduce parcialmente en las células tratadas con Dinaciclib. Por un lado, en porcentaje de células positivas: 97,3% (Figura 11A) VS. 84,5% (Figura 11B). Por otro lado, en intensidad media de fluorescencia: 261 (Figura 11A) VS. 218 (Figura 11B). Aunque hay menos células que expresan CD38, y éstas expresan menos cantidad de CD38, la expresión sigue siendo elevada y, en principio, la ADCC no debería verse muy afectada.

A continuación, en los siguientes experimentos, ensayamos el efecto de Dinaciclib en la ADCC mediada por Daratumumab sobre las células NCI-H929. Trabajamos con la línea celular NCI-H929 y concentraciones de Dinaciclib 3 nM porque parecían aumentar más la muerte sinérgicamente con las células NK-92-CD16 que las concentraciones 1 nM. Además, se emplearon ratios efector-diana 1-3 y 1-2 donde poder observar dicha sinergia sin que la alta citotoxicidad propia de las células NK-92-CD16 la enmascarase.

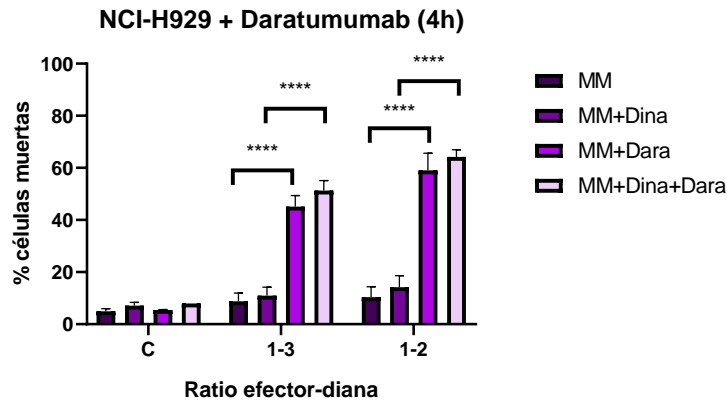


Figura 12. Citotoxicidad dependiente de anticuerpo de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre la línea celular NCI-H929. Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con Dinaciclib (Dina) 3 nM y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana. Antes de añadir las células NK-92-CD16, las células de MM se incubaron 15 minutos con Daratumumab (Dara) 5 µg/ml. Los resultados muestran la media ± SD de la muerte celular producida de dos experimentos. **** p<0,0001.

Como podemos deducir de la Figura 12, ni Dinaciclib ni Daratumumab por sí solos, o combinándolos, son tóxicos sobre las células control en ausencia de células NK-92-CD16. Cuando enfrentamos el efector con su diana observamos unos valores de muerte similares a los descritos anteriormente para ratios 1-2 y 1-3 a 4 horas (Figura 7A). Ahora bien, al aplicar Daratumumab vemos un gran aumento de la citotoxicidad debido a la ADCC y la expresión del CD38 en las células NCI-H929.

Así mismo, se observa también un ligero aumento de la citotoxicidad al combinar Daratumumab con Dinaciclib que, sin embargo, no resulta significativa.

Con estos resultados se puede observar que, aunque el tratamiento con Dinaciclib reduce la expresión de CD38 (Figura 11), esto no afecta a la ADCC ejercida por las NK-92-CD16 con Daratumumab y quizá exista un cierto efecto potenciador (Figura 12).

4.4 Ensayos sobre células de pacientes de MM

Los anteriores experimentos fueron realizados con líneas celulares de MM que se caracterizan por actuar de modelos dado que teóricamente son una población clonal y mantienen una reproducibilidad constante en los experimentos. Sin embargo, cada paciente tiene un fondo genético distinto y los resultados obtenidos en líneas celulares no son extrapolables a todos los pacientes con MM.

En colaboración con el Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza se han empleado varias muestras de pacientes con MM para el estudio con Dinaciclib y las células NK-92-CD16 junto a Daratumumab a ratios 1-1 y 3-1 durante 4 horas. Se utilizaron ratios mayores que los empleados en la ADCC con la línea celular NCI-H929 porque las muestras de pacientes se presuponen que no sean tan sensibles.

Las muestras originales proporcionadas son aspirados medulares que contienen diversas poblaciones celulares. Para separar las células de MM del resto, sometemos la muestra a un Ficoll y sembramos las placas como en los experimentos anteriores teniendo en cuenta la cantidad de MM que hay en los PBMCs, determinada por citometría de flujo marcando las muestras con un anticuerpo anti-CD38.

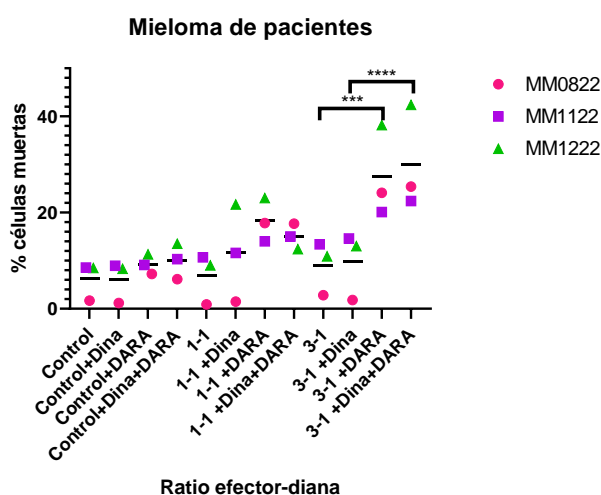


Figura 13. Citotoxicidad dependiente de anticuerpos de las células NK-92-CD16 durante 4 horas sobre muestras primarias en pacientes de MM. Las células de MM fueron preincubadas durante 24 horas con Dinaciclib (Dina) 3 nM y posteriormente enfrentadas con las células NK-92-CD16 a diferentes ratios efector-diana. Antes de añadir las células NK-92-CD16, las células de MM se incubaron 15 minutos con Daratumumab (Dara) 5 µg/ml. Los resultados muestran la media ± SD de la muerte celular producida de dos experimentos. *** p<0,001; **** p<0,0001.

Como podemos ver en la Figura 13, Daratumumab ejerce un efecto citotóxico significativo en combinación con las células NK-92-CD16 gracias a la ADCC cuando se aplica a ratios 3-1 tanto solo, como con Dinaciclib, con respecto a los controles. Cabe destacar que, a diferencia de los resultados vistos anteriormente con las líneas celulares, la actuación de las células NK-92-CD16 por sí solas no tiene prácticamente efecto.

Centrándonos en el paciente MM0822, observamos que los valores de muerte celular que resultan al combinar sus células de MM con células NK-92-CD16 y Dinaciclib, sin la presencia de Daratumumab, son muy inferiores a la media de los otros pacientes y prácticamente nulos. Este hecho puede deberse a que el paciente MM0822, según nos informó el Hospital, ha sufrido recaída a tratamientos previos a diferencia de los otros dos pacientes. Este fenómeno estaría creando resistencia al tratamiento con las células NK-92-CD16.

No obstante, se observa que al adicionar Daratumumab, la respuesta ADCC supera el punto de inhibición gracias a la activación directa y las células NK actúan como con el resto de

pacientes que no han sufrido recaída, siendo una observación de gran interés desde el punto de vista clínico.

Del mismo modo, se sugiere la presencia de un microambiente tumoral con células y citoquinas que favorezca el crecimiento del tumor a través de señales supresoras del sistema inmune.

5. CONCLUSIONES

- La terapia combinada de Dinaciclib y la línea celular NK-92-CD16 sobre las líneas celulares de MM U266 y NCI-H929 a ratios distintos de concentración efector-diana y tiempos de incubación, no muestra una sinergia estadísticamente significativa. Sin embargo, se ha observado una tendencia de aumento de la citotoxicidad sobre las células NCI-H929 y U266 en ensayos de 4h.
- The combined therapy of Dinaciclib and the NK-92-CD16 cell line on the MM U266 and NCI-H929 cell lines at different ratios of effector-target concentration and incubation times, does not show a statistically significant synergy. However, a trend of increased cytotoxicity has been observed on NCI-H929 and U266 cells in 4h assays.
- La línea celular U266 resulta más sensible al tratamiento con Dinaciclib y NK-92-CD16 que la línea celular NCI-H929.
- The U266 cell line is more sensitive to treatment with Dinaciclib and NK-92-CD16 than NCI-H929 cell line.
- La reducción parcial de la expresión de CD38 en la membrana de las células NCI-H929 tratadas con Dinaciclib no afecta a la ADCC mediada por Daratumumab.
- Partial reduction of CD38 expression in the membrane of NCI-H929 cells treated with Dinaciclib does not affect Daratumumab-mediated ADCC.
- Daratumumab ejerce un efecto citotóxico significativo en las líneas de MM con respecto a los controles en ausencia de anticuerpo.
- Daratumumab exerts a significant cytotoxic effect on MM lines with respect to controls in the absence of antibody.
- Dinaciclib aumenta ligeramente la citotoxicidad, aunque su efecto no llega a ser significativo.
- Dinaciclib slightly increases cytotoxicity, although its effect is not significant.
- Las células NK-92-CD16 no son citotóxicas sobre células de pacientes de MM, pero sí lo son de forma muy significativa en combinación con Daratumumab. Dinaciclib aumenta ligeramente esta citotoxicidad, aunque el efecto no llega a ser estadísticamente significativo.
- NK-92-CD16 cells are not cytotoxic on cells from MM patients, but they are very significantly so in combination with Daratumumab. Dinaciclib slightly increases this cytotoxicity, although the effect is not statistically significant.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019 [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: <https://seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla>
2. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* 2022;12(1):31–46.
3. van de Donk NWCJ, Pawlyn C, Yong KL. Multiple myeloma. *Lancet* [Internet]. 2021;397(10272):410–27. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00135-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00135-5)
4. Home | American Cancer Society - Cancer Facts & Statistics [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: <https://cancerstatisticscenter.cancer.org/#/>
5. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: Evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(3):175–87.
6. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002 23 [Internet]. 2002 [cited 2022 May 20];2(3):175–87. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrc746>
7. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):585–98.
8. Cohen AD, Garfall AL, Stadtmauer EA, Melenhorst JJ, Lacey SF, Lancaster E, et al. B cell maturation antigen–specific CAR T cells are clinically active in multiple myeloma. *J Clin Invest.* 2019;129(6):2210–21.
9. Kumar SK, LaPlant B, Chng WJ, Zonder J, Callander N, Fonseca R, et al. Dinaciclib, a novel CDK inhibitor, demonstrates encouraging single-agent activity in patients with relapsed multiple myeloma. *Blood.* 2015;125(3):443–8.
10. Boleto de calificaciones compuestas [Internet]. [cited 2022 May 20]. Available from: https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card/CHEMBL2103840/
11. Md Sakib Hossain D, Javaid S, Cai M, Zhang C, Sawant A, Hinton M, et al. Dinaciclib induces immunogenic cell death and enhances anti- PD1–mediated tumor suppression. *J Clin Invest.* 2018;128(2):644–54.
12. Hatch H, Dolinski BM, Nguyen T, Harmonay L, Al-Assaad AS, Ayers M, et al. MCL1 and BCL-xL levels in solid tumors are predictive of dinaciclib-induced apoptosis. *PLoS One.* 2014;9(10).
13. Reina-Ortiz C, GiralDOS D, Azaceta G, Palomera L, Marzo I, Naval J, et al. Harnessing the Potential of NK Cell-Based Immunotherapies against Multiple Myeloma. *Cells.* 2022;11(3):1–17.
14. Anel A, Aguiló JI, Catalán E, Garaude J, Rathore MG, Pardo J, et al. Protein kinase C- θ (PKC- θ) in natural killer cell function and anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2012;3(JUL):1–12.
15. Pardo J, Wallich R, Martin P, Urban C, Rongvaux A, Flavell RA, et al. Granzyme B-induced cell death exerted by ex vivo CTL: Discriminating requirements for cell death and some of its signs. *Cell Death Differ.* 2008;15(3):567–79.
16. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015;21(22):5047–56.

17. Portt L, Norman G, Clapp C, Greenwood M, Greenwood MT. Anti-apoptosis and cell survival: A review. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011;1813(1):238–59. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.10.010>
18. Clémenceau B, Vivien R, Pellat C, Foss M, Thibault G, Vié H. The human natural killer cytotoxic cell line NK-92, once armed with a murine CD16 receptor, represents a convenient cellular tool for the screening of mouse mAbs according to their ADCC potential. *MABs*. 2013;5(4):587–94.
19. Ollier J, Vivien R, Vié H, Clémenceau B. Transfection of Fc γ RIIIa (CD16) Alone Can Be Sufficient To Enable Human $\alpha\beta$ TCR T Lymphocytes To Mediate Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity. *ImmunoHorizons*. 2017;1(5):63–70.
20. Jiménez N. Estudio de la apoptosis inducida por el inhibidor de proteosoma Ixazomib en células de mieloma. Evaluación de factores de resistencia y análisis de su potenciación por agonistas BH3. 2022.
21. Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J, et al. Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res*. 1998;4(11):2859–68.
22. Jocelyn Carolina P-L, Wendolaine S-C, Héctor R-R, Carlos J. *Portafolio Científico*. 18(2):julio-diciembre.
23. Rincón-Vásquez MB NJ, Jaramillo-Arbeláez Msc PE, Llanos-Albornoz TM CM. Morfología e inmunofenotipo de las células plasmáticas en el mieloma múltiple Morphology and immunophenotype of plasma cells in multiple myeloma. *Med Lab*. 2017;23:443–58.
24. Swift BE, Williams BA, Kosaka Y, Wang XH, Medin JA, Viswanathan S, et al. Natural killer cell lines preferentially kill clonogenic multiple myeloma cells and decrease myeloma engraftment in a bioluminescent xenograft mouse model. *Haematologica*. 2012;97(7):1020–8.
25. Gong JN, Khong T, Segal D, Yao Y, Riffkin CD, Garnier JM, et al. Hierarchy for targeting prosurvival BCL2 family proteins in multiple myeloma: Pivotal role of MCL1. *Blood*. 2016;128(14):1834–44.