



Universidad
Zaragoza



Facultad de Ciencias
Universidad Zaragoza

TRABAJO DE FIN DE GRADO

EFFECTO DE FÁRMACOS METABÓLICOS SOBRE LA CAPACIDAD ANTI-TUMORAL DE CÉLULAS INMUNITARIAS

METABOLIC DRUG EFFECT ON THE ANTI-TUMORAL POTENTIAL OF IMMUNE CELLS

AUTORA

Cristina Ripollés Yuba

DIRECTORES

Luis Alberto Anel Bernal

Joaquín Marco Brualla

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Inmunidad, cáncer y células madre

Grado en Biotecnología

Curso académico 2021-2022

*Al Abuelo Juan,
porque le hubiese encantado leer esto.*

ÍNDICE

RESUMEN/ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 El cáncer y su metabolismo	2
1.2 Fármacos metabólicos en el tratamiento de tumores	3
1.3 El microambiente tumoral (TME).....	4
1.4 El sistema inmunitario en el cáncer	5
1.4.1 Inmunidad anti-tumoral: capacidad citotóxica de CTL y NK.....	5
1.4.2 Terapia celular adoptiva y uso combinado con fármacos metabólicos: antecedentes	6
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Cultivo y mantenimiento de líneas celulares.....	7
3.1.1 Determinación de la densidad y viabilidad celular por tinción con azul Trypan.....	8
3.1.2 Congelación y descongelación de células.	8
3.2 Comprobación de la sobreexpresión de proteínas por Western Blot.....	8
3.3 Obtención y expansión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).....	10
3.3.1 Extracción de PBMC de muestras de donantes sanos	10
3.3.2 Expansión <i>in vitro</i> de CTL y NK	11
3.3.3 Citometría de flujo con marcaje CD3/CD56	11
3.4 Experimentos de citotoxicidad	12
3.4.1 Incubación con fármacos metabólicos.....	12
3.4.2 Separación de poblaciones celulares en expansiones de PBMC	12
3.4.3 Marcaje de PBMC con sonda fluorescente	13
3.4.4 Ensayos de citotoxicidad frente a tumores	13
3.4.4.1 Ensayos con células NK-92	13
3.4.4.2 Ensayos con células eNK y eCTL	13

3.5 Análisis estadístico.....	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
4.1 Comprobación de la sobreexpresión de proteínas por Western Blot.....	14
4.2 Seguimiento de las expansiones de PBMC.....	14
4.3 Efecto de la incubación con fármacos metabólicos sobre el crecimiento celular	17
4.4 Estudio comparativo del efecto citotóxico frente a tumores	18
4.4.1 Ensayos de citotoxicidad con células NK-92.....	18
4.4.2 Ensayos de citotoxicidad con PBMC aislados	20
4.4.2.1 Resultado de los ensayos con eNK	20
4.4.2.2 Resultado de los ensayos con eCTL	20
4.4.3 Discusión sobre los resultados de citotoxicidad.....	21
4.4.3.1 Empleo de la línea celular NK-92 como potente efector citotóxico	21
4.4.3.2 Efecto de fármacos metabólicos sobre la capacidad anti-tumoral de células inmunitarias	22
4.4.3.3 Utilidad de los hallazgos para el tratamiento de leucemias resistentes.....	23
5. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	24
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

MATERIAL SUPLEMENTARIO:

- **ANEXO I:** Composición de tampón de lisis y geles para Western Blot.
- **ANEXO II:** Estrategia de *gating* o selección para el seguimiento de las expansiones de PBMC por marcaje CD3/CD56.
- **ANEXO III:** Estrategia de *gating* o selección para la determinación de la muerte tumoral por marcaje de Anexina.

ABREVIATURAS

ACT: Terapia Celular Adoptiva, *Adoptive Cell Therapy*

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo, *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*

AMPK: Proteína quinasa activada por AMP, *AMP-activated Protein Kinase*

CAF: Fibroblastos Asociados al Cáncer, *Cancer-Associated Fibroblasts*

CAR: Receptor de Antígeno Quimérico, *Chimeric Antigen Receptor*

CTL: Linfocito T Citotóxico, *Cytotoxic T Lymphocyte*

DCA: Dicloroacetato

GLUT1: Transportador de Glucosa 1, *Glucose Transporter 1*

HIF: Factor Inducible por Hipoxia, *Hypoxia Inducible Factor*

ICAM-1: ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1, *Intercellular Adhesion Molecule 1*

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad, *Major Histocompatibility Complex*

mTOR: *mammalian Target Of Rapamycin*

NK: Asesina Natural, *Natural Killer*

O/N: toda la noche, *overnight*

OXPPOS: Fosforilación Oxidativa, *Oxydative Phosphorylation*

PBMC: Células Mononucleares en Sangre Periférica, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: Tampón Fosfato Salino, *Phosphate Buffered Saline*

PD-1: *Programmed cell death protein-1*

PD-L1: *Programmed cell death protein-1 Ligand*

PDH: Piruvato Deshidrogenasa

PKD: Piruvato Deshidrogenasa Quinasa, *Pyruvate Dehydrogenase Kinase*

SFB: Suero Fetal Bovino

SI: Sistema Inmune

TAM: Macrófagos Asociados al Tumor, *Tumor Associated Macrophages*

TIL: Linfocitos Infiltrados en el Tumor, *Tumor Infiltrating Lymphocytes*

TME: Microambiente tumoral; Tumor Microenvironment

RESUMEN / ABSTRACT

En los últimos años, los fármacos metabólicos dicloroacetato (DCA) y metformina han ganado relevancia como agentes anti-tumorales gracias a su capacidad de interferir en el metabolismo energético tumoral. Asimismo, estudios previos han demostrado que estos fármacos pueden actuar contra el cáncer como agentes sensibilizadores a tratamientos de inmunoterapia, entre los que se halla la Terapia Celular Adoptiva (ACT). No obstante, su efecto directo sobre las propias células inmunitarias no se ha explorado en profundidad en la literatura. Por ello, este trabajo se ha centrado en los efectos directos de ambos fármacos sobre la proliferación y capacidad citotóxica de diversas células inmunitarias: células *Natural Killer* (NK) y Linfocitos T Citotóxicos (CTL) aisladas a partir de expansiones de células mononucleares en sangre periférica (eCTL, eNK), así como la línea celular NK-92.

A partir de dichas expansiones, se pudieron obtener células eNK y eCTL con capacidad citotóxica sobre tumores. En los ensayos *in vitro* realizados, la incubación con el fármaco metformina afectó negativamente tanto a la proliferación de eCTL y eNK como a la capacidad citotóxica de las células eNK. Por su parte, el fármaco DCA no tuvo efecto negativo sobre la proliferación celular y permitió aumentar considerablemente la capacidad citotóxica de las eCTL, incluso frente a una línea celular de leucemia resistente a la apoptosis (Mec-1 Bcl-x_L). En el caso de las células NK-92, que mostraron alta capacidad citotóxica ya desde ratios célula efectora:diana reducidos, la incubación con fármacos metabólicos no reportó efectos positivos ni en su crecimiento ni en su capacidad citotóxica frente a tumores. De manera general, los resultados de este estudio permiten enfatizar que el uso de fármacos metabólicos no solamente afecta a la población de células neoplásicas, sino también al crecimiento y al potencial anti-tumoral de las células inmunitarias que la combaten.

In recent years, the metabolic drugs dichloroacetate (DCA) and metformin have gained relevance as anti-tumoral agents due to their capacity to interfere with the tumoral energetic metabolism. Likewise, as it has been demonstrated in previous studies, these drugs can act against cancer as sensitising agents improving the effect of immunotherapies such as Adoptive Cell Therapy (ACT). However, their direct effect on immune cells has not yet been examined, in depth, in literature. Thus, this project focuses on the direct effects both drugs may exert on the proliferation and cytotoxic activity of different immune cells: Natural Killer (NK) and Cytotoxic T Lymphocytes (CTL) isolated from peripheral blood mononuclear cells expansions (eCTL, eNK), as well as the NK-92 cell line.

*From such expansions, both eNK and eCTL cells displaying cytotoxicity against tumors could be obtained. In the *in vitro* tests developed, incubation with metformin negatively affected the proliferation of eCTL and eNK cells as well as the cytotoxicity of eNK cells. On its part, the metabolic drug DCA did not show adverse effects on cell proliferation and allowed a considerable increase of the cytotoxic activity of eCTL – even against an apoptotic resistant leukaemia cell line (Mec-1 Bcl-x_L). Regarding the NK-92 cell line – able to display great cytotoxic activity already from low effector:target ratios – positive effects after the incubation with metabolic drugs were not reported neither on cell proliferation nor on their cytotoxicity against tumors. On the whole, results from this project allow to emphasise that the use of metabolic drugs does not only affect the neoplastic cell population but also the growth and anti-tumoral potential of the immune cells which counteract it.*

1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1.1 El cáncer y su metabolismo

Según la Organización mundial de la Salud, el cáncer se define como el conjunto de enfermedades que pueden surgir en diversos órganos o tejidos del cuerpo cuando se produce un crecimiento descontrolado de células anormales las cuales, en ocasiones, podrían salir de sus localizaciones habituales invadiendo otras zonas del cuerpo. Este último proceso es el conocido como metástasis.

La transformación de célula normal del tejido a célula tumoral comprende un conjunto de cambios que darán al tumor sus capacidades malignas y explicarán la resistencia a diversos tratamientos. Con el fin de conceptualizar los cambios que aparecen en la transformación neoplásica, se han propuesto una serie de *hallmarks* (figura 1.1) o bien características comunes del cáncer (1):

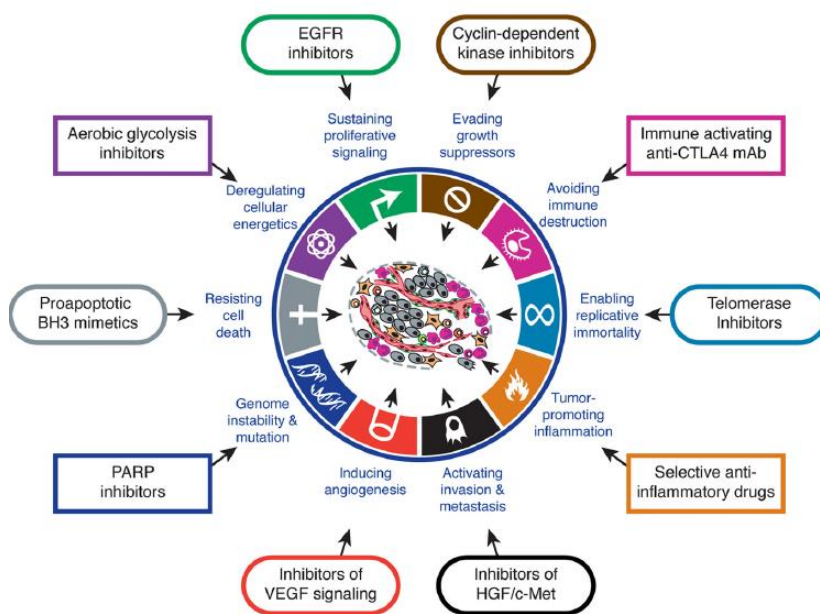


Figura 1.1. Diagrama que recoge los denominados *hallmarks* del cáncer junto a aproximaciones terapéuticas enfocadas en cada uno de ellos.

Esta imagen incluye los *hallmarks* denominados de 'nueva generación' y se mantiene como la versión de estos más actualizada hasta la fecha desde su publicación en el año 2011(1).

Uno de los cambios que resulta especialmente relevante para este trabajo es la **reprogramación del metabolismo energético celular**, concretamente la del **metabolismo glucídico**, que permite la proliferación rápida de las células tumorales.

Las células normales, en condiciones aerobias consiguen energía en forma de ATP mayoritariamente a partir de la glucosa. Este proceso se inicia con la glucólisis en el citosol, obteniéndose piruvato como producto final. Éste es destinado a la mitocondria, donde tiene lugar el ciclo de los ácidos tricarbónicos o ciclo de Krebs y la posterior cadena de transporte de electrones, permitiéndose así la obtención de ATP por vía de la fosforilación oxidativa (u OXPHOS).

En condiciones de escasez de oxígeno o hipoxia, las células normales también producirán piruvato a partir de la glucosa mediante la glucólisis, pero este será derivado a lactato (por fermentación láctica) en lugar de ser transportado a la mitocondria. De esta manera, se consigue ATP mayoritariamente por la vía de la glucólisis, vía hasta 18 veces menos eficiente en la producción de ATP que la vía OXPHOS.

Por su parte, las células tumorales cuentan con la particularidad de emplear preferentemente la vía de la glucólisis como fuente mayoritaria de ATP incluso en condiciones aerobias (figura 1.2). Este fenómeno es el conocido como **efecto Warburg** o glucólisis aerobia (2).

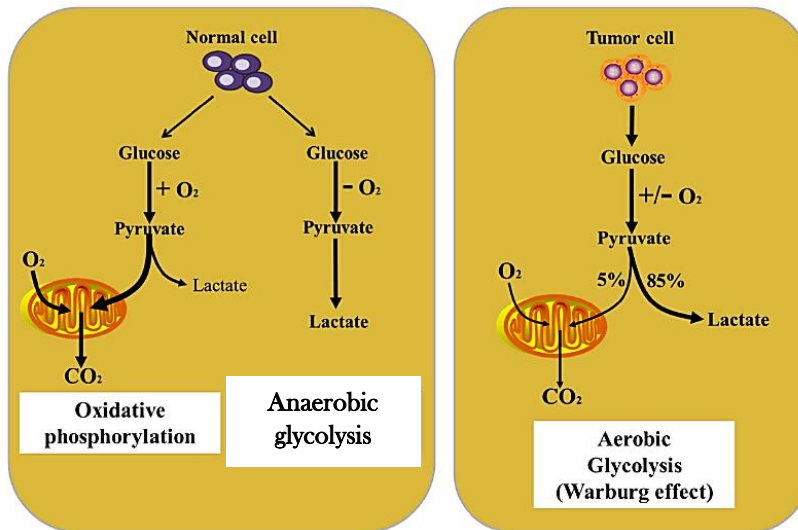


Figura 1.2 Esquema representativo de la preferencia por las distintas vías celulares de obtención de ATP a partir de glucosa según la presencia de oxígeno. Visión comparativa entre células normales (izquierda) y tumorales (derecha). Imagen adaptada (2).

Siendo este un tipo de metabolismo mucho menos eficiente desde el punto de vista energético, cabe preguntarse qué ventajas puede presentar para las células tumorales la remodelación metabólica:

- **Permite la obtención rápida de energía:** Las células tumorales son células en crecimiento, por lo que su objetivo será conseguir energía de la manera más rápida posible y, aunque tenga menor eficiencia, la glucólisis aerobia es una vía más veloz que OXPHOS (3).
- **Acumulan materiales para rutas anabólicas:** Al tener que realizarse la glucólisis un número elevado de veces, se consigue una mayor cantidad de intermediarios que destinar a otras vías de síntesis de macromoléculas, fenómeno que también se ha observado en tejidos embrionarios sanos en desarrollo (1).
- **Evita el crecimiento de otras poblaciones de células:**
 - Por una parte, tanto por condiciones de hipoxia (comunes en tumores sólidos, que pueden ser compactos y estar mal vascularizados) como por mutaciones de diversos oncogenes (como Ras), se favorece en los tumores la síntesis de los factores de transcripción inducibles por hipoxia HIF1 α y HIF2 α . Estos permiten aumentar la cantidad y actividad de enzimas glucolíticas y la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1, dando paso a que la célula tumoral tome mayor cantidad de glucosa del medio (2). Esta competencia por recursos energéticos favorece a las células tumorales frente a, por ejemplo, células inmunitarias con capacidad anti-tumoral presentes en el microambiente tumoral (TME) (2).
 - Por otra parte, y como consecuencia de la alta tasa de fermentación láctica, las células tumorales producen grandes cantidades de lactato. Este es expulsado al exterior celular por co-transporte junto a un protón, de manera que el TME queda acidificado. La acidez generada no solo será perjudicial para la actividad anti-tumoral de células inmunitarias, sino que además permitirá la selección de células tumorales con fenotipos más agresivos e invasivos (4).

1.2 Fármacos metabólicos en el tratamiento de tumores

Vista la importancia de la remodelación metabólica para el avance del tumor, han surgido diversos estudios que proponen terapias anti-tumorales basadas en el empleo de fármacos metabólicos (5,6). Con estas terapias, se busca interferir el proceso de obtención de energía tumoral o incluso conseguir

una sensibilización del tumor a otros tipos de tratamiento a combinar con el uso de fármacos metabólicos.

Dos de los fármacos metabólicos más relevantes en la última década, y estudiados en este proyecto, son los siguientes:

- **Metformina:** La metformina es una biguanida semisintética comúnmente empleada en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. Habiéndose registrado descensos en la aparición y mortalidad de diversos tipos de cáncer en pacientes diabéticos tratados con metformina, numerosos estudios han comprobado los efectos de este tratamiento en tumores de pacientes no diabéticos, obteniéndose resultados satisfactorios (5). La capacidad anti-tumoral de la metformina podría deberse a varios mecanismos:
 - **Inhibe parcialmente el complejo I de la cadena de transporte electrónico mitocondrial**, disminuyendo así la fosforilación oxidativa y resultando en un aumento del ratio AMP/ATP intracelular. Este cambio activa a la proteína quinasa dependiente de AMP (AMPK) cuya vía inhibirá procesos anabólicos esenciales para la proliferación de la célula tumoral (7).
 - Por otro lado, la activación de AMPK **favorecerá la degradación del ligando PD-L1** en las células tumorales. De esta manera, no habrá unión de PD-L1 con el receptor de superficie PD-1 de los linfocitos T citotóxicos, y la respuesta inmune anti-tumoral de los CTL se mantendrá activa (8).
- **DCA:** El dicloroacetato (DCA) es un fármaco empleado desde hace décadas como tratamiento de la acidosis láctica por su capacidad de disminuir la síntesis de lactato. Como resumen, su mecanismo de acción está basado en la inhibición de la piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK), inhibidora de la enzima piruvato deshidrogenasa (PDH). Con PDH activa, el piruvato obtenido de la glucólisis será forzosamente transformado a acetil-CoA, en vez de a lactato, obligando a la célula a emplear OXPHOS como vía de obtención de energía (6).
De esta manera, se consigue **revertir el efecto Warburg** con las consecuencias negativas que ello conlleva para la proliferación tumoral. Además, se verá reducida la acidez del TME al disminuir la cantidad de lactato transportada al exterior celular, favoreciendo la supervivencia de otras poblaciones celulares no tumorales (9).

El interés de seguir líneas de investigación en este área radica en que los fármacos mencionados son generalmente seguros para el paciente, por lo que su uso o combinación con otros tratamientos anti-tumorales podría ayudar a reducir la toxicidad o gravedad de los efectos secundarios de los mismos.

1.3 El microambiente tumoral (TME)

Es necesario tener en cuenta que un tumor no es únicamente una masa de células cancerígenas, el resto de componentes del TME van a condicionar su crecimiento y evolución. El TME es de composición variable según el tipo de tumor. Además de contener vasos sanguíneos cercanos y componentes de matriz extracelular, habitualmente cuenta con la presencia de las siguientes poblaciones celulares:

- **Linfocitos infiltrados en el tumor** (*Tumor Infiltrating Lymphocytes*, TIL): Células del sistema inmunitario con capacidad de acceder al interior de la masa tumoral. Se incluyen en este grupo linfocitos T, linfocitos B, células NK (del inglés *Natural killer*, o asesinas naturales) y células NKT, los cuales pueden presentar actividad anti-tumoral (10).

- **Macrófagos asociados al tumor** (*Tumor Associated Macrophages*, TAM): Macrófagos infiltrados en el tumor, que generalmente ejercen funciones pro-tumorigénicas como la secreción de factores pro-angiogénicos y la desactivación de la respuesta inmune anti-tumoral linfocitaria (11).
- **Fibroblastos asociados al cáncer** (*Cancer-Associated Fibroblasts*, CAF): Células con capacidad de secretar factores de crecimiento, factores pro-angiogénicos y componentes de la matriz extracelular, favoreciendo así el desarrollo tumoral (12).

1.4 El sistema inmunitario en el cáncer

El Sistema Inmunitario (SI) es el responsable de reconocer y atacar agentes infecciosos patogénicos, pero también aquellos tumores que puedan surgir en el organismo. La respuesta inmune desencadenada puede clasificarse en dos grandes categorías (12):

- **Respuesta innata:** Tipo de respuesta rápida e inespecífica. Las principales células efectoras de este tipo de respuesta son macrófagos, granulocitos, células dendríticas y células NK.
- **Respuesta adaptativa:** Respuesta específica basada en el reconocimiento de antígenos concretos. Es más lenta y comprende la respuesta celular llevada a cabo por linfocitos T y la respuesta humoral propia de los linfocitos B. Se caracteriza por exhibir memoria inmunológica.

Los tumores que pueden ser reconocidos por el SI (tumores inmunogénicos) desarrollan distintos mecanismos para escapar del ataque inmune, siendo este otro de los *hallmarks* del cáncer recogidos en el punto 1.1 (1). Como ya se ha introducido en ese mismo apartado, el elevado gasto de recursos energéticos y la alta producción de lactato con la consecuente acidificación del TME podrían ser considerados ejemplos de estos mecanismos de escape (2,4).

Por último, señalar que no todas las células de sistema inmunitario son anti-tumorales. En las últimas décadas se ha podido apreciar como células reguladoras, inflamatorias o con capacidad de secretar determinados factores (angiogénicos, proinflamatorios...) pueden favorecer la aparición y crecimiento de tumores y la supresión de la respuesta inmune contra ellos (12).

1.4.1 Inmunidad anti-tumoral: capacidad citotóxica de CTL y NK.

Dentro de las células inmunes con funciones anti-tumorales ya enumeradas, en este trabajo se estudiará la capacidad citotóxica de células NK y linfocitos T citotóxicos (CTL) frente a líneas celulares tumorales:

- **Células NK:** Pertenecientes a la inmunidad innata. Su activación no depende de reconocimiento antigénico, sino del establecimiento de un balance entre señales activadoras e inhibitorias, siendo de especial importancia en este último grupo el reconocimiento del MHC-I propio como mecanismo para evitar autoinmunidad. Cabe destacar el papel del receptor CD16 en células NK puesto que, al tener capacidad de reconocer fracciones Fc de anticuerpos IgG, permitirá la activación de la célula NK en presencia de anticuerpos dirigidos contra el tumor. De esta manera, se desencadena un proceso de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediado por NK (13).
- **Linfocitos T citotóxicos (CTL o linfocitos T CD8⁺):** Pertenecientes a la inmunidad adaptativa, son los efectores de la respuesta celular. Para su activación requieren interacción con MHC-I y presencia de señales co-estimuladoras, por lo que su respuesta depende de reconocimiento antigénico (14).

Ambos tipos celulares atacan a las células tumorales por dos mecanismos principales: **exocitosis granular** e **interacción de ligandos mortales** con sus receptores (15). En la exocitosis granular se liberan gránulos citoplasmáticos que contienen perforina y granzimas. La perforina, en presencia de cantidades elevadas de Ca^{++} propias del medio extracelular, forma poros en la membrana plasmática de la célula “diana” y permite a las granzimas (pertenecientes a la familia de las serín-proteasas) acceder al interior celular y, finalmente, provocar la muerte de la célula. Por su parte, los ligandos mortales, mayoritariamente el ligando de Fas (FasL) y TRAIL, al ligar a sus receptores Fas o DR4/DR5, respectivamente, provocan la muerte de la célula “diana” por apoptosis dependiente de caspasas (14).

1.4.2 Terapia celular adoptiva y uso combinado con fármacos metabólicos: antecedentes.

En años recientes, la inmunoterapia está ganando importancia en la búsqueda de nuevas aproximaciones terapéuticas contra el cáncer. Tratamientos capaces de reforzar la respuesta inmune anti-tumoral, como los basados en el uso de anticuerpos monoclonales o en la inhibición de puntos de control inmunes, se están empleando con éxito en clínica en la actualidad (16).

Otra aproximación de inmunoterapia de interés es la **Terapia Celular Adoptiva (ACT)**. Esta se basa en el empleo de linfocitos T o células NK expandidos y activados *in vitro* con el fin de aumentar su respuesta anti-tumoral. Actualmente se están desarrollando distintas modalidades de este tipo de terapia:

- **Terapias basadas en TIL:** Se aíslan linfocitos T y células NK infiltradas en el tumor que presentan capacidad de reconocer y atacar a este. Tras una expansión *in vitro* en presencia de interleucinas y células estimuladoras, los TILs se reinfunden al paciente (17).
- **Terapia basada en la modificación genética de células T:** En este caso, las células empleadas se aíslan a partir de sangre periférica del paciente y se modifican genéticamente para que adquieran capacidad de reconocer al tumor. La aproximación más exitosa actualmente es la **generación de células CAR-T**. Estas células T expresan un receptor de antígeno quimérico (CAR) formado por una fracción de anticuerpo que reconoce un antígeno tumoral y una fracción intracelular construida con elementos tomados de diversas vías de señalización celular. De esta forma, son células capaces de generar una respuesta inmune altamente específica y potente (17).
- **Terapias basadas en células NK alogénicas:** Estas pueden provenir tanto de donantes sanos o de cordón umbilical (18) como de líneas establecidas, como NK-92. Actualmente, se estudia su modificación con receptores CAR (19).

Uno de los retos a superar en el desarrollo de las terapias basadas en ACT es la supresión de la respuesta inmune anti-tumoral llevada a cabo por el propio tumor (16). El metabolismo de las células tumorales (apartado 1.1) es uno de los responsables de la desactivación de la respuesta inmune anti-tumoral. Por ello, una posible solución explorada por nuestro grupo, en colaboración con el grupo de Martín Villalba del INSERM (Montpellier, Francia), es la combinación de inmunoterapia con el uso de fármacos metabólicos (20,21). Así, interfiriendo en los procesos metabólicos favorables para el tumor, se pretende mantener la función de las células efectoras de la citotoxicidad anti-tumoral aumentando la eficacia de este tipo de terapias.

2. OBJETIVOS

Habiéndose demostrado la utilidad del empleo de los fármacos metabólicos DCA y metformina para el tratamiento de tumores, se quiere determinar cómo su presencia puede afectar a células inmunes efectoras. Esta comprobación es de especial interés ante la perspectiva de combinar terapia celular adoptiva (ACT) con el uso de fármacos metabólicos. Así pues, los objetivos del trabajo fueron:

- Aislar, expandir y activar *in vitro* células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a partir de muestras sanguíneas de pacientes sanos para generar eCTL y eNK.
- Determinar el efecto de la incubación con fármacos metabólicos (DCA/metformina) sobre el crecimiento celular, tanto de eCTL y eNK aisladas como de células de la línea establecida NK-92.
- Determinar si la presencia de fármacos metabólicos puede afectar a la capacidad citotóxica de estas células inmunitarias efectoras contra células de diferentes líneas tumorales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cultivo y mantenimiento de líneas celulares

Durante la duración de los experimentos, se cultivaron las siguientes líneas celulares (Tabla 3.1):

Tabla 3.1. Breve descripción de las líneas celulares establecidas que se emplearon en el trabajo

MM.1S	Línea celular aislada de mieloma múltiple humano
Mec-1 WT	Línea aislada de paciente de B-CLL original
Mec-1 Bcl-x _L	Derivada de Mec-1. Sobreexpresa la proteína antiapoptótica Bcl-x _L .
Mec-1 Mcl-1	Derivada de Mec-1. Sobreexpresa la proteína antiapoptótica Mcl-1.
PLH	Línea celular linfoblastoide transformada por el virus de Epstein-Barr
NK-92	Línea celular establecida de células NK (<i>Natural killer</i>)

De las anteriores, las siguientes líneas se mantuvieron en cultivo continuamente a lo largo del trabajo:

- **MM.1S** : Línea celular aislada de mieloma múltiple humano.
- **Mec-1 WT, Mec-1 Bcl-x_L y Mec-1 Mcl-1**: Las líneas Mec-1 son líneas celulares aisladas de sangre periférica de un paciente de leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL) (22). La referida como WT es la línea Mec-1 original, la tipo Bcl-x_L sobreexpresa la proteína Bcl-x_L y la tipo Mcl-1 sobreexpresa la proteína Mcl-1. Estas dos últimas fueron obtenidas con anterioridad por el grupo de investigación y cedidas para la realización de los experimentos. Tanto Bcl-x_L como Mcl-1 son proteínas antiapoptóticas pertenecientes a la familia Bcl-2, implicada en la vía intrínseca o mitocondrial de la apoptosis.
- **PLH**: Línea celular linfoblastoide empleada para estimular las células inmunitarias en expansión.

Se mantuvieron los cultivos de estas líneas tumorales en frascos de 25cm² con tapón con filtro en medio RPMI 1640 GlutaMAX™ (Fisher Scientific) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB, Sigma) y antibióticos (penicilina: 10000U/ml y estreptomycin: 10mg/ml, Sigma). A lo largo del trabajo, este medio será denominado medio RPMI completo.

Los frascos se conservaron en un incubador termostatzado a 37°C, al 5% CO₂ y humedad constante. Se fueron realizando pases de los cultivos cuando las células fuesen a alcanzar la confluencia (aproximadamente 10⁶ células/ml, cada 2-4 días), entonces se diluían a 200.000 células por mililitro. Todas las manipulaciones se realizaron en campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad.

Por otro lado, se empleó en los experimentos una línea celular de células NK:

- **NK-92:** Línea celular establecida de células *Natural Killer* o Asesinas Naturales con características semejantes a las de células NK activadas (alta citotoxicidad). Tienen capacidad de reconocer células infectadas o tumorales y atacarlas lisando su membrana. La línea empleada es una línea transfectada que expresa CD16 y un fluoróforo verde (ZsGreen).

Estas células no se mantuvieron en cultivo de forma rutinaria, sino que fueron amablemente cedidas por el investigador del grupo David Giraldo previamente a cada ensayo de citotoxicidad. A diferencia de las líneas tumorales, la línea NK-92 crece en medio α -MEM (Gibco), suplementado con 12.5% SFB (Sigma), 12.5% de suero de caballo (Gibco), 1% de GlutaMAX™ (Gibco) y antibióticos (penicilina: 10000U/ml y estreptomocina: 10mg/ml, Sigma). Además, se adicionó IL-2 (25UI/ml, Peprotech).

3.1.1 Determinación de la densidad y viabilidad celular por tinción con azul Trypan.

Se comprobó periódicamente la densidad y viabilidad celular realizando contajes en cámara de Neubauer con tinción con colorante azul Trypan. Este colorante tiñe de azul a células que hayan sufrido daños en la membrana, mientras que queda excluido de aquellas vivas o apoptóticas que aún mantengan su membrana íntegra. Para el contaje, se mezclaron a partes iguales una solución del colorante y la suspensión celular (homogeneizada con pipeta de vidrio), siendo así 2 el factor de dilución. Se pasó la mezcla a una cámara Neubauer y se realizó el contaje en microscopio óptico.

Los cálculos llevados a cabo fueron los siguientes:

$$\text{densidad celular (células/ml)} = \frac{\text{células viables} \cdot \text{factor de dilución} \cdot 10^4}{n^{\circ} \text{ de cuadrantes contados}}$$

$$\% \text{ viabilidad celular} = \frac{\text{células viables}}{\text{células totales}} \cdot 100$$

3.1.2 Congelación y descongelación de células

Se mantuvieron viales de las distintas líneas celulares en congeladores de -80°C o en contenedores de nitrógeno líquido (-172°C). Se emplearon criotubos de fondo redondo de 2ml de capacidad (Fisher Scientific) en los que se congelaron las células junto a medio RPMI completo con un 10% de Dimetil sulfóxido (DMSO). Este es añadido para actuar como agente crioprotector, evitando la formación de cristales de hielo durante la congelación, disminuyendo así la muerte celular.

Para el establecimiento inicial de los cultivos, o en caso de observarse una reducción de la viabilidad en los cultivos de líneas tumorales mantenidos, se recurrió a la descongelación. Para ello, se resuspendió el contenido del criotubo seleccionado en medio RPMI completo a temperatura ambiente. Posteriormente, se transfirió el contenido a un tubo de fondo cónico Falcon™ de 15ml (Corning), al que se añadió medio hasta completar un volumen de 10ml. Tras una centrifugación de 5 minutos a 524g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en 10ml de medio RPMI completo. Por último, se sembraron en frascos de 25cm² con tapón con filtro que se mantuvieron en el incubador.

3.2 Comprobación de la sobreexpresión de proteínas por Western Blot.

Con el fin de comprobar que las células tumorales a mantener en cultivo hubieran conservado la sobreexpresión de proteínas de interés tras un largo periodo de congelación, se procedió a realizar un ensayo Western Blot. Se quiso comparar la expresión relativa de las proteínas Bcl-x_L y Mcl-1 en las líneas genéticamente modificadas frente a las nativas o *wild type*.

- Preparación de los extractos celulares:

Tras seguir el protocolo de descongelación desarrollado en el apartado 3.1.3, se sembraron las siguientes líneas celulares: Mec-1 WT, Mec-1 Bcl-x_L, Mec-1 Mcl-1 y MM.1S.

Se tomaron 5x10⁶ células de cada línea y se centrifugaron 5 minutos a 450g. El pellet obtenido de cada tipo celular se lavó con tampón fosfato salino (PBS: NaCl 150mM; K₂HPO₄ · 3 H₂O 8mM; K₂PO₄ 1.6mM; pH 7.4) y posteriormente se resuspendió en 100μl de tampón de lisis (composición detallada en Anexo I, Tabla A.1). Tras una incubación de 30 minutos en hielo, se centrifugaron los lisados a 11000g y 4°C durante 25 minutos y se conservó el sobrenadante, puesto que contiene las proteínas citoplasmáticas. Para calcular la concentración de proteínas en cada lisado, se recurrió a la técnica colorimétrica BCA (*Bicinchoninic acid assay*), empleándose un kit comercial (Micro BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, se prepararon las mezclas a cargar en el gel. Dado que el volumen final se fijó a 30μl por muestra, se añadieron 10μl de tampón de carga 3x (Tabla A.2, Anexo I) y cantidades equivalentes en cantidad de proteína de cada uno de los lisados. El volumen se completó hasta los 30μl con PBS en los casos necesarios y las muestras se conservaron a -20°C hasta su utilización.

- Electroforesis en gel de poliacrilamida:

Se procedió a la separación de las proteínas de los lisados celulares en función de su peso molecular. Para ello, se preparó un gel de acrilamida/bis-acrilamida dividido en dos zonas de misma composición, pero distinto porcentaje del polímero. Siendo un gel vertical, en la zona superior se preparó el gel de *stacking* (de aproximadamente 2cm) y en la zona inferior el gel *resolving* (de unos 10cm y porcentaje de polímero del 15%), en el que tuvo lugar la separación. Las composiciones de ambos geles se incluyen en el Anexo I, Tabla A.3.

Una vez el gel estuvo preparado, se cargaron en él las distintas muestras que previamente se habían descongelado y desnaturalizado por calor (5 minutos a 95°C) y el marcador de peso molecular (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo). Tras colocar el gel en una cubeta y sumergirlo en tampón de carrera de electroforesis (Trizma 19mM, Sigma; glicina 192mM, Panreac; 0.01% SDS, Merck), se aplicó un campo eléctrico de 180V y 20mA con una fuente hasta que el frente de muestras hubo recorrido aproximadamente la longitud completa del gel.

- Transferencia de las proteínas a membrana

Una vez finalizada la separación de proteínas, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (GE Healthcare), que se sumergió previamente en metanol al 20% en tampón de transferencia (Tris-HCl 48mM, Sigma; glicina 39mM, Sigma; 0.0373% SDS, Merck; 20% metanol grado HPLC, Panreac; pH 8.3) durante 2 minutos. Se llevó a cabo la transferencia en un equipo de transferencia semiseca (BioRad) aplicando un campo eléctrico de 20V y 400mA durante una hora en tampón de transferencia.

- Análisis de las proteínas por Western-Blot.

Con las proteínas ya transferidas, se bloquearon el resto de espacios de la membrana con el fin de evitar uniones inespecíficas a ellos de los anticuerpos que se añadieron posteriormente. Para ello, se sumergió en agitación durante 30 minutos la membrana en una disolución de leche en polvo desnatada al 5% (p/v) en tampón B (timerosal 0.1g/l; Tween 5ml/l; disueltos en PBS). Se retiró el agente bloqueante realizando tres lavados de 10 minutos con tampón B.

La membrana se cortó de forma horizontal a la altura del marcador de 40kDa de peso para poder incubar cada parte con el anticuerpo primario correspondiente: Mcl-1 estará presente en la zona de pesos moleculares mayores a 40kDa y Bcl-x_L en la de pesos inferiores.

Se llevó a cabo la incubación con anticuerpo primario (Tabla 3.2) diluido en tampón B al que se añadió un 5% de BSA (p/v) y un 0.05% (p/v) de NaN₃, se dejó incubar a 4°C y en agitación durante toda la noche. Finalizada la incubación, se lavó la membrana 3 veces con tampón B y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario es un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano. Para esta incubación, el anticuerpo se diluyó en proporción 1:20000 en tampón B con un 2% de leche desnatada en polvo (p/v) y se dejó actuar durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Pasada la hora, se realizaron tres lavados con tampón B.

Tabla 3.2. Anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas por Western Blot.

Anticuerpo anti-	Especie	Tipo de Ac	Concentración	Casa comercial
Mcl-1	Conejo	PC	1/1000 (v/v)	Santa Cruz
Bcl-x _L (54H6)	Conejo	MC	1/1000 (v/v)	Cell Signaling

Para la detección de proteínas de interés, se adicionó un sustrato quimioluminiscente (Pierce® ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) con el que la enzima conjugada al anticuerpo secundario reaccionó durante un tiempo de 1 minuto. Finalmente, se detectó el nivel de luminiscencia obtenido para cada muestra empleando un aparato detector de luminiscencia Amersham Imager 600.

Como control de carga de las muestras en la membrana se realizó un revelado de la proteína α-tubulina. Esta es una proteína estructural que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto, por lo que es abundante en todo tipo de células. Si la carga es correcta, se esperan conseguir bandas a la misma altura para cada lisado y con niveles altos y semejantes de luminiscencia.

Se siguió un protocolo semejante al del revelado de las otras proteínas con cambios en los anticuerpos empleados. Las características del anticuerpo primario quedan recogidas en la siguiente tabla (Tabla 3.3). En este caso, el anticuerpo secundario reconoce IgG de ratón y está conjugado a la enzima fosfatasa alcalina, por lo que el sustrato de reacción que se añadió para generar luminiscencia fue diferente: PhosphaGLO AP Substrate, KPL.

Tabla 3.3. Anticuerpo primario empleado en la detección de α-tubulina como control de carga.

Anticuerpo anti-	Especie	Tipo de Ac	Concentración	Casa comercial
α-tubulina (clon B-5-1-2)	Ratón	MC	1/10000 (v/v)	Cell Signaling

- Densitometría

Se empleó el programa informático *ImageJ* para el análisis semi-cuantitativo de las bandas obtenidas en el inmunoensayo Western Blot. Este programa permite transformar el grado de intensidad de las bandas de proteínas detectadas en medidas cuantificables, para así poder compararlas entre sí.

3.3 Obtención y expansión de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

La obtención de células inmunitarias a partir de PBMC, se basó en el protocolo descrito previamente por nuestro grupo (20,23), con algunas modificaciones que se detallarán a continuación, y empleando muestras de sangre parcialmente procesadas (*LeukoPaks*) extraídas de donantes sanos, proporcionadas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

3.3.1 Extracción de PBMC de muestras de donantes sanos.

Para poder aislar los PBMC del resto de componentes de la sangre, se creó un gradiente de densidad utilizando *Ficoll-Paque*. Para ello se vertieron 10ml de Histopaque®-1077 (Sigma) en tubos de fondo cónico de 50ml de capacidad y, sobre ellos, se añadieron cuidadosamente 10ml de muestra, sin mezclar ambas fases. Los tubos se centrifugaron a 1200g durante 25 minutos, consiguiéndose así la separación de los distintos componentes de la muestra.

Las células mononucleares de interés forman un anillo blanco en la interfase *Ficoll* – plasma sanguíneo. Este anillo se recogió con pipeta y se transfirió a un nuevo tubo de fondo cónico, en el que se realizó un lavado con PBS. Tras una centrifugación a 450g durante 5 minutos, el pellet celular obtenido se diluyó en medio RPMI completo. En este punto se determinó la concentración celular obtenida mediante tinción con azul Trypan, ya descrita en el apartado 3.1.2.

3.3.2 Expansión *in vitro* de CTL y NK.

Estas células mononucleares obtenidas se sembraron en las condiciones adecuadas para conseguir la activación y expansión de los CTL y células NK presentes:

- Los cultivos se establecieron en frascos de 25cm² con tapón con filtro en medio RPMI completo. La concentración celular inicial fue de 10⁶ células/ml y se sembraron 10ml totales.
- Se añadieron al medio IL-2 (100IU/ml, Peptrotech) e IL-15 (25IU/ml, Miltenyi). Ambos factores son recombinantes humanos.
- Se co-cultivaron los PBMC aislados con las células estimuladoras PLH en un ratio 1:1. Esta línea debe ser inactivada previa adición al cultivo para evitar su crecimiento. Para ello, las células PLH, a una concentración de 5·10⁵ células/ml en medio RPMI sin suplementar, se expusieron a mitomicina C (Sigma) a una concentración de 25µg/ml durante 2 horas en el incubador a 37°C. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS con el cual se mantuvieron durante 30 minutos en la estufa para que el exceso de mitomicina C se expulsara del interior celular. Las células, ya inactivadas, se añadieron en la proporción adecuada al cultivo de PBMC establecido o se conservaron congeladas en viales de 10⁷ células, siguiéndose el protocolo especificado en el apartado 3.1.3.

Estas expansiones se mantuvieron en cultivo durante un máximo de 3 semanas. Durante este periodo, cada 3-4 días se comprobó la viabilidad y densidad celular por tinción con azul Trypan y la distribución de las poblaciones celulares del cultivo mediante citometría de flujo (técnica descrita en el siguiente

apartado). Además, cada 3-4 días se renovó el medio de cultivo, las interleucinas y las células PLH y, en caso de ser necesario, se ajustó de nuevamente la concentración celular de PBMC a 10^6 células/ml.

Los CTL y NK se consideraron lo necesariamente activados tras una semana en expansión, desde entonces fueron denominados eCTL y eNK, respectivamente. Es a partir de este momento cuando pudieron empezar a ser utilizados en ensayos de citotoxicidad contra tumores.

3.3.3 Citometría de flujo con marcaje CD3/CD56

Tras establecer las expansiones y durante las comprobaciones realizadas durante su mantenimiento, se quiso también determinar la proporción de CTL frente a NK presentes. Esto se puede estudiar teniendo en cuenta la expresión diferencial de las siguientes proteínas de membrana en cada tipo celular: CD3 es expresado en linfocitos T y CD56 en células NK.

Para el marcaje, se tomaron $5 \cdot 10^4$ células y se pasaron a una placa de 96 pocillos de fondo redondo (por duplicado para estudiar un control con marcaje y otro sin marcaje de cada muestra). Tras una centrifugación de 5 minutos a 524g, se retiró el medio y se resuspendió el contenido de cada pocillo en 100µl de PBS con un 5% de SFB. Se marcaron los controles positivos con los anticuerpos citados en la tabla y se dejó incubar a 4°C durante 30 minutos (Tabla 3.4). Tras una nueva centrifugación de 5 minutos a 524g, se trasvasó el contenido de los pocillos a tubos de citómetro a los que se añadieron al menos 200µl de PBS con 5% de SFB. Finalmente, se procedió al análisis por citometría de flujo.

Tabla 3.4. Marcajes empleados para la determinación por citometría de flujo de las poblaciones CD3⁺/CD56⁺.

Anticuerpo anti-	Especie	Tipo de Ac	Concentración	Casa comercial
CD3-FITC	Ratón	MC	1/100 (v/v)	Miltenyi
CD56-APC	Ratón	MC	0.5/100 (v/v)	Miltenyi

El citómetro de flujo empleado para este trabajo fue el modelo *BD FACSCalibur* (BD Biosciences). Los datos de citometría obtenidos se analizaron con el programa informático *FlowJo 7.6.1*.

3.4 Experimentos de citotoxicidad

Con los siguientes ensayos, se quiere probar la capacidad citotóxica contra tumores de las células inmunitarias (línea NK-92 y PBMC aislados: eNK y eCTL) tras incubación con fármacos metabólicos.

3.4.1 Incubación con fármacos metabólicos

Las células NK-92 y los PBMC (tras al menos 7 días en expansión) se incubaron en presencia de fármacos metabólicos durante las 72 horas previas al ensayo de citotoxicidad. Para ello, se sembraron en placas estériles 3 pocillos, cada uno con un total de 2ml del medio correspondiente y densidad celular de $1 \cdot 10^6$ células/ml para PBMC o $0.2 \cdot 10^6$ células/ml para NK-92. Se mantuvieron las concentraciones de interleucinas ya especificadas y, en caso de las PBMC, se añadieron células estimuladoras PLH inactivadas en ratio 1:1.

En el momento de la siembra, se añadieron los fármacos correspondientes a cada pocillo en las concentraciones especificadas en la siguiente imagen (Figura 3.1). Estas mismas cantidades se añadieron de nuevo a las 48 horas de incubación.

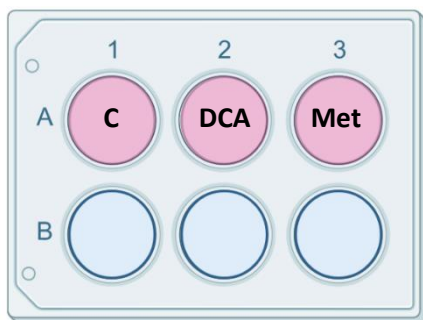


Figura 3.1. Representación de placa con cultivo de la línea NK-92 o de PBMC aisladas. En cada pocillo, en un volumen total de 2ml del medio correspondiente se añaden las siguientes concentraciones de fármacos:

- **C** : Control sin fármacos metabólicos.
- **DCA** : Concentración final de DCA 5mM.
- **Met** : Concentración final de metformina 2mM.

3.4.2 Separación de poblaciones celulares en expansiones de PBMC

Al ser una línea establecida, los cultivos de NK-92 solo cuentan con células NK de mismas características. En cambio, los cultivos de PBMC obtenidos de muestras de sangre presentan al menos dos poblaciones diferenciadas, CTL y células NK, que deben separarse antes de proceder a los ensayos de citotoxicidad.

Se empleó un kit comercial de selección positiva de la población CD3⁺ (EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit, StemCell), siguiéndose las instrucciones del fabricante. Su funcionamiento se basa en la unión específica a CD3 de complejos de anticuerpos que llevan anexionadas pequeñas partículas magnéticas. De esta forma, las células que expresan CD3 (células CD3⁺, población de linfocitos T) podrán ser retenidas por un imán mientras que las restantes, en este caso la población de NK, podrán ser retiradas y conservadas en otro recipiente. Este proceso se repitió con las células incubadas en cada una de las 3 condiciones de estudio.

Para comprobar la eficacia de la separación de las poblaciones de células efectoras CTL y NK (en adelante referidas como eCTL y eNK), se analizaron las suspensiones celulares obtenidas de la separación por citometría de flujo con marcaje CD3/CD56 (mismo procedimiento que en apartado 3.3.3).

3.4.3 Marcaje de PBMC con sonda fluorescente.

Para poder diferenciar la población de células efectoras (inmunitarias) de las células diana (tumorales) en el citómetro de flujo para los ensayos de citotoxicidad, se marcaron las células inmunitarias con una sonda fluorescente. En caso de la línea NK-92, este paso no fue necesario, pues ya presentan fluorescencia al haber sido modificadas genéticamente para inducir la expresión del fluoróforo ZsGreen. Para los PBMC aislados, las células se marcaron con la sonda fluorescente CellTracker™ Green (Life Technologies), cuya fluorescencia también verde es detectable en el canal FL-1 del citómetro empleado.

Para marcarlas, las células se resuspendieron en PBS a concentración de $2.5 \cdot 10^6$ células/ml y se añadió sonda fluorescente a $0.5 \mu\text{M}$. Se incubaron durante 15 minutos a 37°C y se centrifugaron 5 minutos a $340g$. El pellet celular obtenido se resuspendió en medio RPMI completo y se dejó 30 minutos a 37°C para retirar el exceso de sonda. Tras una centrifugación de 5 minutos a $340g$, se resuspendieron las células en RPMI completo a concentración final de $0.5 \cdot 10^6$ células/ml.

3.4.4 Ensayos de citotoxicidad frente a tumores

En estos ensayos se enfrentaron células efectoras (NK-92, eCTL o eNK) a células diana tumorales (Mec-1 WT, Mec-1 Bcl-x_L o MM.1S) y se midió el porcentaje de muerte tumoral conseguido. Se sembraron células efectoras sobre células diana en placas de 96 pocillos de fondo redondo y se dejaron actuar en incubador a 37°C . Los tiempos y ratios efectora:diana variaron según el tipo de experimento, tal y como queda detallado en los próximos sub-apartados.

Transcurrido el tiempo de incubación, la muerte celular de los tumores se determinó por citometría de flujo empleando un marcaje de Anexina-V APC (Immunostep), que presenta fluorescencia roja (canal FL-4 del citómetro empleado). La anexina-V es una proteína que detecta la fosfatidilserina translocada desde el interior de la membrana celular al exterior durante la apoptosis celular, por lo que se consideraron muertas las células positivas para este marcaje.

3.4.4.1 Ensayos con células NK-92.

Para cada línea tumoral y condición de incubación de las células efectoras, se sembraron los siguientes ratios efectora:diana : 0.1:1, 0.5:1, 1:1 y 3:1. Se realizó un ensayo dejando actuar toda la noche (O/N) y dos ensayos con tiempo de actuación de 4 horas.

3.4.4.2 Ensayos con células eNK y eCTL

Para las células efectoras aisladas de muestras sanguíneas, el ratio efectora:diana fue 1:1 para todas las condiciones. En este tipo de ensayo se dejó actuar a las células O/N.

3.5 Análisis estadístico

Se empleó el programa informático *Microsoft Excel* para analizar las posibles diferencias significativas entre los datos, utilizando la prueba de T-Student. Para los datos de las citotoxicidades de células NK-92 frente a tumores en ensayo de 4 horas, el test llevado a cabo fue de dos colas y muestras emparejadas. Para los datos de citotoxicidades de PBMC frente a tumores, los tests realizados fueron de dos colas y para dos muestras de igual varianza (prueba de tipo homocedástica). En ambos casos, las diferencias se consideraron significativas cuando el valor p fue menor que 0.05.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Comprobación de la sobreexpresión de proteínas por Western Blot.

Primeramente, se realizó un ensayo Western Blot para comprobar el mantenimiento de la sobreexpresión de las proteínas de interés en las líneas celulares tumorales cultivadas. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

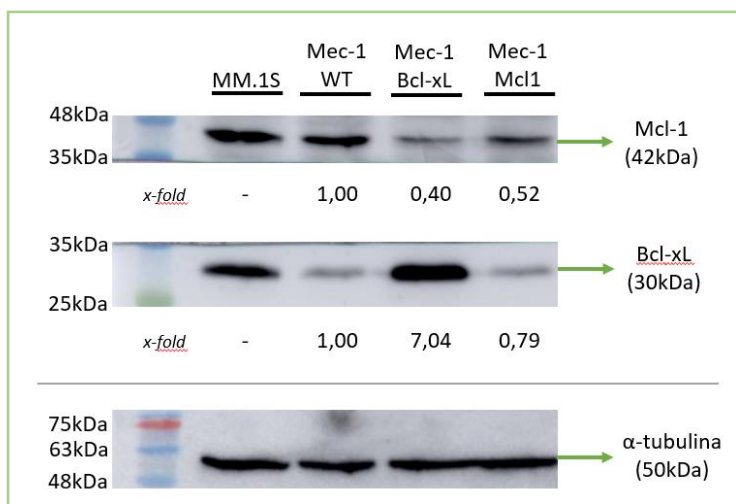


Figura 4.1. Revelado de la membrana de Western Blot. El fragmento de pesos superiores (48-35kDa) se incubó con anticuerpo primario contra Mcl-1 y el de pesos inferiores (35-25kDa) con anticuerpo anti-Bcl-xL. Se incluye bajo las bandas de interés el valor *x-fold*, relativo al ratio en el que varía la cantidad de proteína detectada respecto al valor presente en la línea Mec-1 WT empleada como control.

En la imagen inferior se muestra el revelado de tubulinas empleado como control de carga de la membrana.

Comparando semi-cuantitativamente la intensidad de las bandas (densitometría), se concluyó que las células **Mec-1 Bcl-x_L** mantienen la sobreexpresión de la proteína antiapoptótica Bcl-x_L (Figura 4.1). En comparación con la línea original o *wild type*, la línea modificada genéticamente presenta un incremento notable en la expresión de la proteína Bcl-x_L.

Por su parte, se observó que la línea **Mec-1 Mcl-1 no mantiene la expresión de la proteína Mcl-1**. En comparación con la línea *wild type*, en células Mec-1 Mcl-1 la expresión de Mcl-1 se reduce a aproximadamente la mitad, de manera que se decidió no emplear la línea Mcl-1 en ensayos posteriores.

4.2 Seguimiento de las expansiones de PBMC.

Con el fin de comprobar la efectividad del protocolo de expansión y activación *in vitro* de PBMC aislados de muestras de sangre, se realizó un seguimiento de las poblaciones presentes en el cultivo empleando el marcaje CD3/CD56 descrito en el apartado 3.3.3. Además de a día 0, a partir del día 7 se hicieron comprobaciones cada 3-4 días durante el mantenimiento de las expansiones.

Para la determinación de las poblaciones presentes en las expansiones por citometría de flujo, se siguió la estrategia de *gating* o selección detallada en el Anexo II.

En este proyecto se obtuvieron un total de cuatro expansiones de PBMC con las que se realizaron los ensayos de citotoxicidad contra células tumorales. Estas expansiones, denominadas como **expansión 1, 2, 3 y 4** respectivamente, se aislaron de muestras sanguíneas parcialmente procesadas (*LeukoPaks*) provenientes de distintos donantes sanos y provistas por el Banco de Sangre y Tejidos de Aragón.

Las cuatro expansiones se mantuvieron durante un total de 14 días, realizándose un seguimiento de la presencia relativa de las distintas poblaciones celulares en los días 0 (día de establecimiento), 7, 11 y 14. Los resultados de estos análisis quedan recogidos en las gráficas de la Figura 4.2.

A lo largo de este proceso de expansión, se pudo apreciar que las poblaciones de células T y células NK presentaron una mayor variación. Es a partir del día 7, momento en el que se consideran activadas, cuando se hizo más evidente la competencia entre estas dos poblaciones celulares cuyo resultado final fue favorable para células T en la Expansión 1 y favorable para NK en las expansiones 2, 3 y 4. Habiéndose empleado un mismo protocolo para la expansión y activación de todas las células aisladas, se pudo concluir que la predominancia final de una de las poblaciones celulares fue dependiente del donante o de la condición inicial de la muestra empleada.

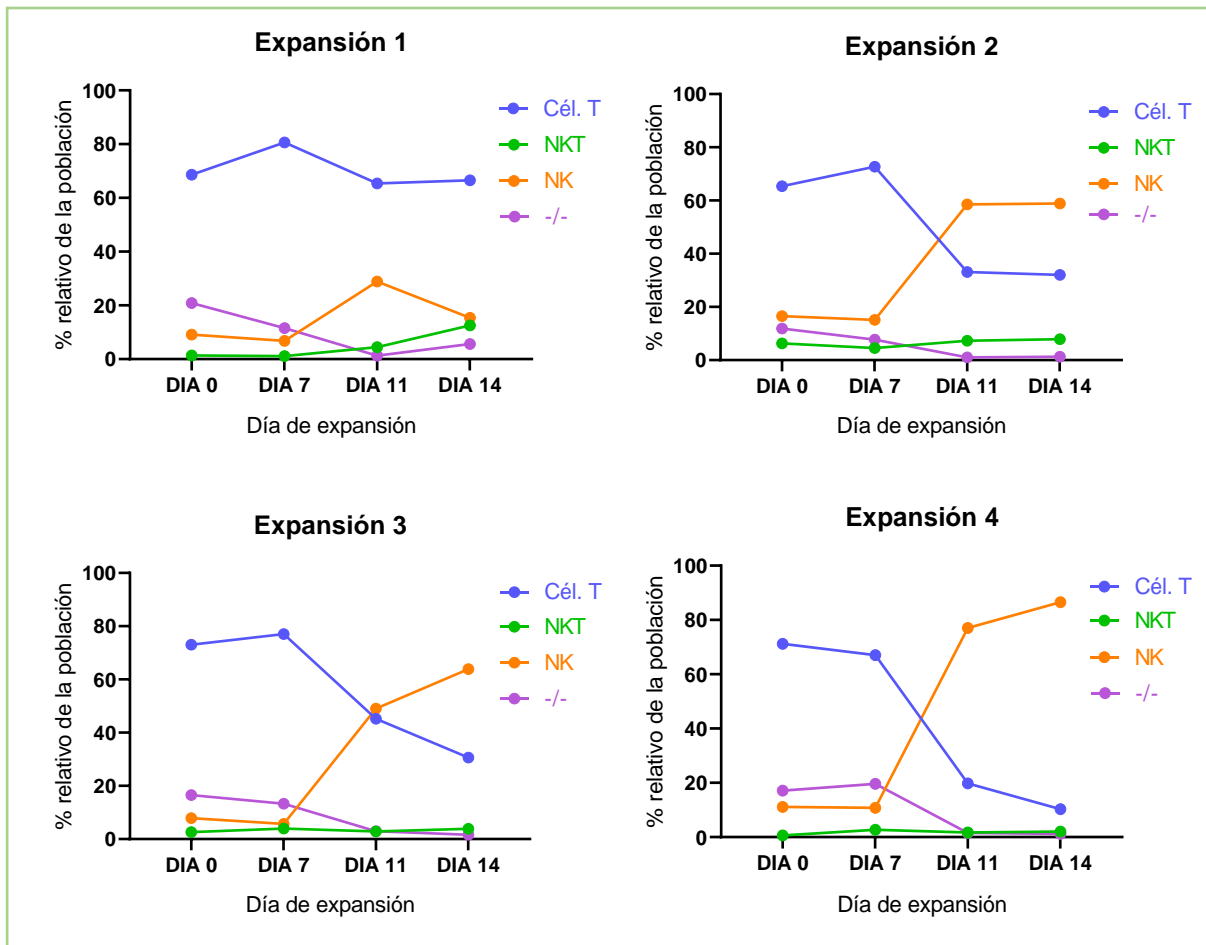


Figura 4.2 . Variación de las cantidades relativas de las distintas poblaciones celulares durante el mantenimiento de las expansiones empleadas posteriormente en los ensayos de citotoxicidad. Cada una de las expansiones (referidas en adelante como 1, 2, 3 y 4) fue realizada con muestra de sangre proveniente de un paciente sano distinto.

En estos análisis también se pudieron detectar otros dos tipos de poblaciones celulares:

- Células NKT:** Las células NKT, detectadas como doble positivas $CD3^+/CD56^+$, son una subpoblación de células T. Son células capaces de reconocer específicamente antígenos por medio de su receptor TCR y desencadenar respuesta inmune pero que, a su vez, cuentan con características propias de la respuesta inmune innata como es el reconocimiento de lípidos. Una vez activadas, las células NKT tienen también papel regulador en la respuesta inmune gracias a su capacidad de producción de distintas citoquinas (24).
 Para las expansiones realizadas en este trabajo, el porcentaje de las mismas fue minoritario y apenas varió en el transcurso de los días (Figura 4.2), con lo que no se tuvieron en cuenta para el resto de los experimentos.
- Células doble negativas (-/-):** A lo largo del seguimiento de las expansiones se aprecia cómo, en general, la población de células doble negativas $CD3^-/CD56^-$ presente el día 0 de establecimiento del cultivo va descendiendo progresivamente (Figura 4.2). Esta medida puede considerarse un marcador del éxito de la expansión al indicar que otras células mononucleares de distintos fenotipos, como monocitos o linfocitos B, no resultan competencia para las células T y NK activadas de interés y terminan muriendo.

4.3 Efecto de la incubación con fármacos metabólicos sobre el crecimiento celular

De manera previa a los ensayos de citotoxicidad, las células inmunitarias efectoras (células NK-92 y expansiones de PBMC con eNK y eCTL) fueron incubadas durante 72 horas en presencia de fármacos metabólicos.

Para evaluar el efecto que los fármacos DCA y metformina pudieran tener sobre el crecimiento celular, se determinó el ratio de variación entre la densidad celular a las 72 horas de incubación (calculada por conteo con colorante azul Trypan) y la densidad celular de inicio (0 horas, momento de adición de los fármacos). También se comparó la viabilidad celular a tiempos de 0 y 72 horas sin obtenerse apenas variaciones entre el momento inicial y final en ninguna de las condiciones de estudio (datos no mostrados).

El análisis de los datos de crecimiento celular se hizo por separado para cada una de las expansiones de PBMC puesto que, al provenir de distintos donantes, resulta de interés comparar la variación de los resultados entre individuos (Figura 4.3). Por su parte, los datos obtenidos de los tres cultivos empleados pertenecientes a la línea celular establecida NK-92 se recogieron en una única gráfica (Figura 4.4).

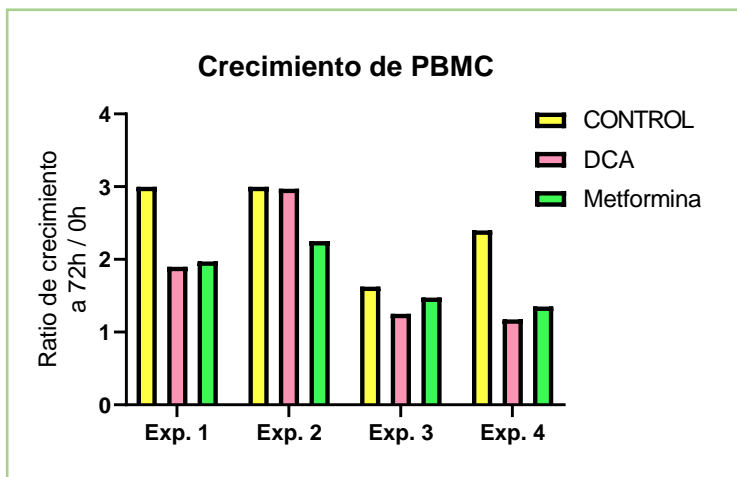


Figura 4.3. Gráfica comparativa de los ratios de crecimiento (densidad celular 72h / densidad celular inicial) obtenidos para los cultivos en presencia de fármaco metabólico para cada expansión de PBMC aislados. Se recogen resultados de cultivo control sin fármacos, cultivo en presencia de DCA y cultivo en presencia de metformina.

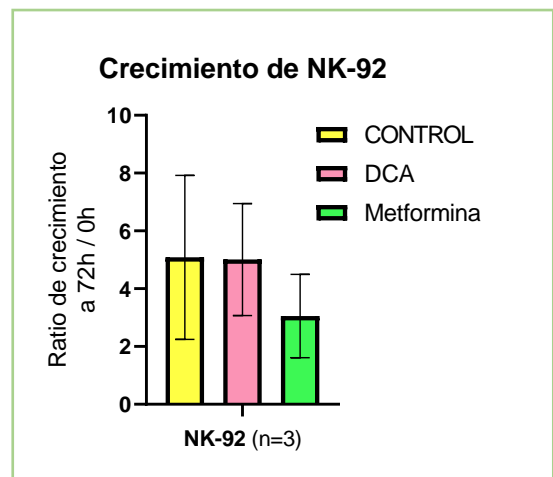


Figura 4.4. Gráfica comparativa de los ratios de crecimiento (densidad celular 72h / densidad celular inicial) obtenidos para los cultivos de la línea NK-92 en presencia de fármaco metabólico. La gráfica representa la media +/- desviación estándar (SD) de n=3.

Incubaciones en presencia de metformina

En comparación con las muestras control, se aprecia un **descenso del ratio de crecimiento celular en todos los cultivos incubados con metformina.**

La metformina presenta una variedad de efectos sobre el metabolismo celular, siendo de especial importancia en este contexto su capacidad de activar la enzima AMPK como resultado final de la inhibición parcial del complejo I de OXPHOS (mecanismo mencionado en el apartado 1.2). De forma resumida, la AMPK activa es capaz de inhibir la proliferación celular afectando negativamente a procesos anabólicos como la síntesis de proteínas o de ácidos grasos. El mecanismo principal por el que la AMPK frena la proliferación celular es por la inhibición del complejo 1 de la diana de rapamicina en células de mamífero (mTORC1) (25).

La inhibición del complejo mTORC1 afecta negativamente a células tumorales, ya que su papel es determinante en el mantenimiento de sus altas tasas de crecimiento, llegando a encontrarse anormalmente activado en algunos tipos de tumores (26). Este hallazgo sitúa a la metformina como una opción terapéutica interesante en el tratamiento oncológico. Desafortunadamente, el uso de metformina y la consecuente inhibición de procesos anabólicos, afectará también negativamente a la proliferación de células inmunitarias efectoras, resultado que queda reflejado en las Figuras 4.3 y 4.4.

Incubaciones en presencia de DCA

Por su parte, el efecto de la incubación con DCA sobre los ratios de crecimiento es más variable. En el caso de células de la línea **NK-92**, **la incubación con DCA no parece afectar al crecimiento celular** de manera positiva ni negativa. Como se ha mencionado en el apartado 1.2, el DCA es capaz de inhibir la glucólisis, forzando a la célula a obtener energía vía OXPHOS. Este efecto no perjudica al crecimiento de células NK ya que, incluso activadas, mantienen OXPHOS como vía preferente de obtención de ATP (27).

En el caso de las expansiones de PBMC, la incubación con DCA genera diferentes resultados: **no afecta en gran medida a las expansiones 2 y 3** mientras que, para las **expansiones 1 y 4, parece causar una reducción importante en el ratio de crecimiento celular**. En estas muestras, además de presencia de eNK, hay presencia de eCTL. Para mantener su alta tasa de proliferación, los eCTL activados emplean preferentemente la glucólisis aerobia, vía que es inhibida a favor de OXPHOS por el DCA (28).

Cabría esperar pues, que la afectación al ratio de proliferación en presencia de DCA fuese dependiente de la población celular mayoritaria en el cultivo pero, recurriendo a los datos recogidos en la figura 4.2, no se observa una correspondencia entre ambos parámetros. Se propone así que la variación de resultados entre expansiones sea dependiente del donante, hecho que solo puede ser confirmado realizando un estudio sobre una mayor muestra poblacional.

4.4 Estudio comparativo del efecto citotóxico frente a tumores

Para comparar la capacidad citotóxica de las células efectoras eNK, eCTL y NK-92 en presencia o ausencia de fármacos metabólicos, se realizaron ensayos de citotoxicidad frente a líneas celulares tumorales. Al igual que con la detección de las poblaciones CD3/CD56, la manera de detectar la muerte de las células tumorales por citometría de flujo siguió una estrategia de selección que se detalla en el Anexo III.

4.4.1 Ensayos de citotoxicidad con células NK-92

Para el caso de las células NK-92 se realizaron dos tipos de ensayo. En el primero, se dejó como tiempo de actuación toda la noche (ensayo O/N) mientras que, en los dos posteriores, el tiempo de ensayo fue de 4 horas. En ambos casos, se ensayaron 4 ratios distintos de concentración de células efectoras respecto a células diana.

Pasado el tiempo de ensayo elegido, se midió el porcentaje de muerte obtenido en cada línea celular tumoral (por marcaje de anexina-V) para cada ratio efectora:diana y condiciones de incubación con fármaco. A los resultados obtenidos se les restó el porcentaje de muerte celular basal correspondiente observado en muestras control de células tumorales sin presencia de efectoras, obteniéndose así el porcentaje de muerte específica. Los valores obtenidos para cada condición de ensayo y línea celular tumoral se recogen en la Figura 4.5:

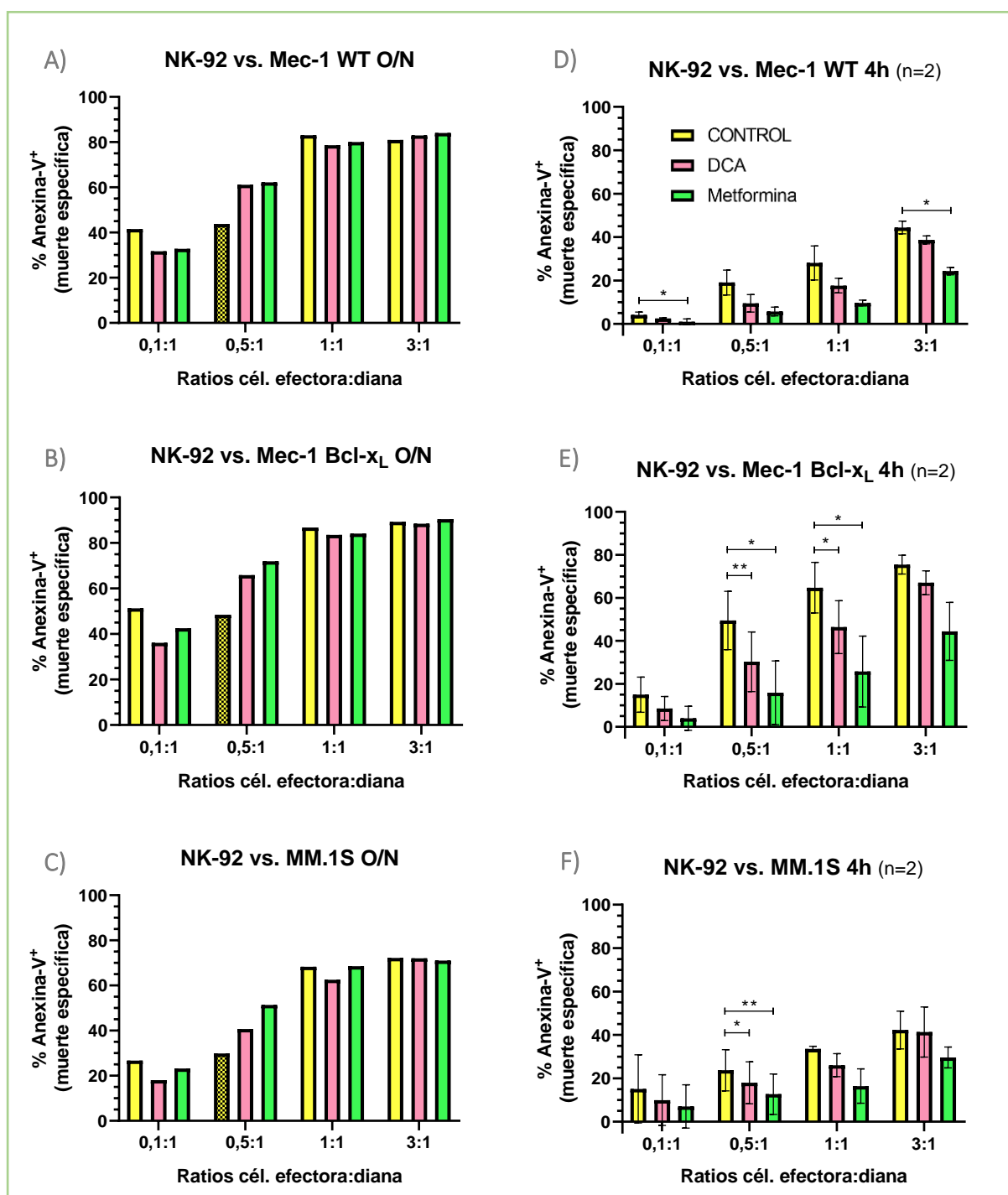


Figura 4.5. Se muestran los resultados de muerte específica para cada línea tumoral obtenidos en los ensayos de citotoxicidad con células efectoras NK-92. En las gráficas A), B) y C) se muestran los resultados del ensayo O/N. En el ratio 0.5:1 de estas gráficas la barra de la muestra control aparece sombreada puesto que, durante el transcurso del experimento, se perdieron parte de las células efectoras a sembrar (es decir, el porcentaje de células efectoras vs. diana en citometría de flujo era menor al esperado para este ratio). De esta manera, se detecta menor muerte específica de la estimada para esta medida. En las gráficas D), E) y F) se muestran los resultados del ensayo a 4 horas. Las gráficas representan la media +/- desviación estándar (SD) de n=2. *p<0,05; **p<0,01.

Primeramente, se llevó a cabo el ensayo O/N. Los resultados de este ensayo (Figura 4.5 A), B) y C)) indican que, en estas condiciones, las células NK-92 ejercen una elevada citotoxicidad contra las células tumorales, dificultando detectar el posible efecto del DCA o la metformina sobre su muerte. En consecuencia, se decidió reducir el tiempo de ensayo a 4 horas en los demás experimentos con este tipo de célula efectora (Figura 4.5 D), E) y F)). En estos casos, y para las tres líneas tumorales ensayadas,

sí se vio un efecto negativo de ambos fármacos sobre la citotoxicidad inducida por las células NK-92 en todos los ratios ensayados (Figura 4.5 D), E) y F)), aunque estos efectos resultaron estadísticamente significativos solamente en las condiciones que se indican en las gráficas.

4.4.2 Ensayos de citotoxicidad con PBMC aislados

En los ensayos realizados con las células efectoras aisladas de muestras de sangre se emplearon en todos los casos un ratio efectora:diana de **1:1** y un tiempo de **ensayo O/N**. En algunos puntos experimentales se perdieron células inmunitarias durante las separaciones de las mismas, de manera que el ratio efectora:diana comprobado por citometría era menor que 1:1 en algunos puntos. Estos puntos fueron descartados, por lo que el número de puntos experimentales por condición de estudio puede variar entre 2 y 4 (Figura 4.6 y 4.7).

4.4.2.1 Resultado de los ensayos con eNK

La separación por selección CD3⁺ de las células eCTL y eNK se realizó al finalizar la incubación de 72 horas con fármacos, justo antes del establecimiento del experimento de citotoxicidad. Para comprobar la efectividad del proceso de separación, las muestras de eCTL y eNK obtenidas se examinaron por citometría de flujo con marcaje CD3/CD56. De esta manera, se pudo determinar que las muestras de eNK obtenidas tras la separación presentan de media un **25.5%** de células CD3⁺ (datos no mostrados), que no han sido retenidas por el kit de separación. Por ende, aún denominándose a lo largo del trabajo como “eNK”, serán consideradas como muestras enriquecidas en eNK, al menos hasta un 75%.

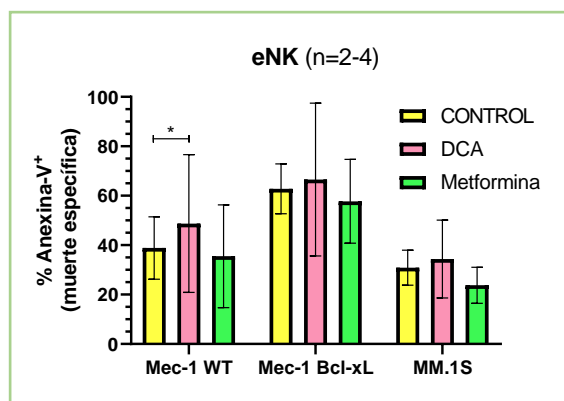


Figura 4.6. Representación gráfica de los resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad realizados con las células efectoras eNK aisladas de muestras de sangre de pacientes sanos.

Se emplean muestras provenientes de las expansiones 1, 2, 3 y 4. Las gráficas representan la media +/- desviación estándar (SD) de n=2-4. *p<0,05

Los resultados muestran que, mientras que la metformina no parece afectar la capacidad citotóxica de células eNK, el DCA sí consigue aumentar la muerte inducida por las mismas de forma significativa, al menos cuando se enfrentaron a las células Mec-1 WT (Figura 4.6).

4.4.2.2 Resultado de los ensayos con eCTL

En el caso de las muestras de eCTL, como consecuencia de haberse empleado un kit de selección CD3⁺, la población celular presente está formada íntegramente por células CD3⁺.

Para estos eCTL, se observó una clara tendencia al aumento de la citotoxicidad, salvo para las eCTL pre-incubadas con metformina sobre las células MM.1S. En general, se pudo apreciar un aumento en la citotoxicidad ejercida por eCTL pre-incubados con cualquiera de los dos fármacos, siendo este incremento especialmente notable para el caso del DCA (Figura 4.7). Sin embargo, dichas diferencias no llegaron a resultar estadísticamente significativas.

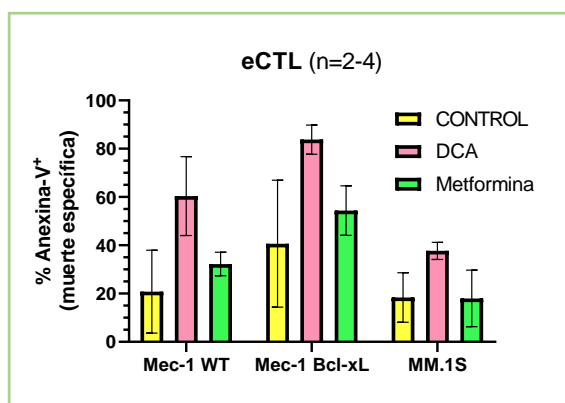


Figura 4.7. Representación gráfica de los resultados obtenidos para los ensayos de citotoxicidad realizados con las células efectoras eCTL aisladas de muestras de sangre de pacientes sanos.

Se emplean muestras provenientes de las expansiones 1, 2, 3 y 4. Las gráficas representan la media +/- desviación estándar (SD) de n=2-4.

4.4.3 Discusión sobre los resultados de citotoxicidad

Como ha sido demostrado por diversos estudios, el uso de DCA o metformina permite sensibilizar células tumorales a la acción citotóxica de células efectoras inmunes además de, en algunos casos, disminuir el crecimiento tumoral. En tumores tratados con estos fármacos, se ha visto inducida la expresión de ligandos de estrés (como ICAM-1, cuya presencia favorece la activación inmune) además de apreciarse alteraciones en las características del TME desfavorables para células efectoras inmunes (se observa reducción de la acidez, disminución de la demanda de nutrientes por parte del tumor...) (20,21). Considerando estos efectos, se plantea la utilidad de combinar el tratamiento con fármacos metabólicos con tratamientos basados en terapia celular adoptiva (ACT) con intención de aumentar la efectividad de estas últimas. El objetivo final será obtener una respuesta citotóxica más potente y frenar los mecanismos de desactivación de la respuesta inmune típicos del contexto tumoral (5).

En los estudios ya mencionados (20,21), se ha medido la capacidad citotóxica de células inmunitarias efectoras directamente *in vivo* (en animales de experimentación) o en ensayos *in vitro* frente a tumores previamente tratados con los fármacos metabólicos. Así, se ha conseguido caracterizar extensivamente la variedad de efectos del DCA y la metformina sobre las células tumorales. Pero es importante valorar que, en la aplicación combinada de fármacos metabólicos y ACT en el paciente, las células inmunes efectoras también entrarán en contacto con los fármacos. Como novedad, este trabajo se centra en el estudio del efecto de los fármacos de interés sobre la capacidad citotóxica de células inmunes efectoras de diverso origen empleadas en terapias ACT, en lugar de en sus efectos sobre las células tumorales. En relación a los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad llevados a cabo en este trabajo, resulta de especial interés discutir los siguientes aspectos:

4.4.3.1 Empleo de la línea celular NK-92 como potente efector citotóxico

Como se recoge en la figura 4.5, para células de la línea establecida NK-92 se realizaron ensayos a tiempo 4 horas y O/N. Primeramente, se llevó a cabo el ensayo O/N replicándose el protocolo empleado en ensayos con PBMC, pero obteniendo rangos de muerte demasiado altos para poder determinar diferencias entre fármacos (Figura 4.5 gráficas A, B) y C)). En consecuencia, se decidió reducir el tiempo a 4 horas, como ya se había realizado en otras ocasiones por nuestro grupo (23). En los nuevos ensayos se consiguieron inducciones de muerte en ocasiones superiores al 50% (Figura 4.5 gráficas D), E) y F)).

Estos resultados evidencian la alta capacidad citotóxica de las células NK-92 incluso a ratios efectora:diana reducidos. Así, la línea celular ve reforzado su estatus como buena candidata para el

desarrollo de tratamientos de inmunoterapia puesto que, además, es fácil de manipular genéticamente y genera pocos efectos secundarios en ensayos *in vivo* (29).

4.4.3.2 Efecto de fármacos metabólicos sobre la capacidad anti-tumoral de células inmunitarias

Efecto de la metformina:

La metformina tiene un **efecto negativo sobre el potencial citotóxico de células NK**, siendo este más acusado para células de la línea NK-92. Tal y como se ha justificado en el apartado 4.3, la metformina actúa inhibiendo la actividad de mTORC1 (25). Este hecho, que ya presentaba consecuencias en la proliferación celular de las células NK, también podría afectar negativamente a su función.

La maduración y función efectora de células NK está regulada por la interacción establecida entre los factores mTORC1 y mTORC2, teniendo estos efectos pro y anti citotóxicos respectivamente. La activación simultánea de ambos factores será la responsable de que el proceso de activación de las NK tenga la magnitud adecuada: mTORC2 contrarresta los efectos de un mTORC1 hiperactivado, evitando el agotamiento de la célula NK. La inhibición de mTORC1 llevada a cabo por la metformina, podría alterar este eje, resultando en una disminución de la citotoxicidad por acción de mTORC2 (30).

A pesar de ello, la citotoxicidad de las células eNK aisladas de las expansiones de PBMC parece disminuir en menor medida que la de las células NK-92. Esto podría estar relacionado con la presencia de IL-15 en este cultivo, dado que las células NK-92 se cultivaron exclusivamente en presencia de IL-2. En células NK activadas de manera dependiente de IL-15, la interleucina activa simultáneamente a ambos factores: mTORC1 y mTORC2. Como se ha comprobado en ratones defectivos para la subunidad principal de mTORC1, la IL-15 sin presencia de mTORC1 no es capaz de activar eficientemente a mTORC2, quedando su función bastante reducida (30). Podría ocurrir, por tanto, que en el cultivo de PBMC con IL-15, mTORC1 estuviera inhibido por metformina y, en consecuencia, que la activación del factor anti-citotóxico mTORC2 fuera débil, manteniéndose así algo más de función anti-tumoral que en los cultivos de NK-92 no dependientes de IL-15.

En cambio, la incubación con metformina parece tener un **efecto positivo sobre la citotoxicidad de eCTL**. La activación de la vía de AMPK resulta finalmente en la disminución del ratio AMP/ATP, con el consecuente cese de la glicólisis, vía preferente de obtención de energía en CTL activados. Este cambio metabólico, aunque pueda afectar negativamente a la proliferación celular, estimula la diferenciación de los eCTL hacia fenotipos de memoria y de mayor capacidad anti-tumoral, como ha podido ser observado en diversos estudios (31,32).

En vista a estos resultados, cabe preguntarse si la metformina sigue siendo una opción interesante para combinar con terapias ACT. Para responder a esta pregunta, es necesario entender que los efectos inmunoestimuladores mediados por la metformina en el contexto tumoral son indirectos, además de estar sumados a sus ya demostrados efectos anti-tumorales. Aunque la metformina pueda afectar negativamente a la función de células NK y al crecimiento tanto de NK como CTL *in vitro*, en el TME podrá favorecer en gran medida su función citotóxica mediante mecanismos como la degradación del ligando PD-L1 tumoral o la inducción de la síntesis de ligandos de estrés tumorales (20). Además, se ha podido demostrar que las células tumorales presentan mayor cantidad de transportadores para la toma de metformina, haciendo así disminuir la concentración de fármaco disponible para las células efectoras inmunes en el TME y, por tanto, su efecto negativo sobre ellas (33).

Efecto del DCA:

Tras su activación, las células NK siguen manteniendo OXPHOS como vía preferente de obtención de energía respecto a la glucólisis (27). Dado que el fármaco DCA tiene como efecto inhibir la glucólisis a favor de OXPHOS, se espera que no tenga un efecto muy notable sobre la función de células NK pero, en el análisis de los datos obtenidos, se ha podido confirmar una **disminución de la citotoxicidad para células NK-92 tratadas** y un **ligero aumento no significativo de la citotoxicidad de eNK tratadas**.

En células NK activadas en las que OXPHOS es la vía preferente para obtención de energía, la tasa de glucólisis llevada a cabo simultáneamente permite estimular procesos relacionados con la citotoxicidad como la síntesis granzimas, encargadas de la lisis de las células tumorales. De esta manera, sería lógico esperar una disminución en la citotoxicidad de ambos tipos celulares, que verán su glucólisis inhibida por la acción del DCA (34).

Nuevamente, podría ser la presencia de IL-15 la que explique la diferencia en los resultados obtenidos para NK-92 y eNK (Figuras 4.5 y 4.6). La presencia de IL-15 durante la activación celular permite aumentar la tasa glucolítica en estas células, ayudándoles a alcanzar una mayor citotoxicidad (27). Por ello, se hipotetiza que esta ventaja obtenida por las eNK se haya mantenido parcialmente incluso tras el tratamiento con DCA (Figura 4.6). En el futuro, sería interesante estudiar el papel de factores como IL-15 en la activación de células inmunitarias para optimizar su capacidad citotóxica *in vitro*.

Por su parte, en los valores obtenidos para **eCTL se puede apreciar una tendencia al aumento de la citotoxicidad en cultivos tratados con DCA** (Figura 4.7). Este hecho puede justificarse de nuevo por estudios que demuestran que la inhibición de la glucólisis favorece la diferenciación de los CTL a fenotipos con mayor capacidad anti-tumoral (31,32). En el caso del DCA, al causar una inhibición directa de esta vía, el aumento de la citotoxicidad de eCTL es más acusado que el visto tras el tratamiento con metformina (Figura 4.7).

4.4.3.3 Utilidad de los hallazgos para el tratamiento de leucemias resistentes

El estudio del efecto inmunomodulador de los fármacos metabólicos será de especial interés en el contexto de tumores hematológicos ya que, en ellos, las células inmunitarias efectoras y las tumorales conviven en un mismo tejido estableciéndose contacto más directo entre ellas (20). Como modelo de estos tipos de cáncer se han empleado las líneas Mec-1 WT, proveniente de un paciente de leucemia linfocítica crónica de tipo B (B-CLL), y Mec-1 Bcl-x_L, derivada de la anterior. Los tumores que sobreexpresan proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 (como Bcl-x_L) son comúnmente resistentes a diversos tratamientos y suelen ser detectados en pacientes con recaídas o mal pronóstico (35).

En ensayos previos *in vitro* en los que la incubación con fármacos metabólicos se aplicó a las células tumorales, las células Mec-1 WT resultaron más sensibles a la acción de eCTL y eNK tras el tratamiento con metformina. Por el contrario, este efecto no fue observado en las células Bcl-x_L, en las que la sobreexpresión de esta proteína pudo generar resistencia a la sensibilización (20). En cambio, en este trabajo, la incubación de las células efectoras con los fármacos metabólicos ha permitido sensibilizar a células tumorales Mec-1 Bcl-x_L al ataque por eCTL, principalmente por los tratados con DCA (Figura 4.7).

Queda así demostrada la importancia de continuar el estudio del efecto inmunomodulador de fármacos metabólicos sobre la capacidad anti-tumoral de células inmunitarias con el fin de encontrar nuevas

alternativas o combinaciones terapéuticas que impulsen la lucha contra fenotipos tumorales especialmente agresivos o resistentes a otros tratamientos.

5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Tras el análisis de los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El aislamiento y expansión de PBMC a partir de sangre de donantes sanos permite la obtención de eCTL y eNK, en proporciones variables dentro del cultivo, con capacidad citotóxica sobre tumores.
- La presencia del fármaco metabólico **metformina** parece afectar negativamente a la proliferación de células eNK y eCTL.
- La incubación con el fármaco metabólico **DCA**, a pesar de no afectar positivamente al crecimiento de las células inmunitarias estudiadas, sí permite aumentar considerablemente la capacidad citotóxica de los eCTL incluso frente a una línea tumoral resistente a la apoptosis (Mec-1 Bcl-x_L). La citotoxicidad de las eNK también aumenta por efecto del DCA, aunque en menor grado.
- La citotoxicidad de las células de la línea NK-92 se ve parcialmente inhibida por ambos fármacos, en especial por la metformina.

The following conclusions can be drawn from the analysis of the results obtained:

- *The isolation and expansion of PBMC from healthy patients' blood samples allows the attainment of eCTL and eNK – in varying proportions within the culture – with cytotoxic activity against tumors.*
- *Presence of the metabolic drug **metformin** seems to negatively affect the proliferation of both eCTL and eNK cells.*
- *Incubation with the metabolic drug **DCA** – despite not altering the growth of the studied immune cells in a positive way – increases, considerably, the cytotoxic ability of eCTL even against an apoptosis resistant cell line (Mec-1 Bcl-x_L). The cytotoxicity of eNK is also increased by the effect of DCA, although to a lesser degree.*
- *The cytotoxic activity of the NK-92 cell line is partially inhibited in response to treatment with metabolic drugs, especially by metformin.*

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell. 2011 Mar;144(5):646–74.
2. Xia L, Oyang L, Lin J, Tan S, Han Y, Wu N, et al. The cancer metabolic reprogramming and immune response. Mol Cancer. 2021;20(1):1–21.
3. Kouidhi S, Ben Ayed F, Benammar Elgaaied A. Targeting Tumor Metabolism: A New Challenge to Improve Immunotherapy. Front Immunol. 2018 Feb 23;9(FEB):1–11.
4. Kato Y, Ozawa S, Miyamoto C, Maehata Y, Suzuki A, Maeda T, et al. Acidic extracellular microenvironment and cancer. Cancer Cell Int. 2013;13(1):89.
5. Chen K, Li Y, Guo Z, Zeng Y, Zhang W, Wang H. Metformin: Current clinical applications in nondiabetic patients with cancer. Aging (Albany NY). 2020;12(4):3993–4009.
6. Tataranni T, Piccoli C. Dichloroacetate (DCA) and Cancer: An Overview towards Clinical Applications. Oxid Med Cell Longev. 2019 Nov 14;2019:1–14.
7. Herzig S, Shaw RJ. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Feb 4;19(2):121–35.
8. Liu W, Wang Y, Luo J, Liu M, Luo Z. Pleiotropic Effects of Metformin on the Antitumor Efficiency of Immune Checkpoint Inhibitors. Front Immunol. 2021;11(February):1–10.

9. Wang JX, Choi SYC, Niu X, Kang N, Xue H, Killam J, et al. Lactic Acid and an Acidic Tumor Microenvironment suppress Anticancer Immunity. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 7;21(21):8363.
10. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett.* 2015 Nov;368(1):7–13.
11. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene.* 2008 Oct 6;27(45):5904–12.
12. Anderson NM, Simon MC. *Il Magazine The tumor microenvironment II.* *Curr Biol.* 2020;30(16):R921–5.
13. Muntasell A, Ochoa MC, Cordeiro L, Berraondo P, López-Díaz de Cerio A, Cabo M, et al. Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2017;45:73–81.
14. Martínez-Lostao L, Anel A, Pardo J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clin Cancer Res.* 2015 Nov 15;21(22):5047–56.
15. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SEA, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol.* 2005 Feb;42(4):501–10.
16. DePeaux K, Delgoffe GM. Metabolic barriers to cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2021 Dec 29;21(12):785–97.
17. Met Ö, Jensen KM, Chamberlain CA, Donia M, Svane IM. Principles of adoptive T cell therapy in cancer. *Semin Immunopathol.* 2019;41(1):49–58.
18. Sanchez-Martinez D, Allende-Vega N, Orecchioni S, Talarico G, Cornillon A, Vo D-N, et al. Expansion of allogeneic NK cells with efficient antibody-dependent cell cytotoxicity against multiple tumors. *Theranostics.* 2018;8(14):3856–69.
19. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG, et al. NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2016;65(4):485–92.
20. Allende-Vega N, Marco Brualla J, Falvo P, Alexia C, Constantinides M, de Maudave AF, et al. Metformin sensitizes leukemic cells to cytotoxic lymphocytes by increasing expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Sci Rep.* 2022 Dec 25;12(1):1341.
21. Belkahla S, Brualla JM, Fayd’herbe de Maudave A, Falvo P, Allende-Vega N, Constantinides M, et al. The metabolism of cells regulates their sensitivity to NK cells depending on p53 status. *Sci Rep.* 2022 Dec 25;12(1):3234.
22. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic leukaemia in polyclonal transformation. *Leuk Res.* 1999 Feb;23(2):127–36.
23. Calvo T, Reina-Ortiz C, Giraldo D, Gascón M, Woods D, Asenjo J, et al. Expanded and activated allogeneic NK cells are cytotoxic against B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells with sporadic cases of resistance. *Sci Rep.* 2020;10(1):19398.
24. Terabe M, Berzofsky JA. Chapter 8 The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. In: *Advances in Cancer Research.* 2008. p. 277–348.
25. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol.* 2011 Sep 2;13(9):1016–23.
26. Zou Z, Tao T, Li H, Zhu X. mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer: Progress and challenges. *Cell Biosci.* 2020;10(1):1–11.
27. Keppel MP, Saucier N, Mah AY, Vogel TP, Cooper MA. Activation-Specific Metabolic Requirements for NK Cell IFN- γ Production. *J Immunol.* 2015;194(4):1954–62.
28. Eleftheriadis T, Pissas G, Karioti A, Antoniadis G, Antoniadis N, Liakopoulos V, et al. Dichloroacetate at therapeutic concentration alters glucose metabolism and induces regulatory T-cell differentiation in alloreactive human lymphocytes. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 2013 Jan 1;24(4):271–6.
29. Klingemann H, Boissel L, Toneguzzo F. Natural killer cells for immunotherapy - Advantages of the NK-92 cell line over blood NK cells. *Front Immunol.* 2016;7(MAR):1–7.
30. Wang F, Meng M, Mo B, Yang Y, Ji Y, Huang P, et al. Crosstalks between mTORC1 and mTORC2 variagate cytokine signaling to control NK maturation and effector function. *Nat Commun.* 2018 Dec 19;9(1):4874.
31. Zhang Z, Li F, Tian Y, Cao L, Gao Q, Zhang C, et al. Metformin Enhances the Antitumor Activity of CD8 + T Lymphocytes via the AMPK–miR-107–Eomes–PD-1 Pathway . *J Immunol.* 2020;204(9):2575–88.
32. Sukumar M, Liu J, Ji Y, Subramanian M, Crompton JG, Yu Z, et al. Inhibiting glycolytic metabolism enhances CD8+ T cell memory and antitumor function. *J Clin Invest.* 2013 Oct 1;123(10):4479–88.
33. Marcucci F, Romeo E, Caserta CA, Rumio C, Lefoulon F. Context-Dependent Pharmacological Effects of Metformin on the Immune System. *Trends Pharmacol Sci.* 2020 Mar;41(3):162–71.
34. Biswas SK. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity.* 2015 Sep;43(3):435–49.
35. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2013 Jan 22;17(1):61–75.

MATERIAL SUPLEMENTARIO

- **ANEXO I:** Composición de tampón de lisis y geles para Western Blot.
- **ANEXO II:** Estrategia de *gating* o selección para el seguimiento de las expansiones de PBMC por marcaje CD3/CD56.
- **ANEXO III:** Estrategia de *gating* o selección para la determinación de la muerte tumoral por marcaje de Anexina.

ANEXO I: Composición de tampón de lisis y geles para Western Blot.

Tabla A.1. Composición del tampón de lisis empleado en la obtención de extractos celulares.

Composición	Concentración
Triton-X-100	1% (v/v)
NaCl	150mM
Tris-HCl	50mM
Glicerol	10% (v/v)
EDTA	1mM
Na ₃ VO ₄	1mM
Na ₄ P ₂ O ₇	10mM
Leupeptina	10µg/ml
NaF	10mM
PMSF	1mM
pH	7.6

Tabla A.2. Composición del tampón de carga 3x empleado en electroforesis.

Composición	Concentración
Tris-HCl	150mM
SDS	3% (v/v)
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.3mM
Na ₄ P ₂ O ₇	30mM
NaF	30mM
Glicerol	30% (v/v)
2-β-mercaptoetanol	30% (v/v)
Azul de bromofenol	0.06% (p/v)
pH	7.4

Tabla A.3. Composición de los geles utilizados para la realización de la electroforesis.

Composición	Stacking	Resolving (15%)
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	0.65ml	5ml
Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8	1.26ml	-
Tris-HCl 0.5 M, pH 8.8	-	2.5ml
SDS 10% (v/v)	50µl	100µl
Agua destilada	3ml	2.35ml
APS	100µl	100µl
TEMED	10µl	10µl
Volumen total	5.07ml	10.06ml

ANEXO II: Estrategia de gating o selección para el seguimiento de las expansiones de PBMC por marcaje CD3/CD56.

Para determinar las poblaciones celulares presentes en las expansiones de PBMC por citometría de flujo, se siguió la siguiente estrategia de *gating* o selección (Figura A.1):

A) En primer lugar, se seleccionó el conjunto de células que contiene las células inmunes efectoras de interés. Analizando cada expansión, se selecciona el grupo con el tamaño (parámetro FSC, *forward scatter*) y complejidad celular (parámetro SSC, *side scatter*) correspondiente a los PBMC.

B) Dentro del grupo seleccionado, se determinó la fluorescencia emitida por cada evento registrado tras el marcaje. Se representa gráficamente CD3 (FL1-H) como eje de ordenadas y CD56 (FL4-H) como abscisas.

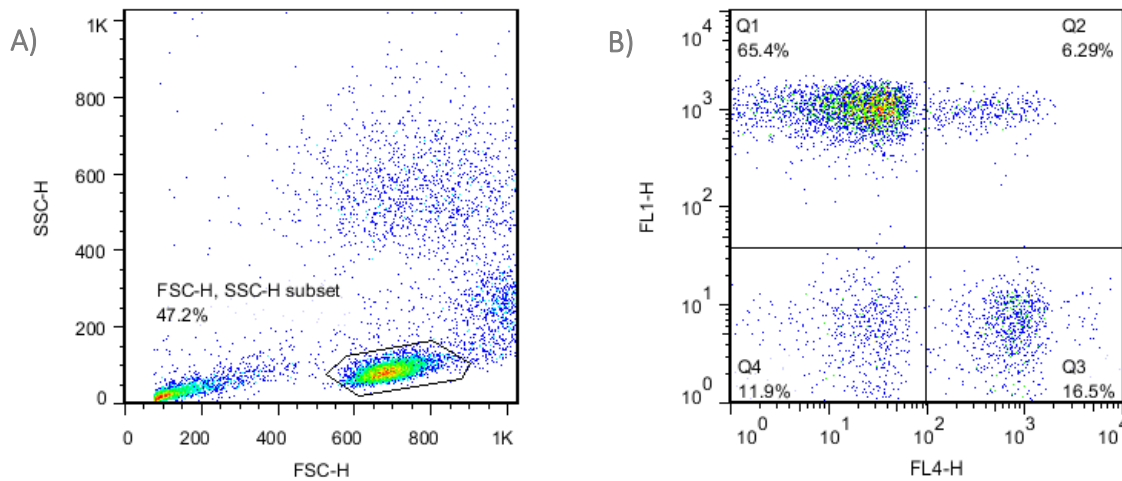


Figura A.1. Estrategia de *gating* empleada para la determinación de las distintas poblaciones celulares en el seguimiento de las expansiones de PBMC (se muestra como ejemplo la expansión 2 a día 0). **A)** Selección inicial por tamaño y complejidad. **B)** Determinación de los porcentajes de cada población celular en base a la fluorescencia emitida tras el marcaje CD3/CD56: **Células T** (positivas para CD3, Q1) emiten fluorescencia detectable en el canal FL-1. **Células NK** (positivas para CD56, Q3) tienen fluorescencia observable en canal FL-4. También se detectan células sin fluorescencia (-/- **doble negativas**, CD3-/CD56-, Q4) y células **NKT** (doble positivas, CD3+/CD56+, Q2).

ANEXO III: Estrategia de *gating* o selección para la determinación de la muerte tumoral por marcaje de Anexina.

Para determinar el porcentaje de muerte tumoral observado en los distintos experimentos de citotoxicidad, se empleó la siguiente estrategia de *gating* o selección (Figura A.2):

A) En primer lugar, se seleccionó la población celular en la que, por tamaño (parámetro FSC, *forward scatter*) y complejidad celular (parámetro SSC, *side scatter*), se encuentran tanto células efectoras como diana. De esta forma se pudo descartar el *debris* o restos celulares de pequeño tamaño presentes.

B) Dentro del grupo anterior, se seleccionaron las células tumorales. Se tuvo en cuenta que las células efectoras presentan fluorescencia detectable en el canal FL1-H (eje de ordenadas), bien por la transfección con ZsGreen en NK-92 o por el marcaje con la sonda fluorescente CellTracker™ Green en las células efectoras aisladas de PBMC.

C) Dentro del grupo de células tumorales, se seleccionaron aquellas positivas para el marcaje con Anexina-V APC, que presenta fluorescencia roja (canal FL-4 del citómetro empleado). Como se ha indicado en el apartado materiales y métodos del texto, serán las células positivas para este marcaje las que se consideren muertas o apoptóticas.

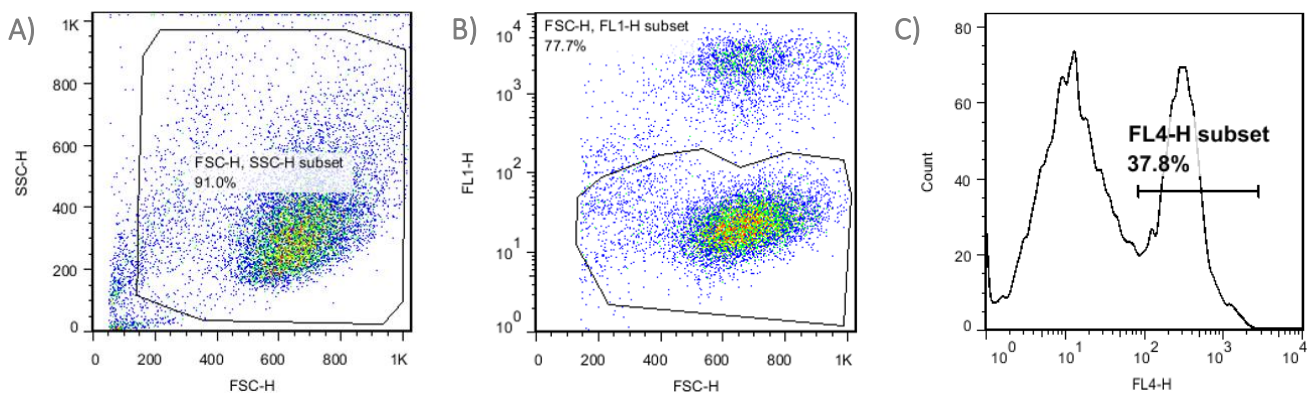


Figura A.2. Ejemplo de la estrategia de *gating* empleada para la determinación, por marcaje de anexina, de la muerte celular obtenida en los ensayos de citotoxicidad (tanto con NK-92 como con eCTL o eNK). **A)** Selección inicial por tamaño y complejidad. **B)** Selección de las células tumorales que, a diferencia de las células efectoras inmunitarias, no presentan fluorescencia detectable en el canal FL-1. **C)** Dentro de la población de células tumorales, selección de aquellas positivas para el marcaje con Anexina-V APC con fluorescencia detectable en el canal FL-4. Así, en el ejemplo mostrado, el porcentaje de muerte tumoral detectado es del **37.8%**.