



Universidad de Oviedo

Programa de doctorado en Investigación en Cáncer

Tesis Doctoral

**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS DE  
ACTIVACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE  
ANTITUMORAL MEDIADA POR CÉLULAS NK**

Andrea Acebes Huerta

Oviedo, 2015



## RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

<b>1.- Título de la Tesis</b>	
Español/Otro Idioma: <b>Desarrollo de estrategias de activación de la respuesta inmune antitumoral mediada por células NK</b>	Inglés: <b>Novel strategies to activate the antitumor immune response mediated by NK cells</b>
<b>2.- Autor</b>	
Nombre: <b>Andrea Acebes Huerta</b>	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: <b>Investigación en Cáncer</b>	
Órgano responsable: <b>Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)</b>	

### RESUMEN (en español)

El cáncer es una enfermedad muy heterogénea y con un curso clínico muy variable en la cual, el sistema inmunitario tiene un papel clave en su control y eliminación. Entre los componentes del sistema inmunitario que participan en la respuesta antitumoral se encuentran las células NK, células linfoides pertenecientes a la inmunidad innata que son capaces de reconocer determinados cambios en la expresión de ligandos de sus receptores inhibidores o activadores. La pérdida de expresión de moléculas, mayoritariamente HLA-I, es detectada por una serie de receptores inhibidores (KIRs, CD94/NKG2A). Por el contrario, los receptores activadores (NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44 y NKp46) reconocen ligandos que juegan un papel fundamental en la respuesta contra el cáncer. Uno de los receptores activadores mejor caracterizado y de mayor relevancia en la inmunovigilancia del cáncer es NKG2D. Este receptor, presente no sólo en células NK, sino también en los linfocitos T  $\alpha\beta$  CD8, en linfocitos T  $\gamma\delta$ , en células NKT-like y en algunos linfocitos T $\alpha\beta$  CD4, es capaz de reconocer dos familias de ligandos expresados en la superficie de las células tumorales. Estos ligandos, denominados MICA, MICB y ULBP1-6, se sobre-expresan habitualmente en las células transformadas, pero no en las sanas, y su unión a NKG2D activa la respuesta citotóxica de los efectores inmunes. En esta Tesis Doctoral se aborda el análisis de los diferentes procesos celulares y moleculares en los que participan las células NK durante distintas situaciones dentro del contexto del cáncer, con el objetivo de identificar nuevas estrategias de activación del sistema inmunitario que permitan obtener respuestas antitumorales más eficaces.

Para activar la respuesta antitumoral de las células NK hipotetizamos que es necesario tanto activar a las células NK como aumentar la inmunogenicidad de las tumorales mediante la inducción de la expresión de los ligandos de los receptores activadores de las células NK. En la primera parte de esta Tesis, se analizaron diversas citocinas (IL-2, IL-15 e IL-21) con capacidad potencial para activar la actividad citotóxica de las células NK, así como medicamentos inmunoestimuladores, como la lenalidomida, sobre la capacidad de activar el sistema inmune de pacientes con leucemia linfática crónica (LLC). Se observó que la lenalidomida era capaz de ejercer un efecto co-estimulador sobre los linfocitos T CD4, induciendo la producción y liberación de IL-2. Esta citocina indujo, en última instancia, la proliferación y la activación de las poblaciones de células citotóxicas, principalmente células NK, lo que resultó en la eliminación de las células leucémicas. Dado que las células leucémicas de la LLC son muy poco inmunogénicas, se observó que la combinación de la lenalidomida con un fármaco como el rituximab (anticuerpo anti-CD20) estimula la Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo (ADCC) frente a células leucémicas primarias. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la idoneidad de la lenalidomida para ser utilizada como tratamiento de la LLC, ya sea sola o en combinación con anticuerpos monoclonales anti-CD20 como el rituximab.

Por otro lado, se analizó la capacidad de diferentes medicamentos de aumentar la inmunogenicidad tumoral para favorecer su reconocimiento y eliminación por las células NK. Observamos de forma novedosa que algunos medicamentos anti-mitóticos, como la



citocalasina D, el nocodazol o el docetaxel, que inducen hiperploidía, eran capaces de incrementar la inmunogenicidad del tumor y de activar a los linfocitos T y NK. La generación de células hiperploides con dichos agentes antimitóticos indujo la expresión de determinados ligandos activadores, principalmente MICA y ULBPs, en líneas tumorales de diversos orígenes celulares (mieloide, colon y hepático), lo que, consecuentemente, se tradujo en una mayor susceptibilidad a la lisis mediada por células NK. Además, se observó una mayor activación de las células NK que se reflejó, principalmente, en un aumento de la secreción de IFN- $\gamma$ , así como en una mayor proliferación gracias al estímulo ejercido por la IL-2 producida, mayoritariamente, por los linfocitos T CD4 estimulados por las células hiperploides. Finalmente, se quiso analizar qué mecanismos moleculares estaban implicados en la regulación del ligando MICA. Se determinó que las vías de reparación del daño en el DNA (vía ATM/ATR) y, en determinados modelos celulares, la activación de la respuesta al estrés en el retículo endoplásmico, eran las principales vías que regulaban la expresión de estas moléculas en las células tumorales que adquieren un fenotipo hiperploide.

En conjunto, los resultados de esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto que, para obtener respuestas inmunitarias realmente efectivas, no basta solo con revertir los efectos inhibitorios que ejerce el tumor (y su microambiente) sobre el sistema inmune, sino que también es necesario emplear estrategias cuyo objetivo sea aumentar la inmunogenicidad del tumor para hacerlo más reconocible y, por lo tanto, más susceptible de ser eliminado por el sistema inmunológico.

## RESUMEN (en Inglés)

Cancer is a very heterogeneous disease with variable clinical courses in which the immune system plays a key role in the control of tumor progression. Among the immune cells, NK and T cells are the main mediators involved in the antitumor immune response. NK cells belong to the innate immune system and are able to induce direct cytolysis of infected and transformed cells and to regulate the adaptive immune response. NK cells recognize tumor cells by detecting changes in the expression of ligands of their inhibitory and activating receptors. The loss of the expression of self-molecules, mainly HLA class I proteins, is detected by an array of inhibitory receptors (i.e. KIRs, CD94/NKG2A). Contrarily, activating receptors (i.e. NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44 and NKp46) recognize ligands that play a key role in the immune response against cancer. NKG2D receptor is present on the surface of NK-, NKT-like and T cells ( $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$ ) and is able to recognize 2 families of ligands, MICA/B and ULBP1-6 that are up-regulated in tumor cells, but are restrictedly expressed in healthy cells, and their interaction with NKG2D activates the cytotoxic response of the immune effectors. In this Thesis we addressed the study of different cellular and molecular process wherein NK cells are involved along various situations in the context of cancer. The main aim of this study is to unravel new strategies to stimulate the immune response against cancer.

To activate the antitumor immune response of NK cells, we hypothesize that it is necessary to completely restore the activity of NK cells and increase the tumor immunogenicity by inducing the expression of NK cell-activating ligands. In the first part of this study we analysed a set of cytokines (IL-2, IL-15 and IL-21), as well as lenalidomide, an immunomodulatory drug with high potential to increase the cytotoxic activity of NK cells in patients of chronic lymphocytic leukemia (CLL). We observed that lenalidomide was able to activate the immune system of CLL patients exerting a co-stimulatory effect on CD4 T cells that induces the expression and the secretion of



IL-2. This cytokine, ultimately, was the responsible for the NK cell proliferation that results in the elimination of leukemia cells. Due to the fact that leukemic cells are poorly immunogenic, we observed a synergistic effect of lenalidomide together with rituximab on promoting Antibody-Dependent-Cell-Mediated-Cytotoxicity (ADCC) against primary leukemia cells. Overall, these observations provide a support for combining lenalidomide with rituximab as a treatment in CLL. Likewise, we analysed the effect of different drugs on the immunogenicity of tumor cells to find strategies to favour their recognition and elimination by the immune system, particularly by NK cells. Antimitotic drugs such as cytochalasin D, nocodazole and docetaxel, which induced cellular hyperploidy, were able to increase the immunogenicity of tumor cells and activated NK and T cells. Hyperploidy-inducing chemotherapeutic agents strongly up-regulated the tumor expression of ligands for NK cell activating receptors, mainly MICA and ULBPs, rendering tumor cells highly susceptible to NK cell-mediated lysis through the activation of NKG2D and DNAM-1 receptors. In addition, hyperploidy-stimulated the production of IL-2 by CD4 T cells, which induced NK cell proliferation and activity. The stimulation of MICA, a key NKG2D ligand, in hyperploidy cells was mainly mediated by ATM protein kinase. Likewise, experiments of pharmacological inhibition of key regulators of endoplasmic reticulum stress in certain cell models supported a role for this pathway in NKG2D ligand up-regulation. Overall, the results of this thesis show that in order to effectively stimulate immune responses, it is not sufficient to reverse the inhibitory effects exerted by the tumor (and its microenvironment) on the immune system, but it is also necessary to employ strategies to increase the immunogenicity to make tumor cells more recognizable and, therefore, more susceptible to be eliminated by the immune system.

**SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN EN CÁNCER**



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b><i>INTRODUCCIÓN</i></b> .....	1
¿QUÉ ES EL CÁNCER?.....	2
SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER.....	3
CÉLULAS NATURAL KILLER Y SU PAPEL EN LA INMUNOVIGILANCIA DEL CÁNCER.....	13
IMPLICACIÓN DE LAS CELULAS NK EN LA RESPUESTA INMUNE EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA .....	29
INMUNOVIGILANCIA DE LA PLOIDÍA TUMORAL .....	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	48
<b>CAPÍTULO II</b> .....	50
<b><i>MATERIAL Y MÉTODOS</i></b> .....	50
PACIENTES DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y DONANTES.....	51
MATERIALES .....	51
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	54
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	58
EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN O BLOQUEO .....	65
ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS DE DATOS .....	66
<b>CAPÍTULO III</b> .....	68
<b><i>EFFECTO DE LA LENALIDOMIDA SOBRE EL SISTEMA INMUNE DE     PACIENTES DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA</i></b> .....	68
BREVE INTRODUCCIÓN AL TEMA .....	69
RESULTADOS .....	70
DISCUSIÓN.....	85
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	89
<b><i>INDUCCIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD TUMORAL USANDO     FÁRMACOS ANTIMITÓTICOS</i></b> .....	89
BREVE INTRODUCCIÓN AL TEMA .....	90
RESULTADOS .....	91
DISCUSIÓN.....	110
FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	114
<b>CAPÍTULO V</b> .....	119

<b><i>DISCUSIÓN GENERAL</i></b> .....	119
CONSIDERACIONES INICIALES .....	120
DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS .....	120
CONCLUSIONES .....	134
CONCLUSIONS .....	136
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	138
<b>ANEXO</b> .....	155
ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS.....	157
OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE ESTA TESIS.....	157



# ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b> 7-aminoactinomicina D	<b>GRp78</b> <i>Glucose-Regulated Protein 78kDa</i>
<b>APC</b> Célula presentadora de antígeno	<b>HDACs</b> Histonas desacetilasas
<b>ATCC</b> <i>American Type Culture Collection</i>	<b>IFN-g</b> Interferon-gamma
<b>ATM</b> <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>	<b>IFNR-g</b> Receptor de interferon-gamma
<b>ATR</b> <i>Ataxia Telangiectasia- and Rad3- related</i>	<b>Ig</b> Inmunoglobulina
<b>BAT3</b> <i>HLA-B-associated transcript 3</i>	<b>IL</b> Interleucina
<b>Bcl-2</b> <i>B- cell Lymphoma 2</i>	<b>LB</b> Medio de cultivo Luria-Bertani
<b>BCR/ABL</b> <i>Breakpoint Cluster Region/ Abelson Fusion protein</i>	<b>LLC</b> Leucemia linfática crónica
<b>BSA</b> Seroalbúmina bovina	<b>MAPK</b> <i>Mitogen-Antigen Protein Kinases</i>
<b>CAPS</b> Ácido-3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico	<b>MLL5</b> <i>Mixed-Lineage Leukaemia protein 5</i>
<b>cDNA</b> Ácido desoxirribonucleico complementario	<b>mRNA</b> Ácido ribonucleico mensajero
<b>CRBN</b> Cereblon	<b>NK</b> <i>Natural Killer</i>
<b>CTLA-4</b> <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>	<b>NKG2DLs</b> Ligandos de NKG2D
<b>DC</b> célula dendrítica	<b>NKT</b> <i>Natural Killer T</i>
<b>DMSO</b> Dimetil sulfóxido	<b>PBMCs</b> Células mononucleares de sangre periférica
<b>DNA</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>PBS</b> Tampón fosfato salino
<b>dNTPs</b> Desoxirribonucleotidos trifosfato	<b>PCNA</b> <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
<b>DTT</b> Ditioneitol	<b>PCR</b> Reacción en cadena de la polimerasa
<b>EDTA</b> Ácido etilendiaminotetraacético	<b>PE</b> Ficoeritrina
<b>EMT</b> transición epitelio-mesénquima	<b>PerCP</b> Proteína clorofila-piridina
<b>ERp5</b> <i>Endoplasmic Reticulum Protein 5</i>	<b>PGE2</b> Prostaglandina E2
<b>FBS</b> Suero fetal bovino	<b>PI3K</b> Fosfatidilinositol-3 cinasa
<b>Fc</b> Fracción cristalizante	<b>PMA</b> Forbol 12-miristato 14-acetato
<b>FITC</b> Isotiocianato de fluoresceína	<b>PVDF</b> Fluoruro de polivinilideno
<b>Grb2</b> <i>Growth Factor Receptor-bound Protein 2</i>	<b>qPCR</b> PCR cuantitativa
	<b>RAE-1</b> <i>Retinoic Acid Early inducible-1 gene</i>

**RE** Retículo Endoplasmático  
**RNA** Ácido ribonucleico  
**SDS** Dodecilsulfato sódico  
**siRNA** Ácido ribonucleico de interferencia  
**sMICA** MICA soluble  
**sMICB** MICB soluble  
**sULBP1-3** ULBP1-3 solubles  
**TAA** antígenos asociados a tumores  
**TBS-T** Tampon Tris salino-Tween  
**TCR** Receptor de células T  
**TGF- $\beta$**  *Transforming Growth Factor- $\beta$*   
**TNF- $\alpha$**  *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*   
**Tris** Tris(hidroximetil)-aminometano  
**UPR** *Unfolded Protein Response*



# **CAPÍTULO I**

## *INTRODUCCIÓN*

## ¿QUÉ ES EL CÁNCER?

Cáncer es el nombre común que reciben un conjunto de enfermedades que se caracterizan por presentar un crecimiento descontrolado de algunas células del organismo. Puede comenzar de manera localizada en cualquier parte del cuerpo y posteriormente diseminarse a otros tejidos. Se conocen más de 200 tipos de cáncer, siendo los más comunes el de piel, pulmón, mama y colon.

Es muy probable que la mayoría de las personas relacionen el cáncer con una enfermedad moderna, consecuencia de nuestro estilo de vida actual. Si bien es cierto que la incidencia de cáncer se multiplicó después de la revolución industrial, que tuvo lugar durante la segunda mitad del siglo XVIII, hay evidencias claras de la existencia de tumores que datan del año 2.200 a.C. Los restos de una mujer que murió hace más de 4.200 años fueron encontrados en Egipto, entre sus huesos carcomidos se escondía la primera evidencia de cáncer de la historia. El esqueleto mostraba un caso muy avanzado de cáncer de mama con sus lesiones características, como la presencia de lesiones líticas en el hueso consecuencia de la diseminación metastásica de las células tumorales. No obstante, no es hasta el año 400 a.C, cuando Hipócrates bautiza este conjunto de enfermedades usando el término “carcinos” y “carcinoma” para describir los tumores. La palabra cáncer deriva de la palabra griega “*karkinos*” (cangrejo). Se cree que Hipócrates se refería a la apariencia que adoptan los vasos sanguíneos al vascularizar el tumor.

A pesar de conocer la existencia de tumores durante mucho tiempo, su estudio y caracterización solo ha tenido lugar durante estos últimos siglos. Una de las primeras personas en asociar una determinada causa con el cáncer fue Percivall Pott, un cirujano inglés que a finales del siglo XVIII se dio cuenta de que existía una relación entre el trabajo de deshollinador y el desarrollo de varios tipos de tumores. Pott fue así el primero en identificar un carcinógeno en el medio ambiente, el hollín.

Hoy sabemos que algunos tipos de tumores tienen un origen contagioso, como es el caso del cáncer de cuello de útero, que es debido al virus del papiloma humano. Sin embargo, la mayoría de tumores parecen producirse por una combinación compleja de factores. La gran mayoría de los cánceres, aproximadamente el 90-95% de los casos, tienen como causa principal los factores ambientales, mientras que los factores genéticos solo se relacionan con el 5-10% de los casos de cáncer. Cuando nos referimos a factores ambientales, no hacemos mención exclusivamente a la

contaminación, sino a cualquier factor que no se herede genéticamente, como son los relacionados con el estilo de vida o los factores económicos y de comportamiento. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer está relacionado con alguno de los cinco riesgos conductuales y dietéticos actuales: índice de masa corporal alto, baja ingesta de frutas y verduras, poca actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. Algunas infecciones virales como la hepatitis B, la hepatitis C y el virus del papiloma humano son responsables de hasta el 20% de las muertes por cáncer en los países subdesarrollados.

En la actualidad, el cáncer es la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades cardiovasculares, aunque se estima que a lo largo del siglo XXI el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados. A pesar de ello, se ha producido un aumento en la supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer gracias a los avances sociales, científicos y médicos que han tenido lugar en los últimos años.

## **SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER**

Las primeras evidencias científicas que pusieron de manifiesto la activación de respuestas inmunológicas específicas en individuos que estaban desarrollando un tumor se encuentran recogidas en numerosas descripciones histopatológicas de principios del siglo XIX. En ellas se ponía de manifiesto la presencia de células inflamatorias que habían sido atraídas al foco tumoral, lo cual fue interpretado como un intento de bloqueo del desarrollo de la enfermedad incipiente por parte del sistema inmunitario del paciente. Hoy en día sabemos que entre las células inmunológicas que son reclutadas al foco tumoral se encuentran tanto componentes del sistema inmunológico adaptativo (linfocitos T, células dendríticas (DCs), y en ocasiones linfocitos B), como innato (macrófagos y células natural killer).

En 1890, William Coley, cirujano del *Memorial Cancer Center* de Nueva York, se percató de la importancia que tenía el sistema inmunitario en el reconocimiento y la eliminación de algunos tipos de tumores. Coley observó que, en determinados casos, el tumor remitía después de que el paciente hubiese sufrido una infección de piel llamada erisipela. El cirujano estaba convencido de que existía una relación entre la remisión del tumor y la activación del sistema inmunológico provocada por la bacteria *Streptococcus pyogenes*, que causaba la infección. Descubrió, por medio de

trabajos de investigación, que también Robert Koch, Louis Pasteur y Emil von Behring habían descrito casos similares en pacientes oncológicos que habían desarrollado erisipela a consecuencia de infecciones post-quirúrgicas. En 1891, Coley inoculó bacterias (*S. pyogenes*) directamente en el tumor de un paciente de sarcoma que tenía una esperanza de vida muy corta y repitió la intervención durante varios meses, consiguiendo así la regresión del tumor. Finalmente, el paciente sobrevivió 8 años más. Tiempo después, utilizó una mezcla de bacterias muertas de *S. pyogenes* y *Serratia marcescens*, junto con endotoxinas activas a la que llamo “toxina de Coley”. En los casos de sarcoma de tejido blando, Coley alcanzó con su método una tasa de éxito del 10%. Los resultados fueron muy variables y los efectos secundarios considerables debido a las altas fiebres que producía. Desde una perspectiva histórica, podríamos decir que William Coley es el padre de la inmunoterapia del cáncer.

Paul Ehrlich fue uno de los primeros investigadores en plantear, de forma teórica, la idea de que el sistema inmunológico “vigilaba” los tumores impidiendo con gran eficiencia su implantación y el desarrollo posterior de la enfermedad, dando base teórica a las observaciones hechas por Coley. Ehrlich se basó así en la suposición de que, si los tumores no estuviesen bajo una estricta vigilancia inmunológica, la frecuencia de aparición de carcinomas sería mucho mayor de la que en realidad se observa.

A mediados del siglo XX, en 1949, el reputado inmunólogo Lewis McFarlane Burnet publicaba su teoría de la tolerancia inmunológica adquirida, en la que explicaba que aquellos linfocitos capaces de reconocer células propias eran eliminados durante el desarrollo del sistema inmune, en la etapa embrionaria del individuo (F. M. Burnet, 1961; M. Burnet, 1963). La verificación experimental de su teoría vino de la mano de Medawar y colaboradores (Billingham, Brent, & Medawar, 1954), reforzando una vez más la opinión de que el sistema inmune no podría responder a las células malignas por ser indistinguibles de las sanas. En 1960, ambos fueron galardonados con el premio Nobel en Medicina por este descubrimiento.

En los años 50, se realizaron trasplantes de tumores singénicos en ratones inmunocompetentes. El resultado de los estudios reveló que estos animales eran capaces de desencadenar una respuesta inmune contra una segunda infusión de células tumorales, consiguiendo así la eliminación de las células malignas. Estas observaciones pusieron de manifiesto la existencia de antígenos asociados a tumores (TAA) o de antígenos de trasplante asociados a tumor (TSTA) (Baldwin, 1955; Foley, 1953).

En 1957, Burnet y Thomas establecieron formalmente la teoría de la inmunovigilancia del cáncer (“*cancer immunosurveillance*”). Según ésta, los linfocitos eliminarían a los tumores en sus fases iniciales gracias a que las células transformadas expresarían antígenos específicos que permitirían su identificación y destrucción por parte del sistema inmunológico (F. M. Burnet, 1961, 1967; Thomas, 1982). No obstante, los primeros experimentos llevados a cabo en ratones atímicos o *nude*, los cuales se consideraba que eran completamente inmunodeficientes, revelaron que no existían diferencias significativas en la incidencia de tumores espontáneos o inducidos químicamente, en comparación con lo observado en ratones silvestres (Rygaard & Povlsen, 1974). La teoría de la inmunovigilancia no era errónea, pero fallaba su demostración experimental, ya que los ratones atímicos no son en realidad inmunodeficientes, debido a que poseen números normales y perfectamente funcionales de células natural killer (NK) y linfocitos T  $\gamma\delta$ , así como cantidades bajas, pero detectables, de linfocitos T  $\alpha\beta$  CD8, los cuales pueden, sin duda, contribuir a desarrollar respuestas citotóxicas frente a las células tumorales, cuestionando así los resultados obtenidos anteriormente (Ikehara, Pahwa, Fernandes, Hansen, & Good, 1984; Maleckar & Sherman, 1987). Sin embargo, el hecho de que el cáncer pueda progresar en individuos con una inmunidad funcional, sugiere que la inmunovigilancia es solo una de las dimensiones de la compleja interacción entre el sistema inmune y el cáncer.

No fue hasta el final de la década de los 90 cuando experimentos en ratones *knock-out* en distintos mediadores inmunológicos clave (*RAG1*<sup>-/-</sup>; *STAT1*<sup>-/-</sup>; *perforin*<sup>-/-</sup>; *IFN- $\gamma$* <sup>-/-</sup> e *IFNR- $\gamma$* <sup>-/-</sup>), los cuales eran realmente inmunodeficientes, mostraron una mayor incidencia de tumores que aquellos ratones inmunocomprometidos (Dighe, Richards, Old, & Schreiber, 1994; Kaplan et al., 1998) dando así validez a la teoría de la inmunovigilancia del cáncer postulada por Burnet y Thomas.

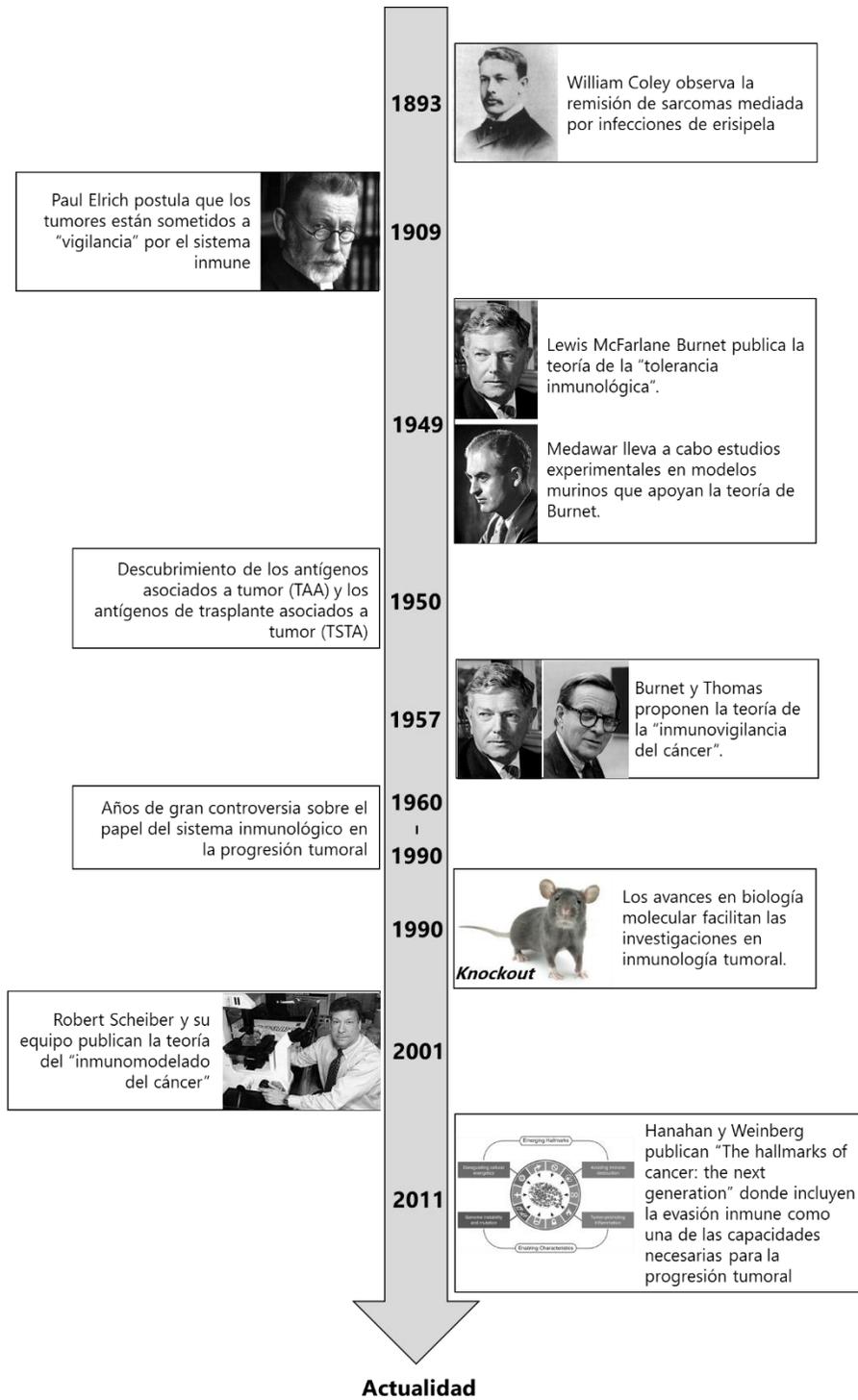
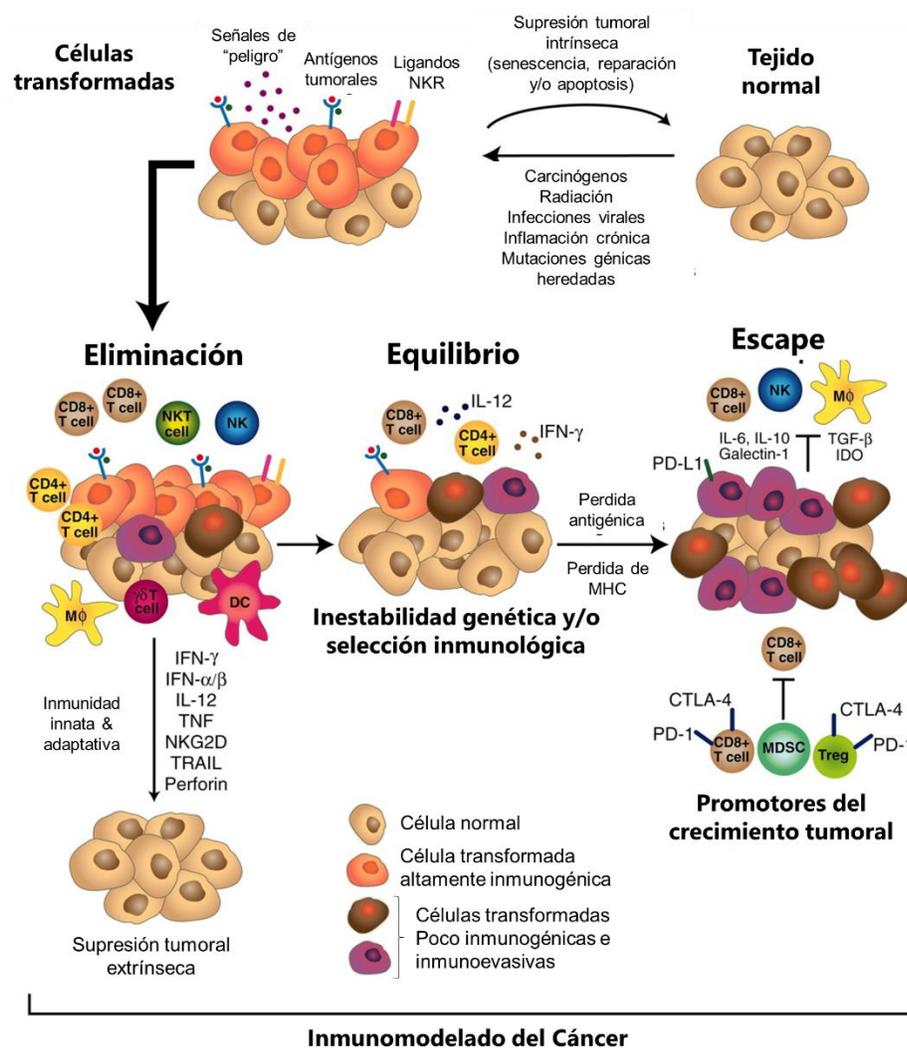


Figura I.1 Cronograma de los hitos históricos más importantes en el campo de la Inmunología Tumoral hasta la fecha.

Ya en el S.XXI, Schreiber y su equipo publicaron un artículo titulado “*Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*”, en el que el concepto de inmunovigilancia se amplía y queda englobado en otro mucho más complejo: el inmunomodelado (*immunoediting*) del cáncer. En esta teoría, como se explicará en mayor detalle a continuación, se propone un modelo de interacción entre el sistema inmune y el tumor en el que se distinguen tres fases: eliminación, equilibrio y escape; que explican con detalle los eventos inmunológicos que tienen lugar desde que una célula tumoral se transforma hasta que un tumor se manifiesta clínicamente (Dunn, Bruce, Ikeda, Old, & Schreiber, 2002).

Numerosas teorías se han ido sucediendo y complementando a lo largo del tiempo, en un intento de dilucidar el papel que tiene el sistema inmunológico durante el desarrollo tumoral, hasta constituir, finalmente, una auténtica disciplina científica denominada *Inmunología Tumoral*.

## Las tres E's del inmunomodelado del cáncer



**Figura I.2 El concepto de inmunomodelado del cáncer.** El inmunomodelado del cáncer es un mecanismo extrínseco de supresión de tumores que se activa solamente después de que ocurra una transformación celular y los mecanismos intrínsecos hayan fallado. En su forma más compleja, el inmunomodelado consta de tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de eliminación, la inmunidad innata y adaptativa trabajan conjuntamente para destruir los tumores incipientes antes de que se manifiesten clínicamente. Sin embargo, si una variante tumoral no es destruida en esta fase, entraría en una fase de equilibrio, en la cual, su crecimiento está bloqueado por mecanismos inmunológicos. Los linfocitos T, IL-12 e IFN-γ son necesarios para mantener a las células tumorales en un estado durmiente. Así mismo, las células NK y las moléculas que participan en la inmunidad innata no estarían presentes en esta fase, lo cual indica que el equilibrio es dependiente principalmente de la inmunidad adaptativa. La modulación de la inmunogenicidad del tumor ocurre en esta fase. Sin embargo, a consecuencia de la constante presión de selección inmune ejercida sobre las células tumorales, éstas pueden entonces progresar a una fase de escape en la que su crecimiento ya no es bloqueado por el sistema inmunitario y pueden avanzar hasta que la enfermedad es clínicamente aparente. Modificado de *Robert D. Schreiber et al. 2011*

## Eliminación

Esta etapa representa la idea clásica de la inmunovigilancia del cáncer postulada por Burnet y Thomas. El sistema inmunitario (tanto innato como adaptativo) es capaz de reconocer antígenos tumorales específicos y desarrollar una respuesta efectora adecuada sobre las células transformadas que los expresan. Según la teoría del “inmunomodelado” del cáncer, el sistema inmunitario actuaría como un “supresor de tumores exógeno” (Dunn, Old, & Schreiber, 2004b).

La evidencia experimental que supuso una prueba definitiva de que los linfocitos juegan un papel esencial en la inmunovigilancia del cáncer fue obtenida como consecuencia del estudio de los ratones deficientes en el gen activador de la recombinasa-2 (*Rag-2*<sup>-/-</sup>). Este enzima es el encargado del reordenamiento de los segmentos génicos variables V(D)J de las inmunoglobulinas y de los TCR (*T Cell Receptor*) presentes en los linfocitos, de modo que los ratones mutantes *Rag-2*<sup>-/-</sup> son deficientes en linfocitos B, T ( $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ) y en células NKT (Shinkai et al., 1992). Los experimentos realizados con este modelo murino demostraron que los linfocitos no solo protegen de la formación de sarcomas primarios inducidos químicamente, sino también de la aparición espontánea de tumores epiteliales (Shankaran et al., 2001). Resultados similares fueron obtenidos al estudiar el papel que juegan las células NK y NKT en el control del proceso tumoral. Así, la inhibición de la lisis mediada por estas células mediante el tratamiento con el anticuerpo monoclonal contra el marcador NK1.1 incrementa de 2 a 3 veces la susceptibilidad de desarrollar fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno (MCA) (Smyth, Crowe, & Godfrey, 2001). Desde entonces, decenas de modelos experimentales han sido publicados y, conjuntamente, evidencian un papel protector de los componentes efectores del sistema inmunitario innato y adaptativo en el rechazo de los tumores tanto espontáneos como inducidos.

Como consecuencia del crecimiento tumoral, se produce una remodelación del estroma y, tanto las células tumorales, como las estromales y los macrófagos, comienzan a secretar moléculas pro-inflamatorias que reclutan a células inmunológicas asociadas con la respuesta inmune innata, como son las células NK y NKT, linfocitos T  $\gamma\delta$ , macrófagos y células dendríticas (DCs) (Matzinger, 1994; Smyth, Godfrey, & Trapani, 2001). Estas células efectoras son capaces de identificar a las células tumorales a través de moléculas que se expresan en condiciones de estrés y que se unen a los receptores activadores NKG2D (*Natural Killer Group 2, member D*), DNAM-1 (*DNAX Accessory Molecule-1*) o NCRs (*Natural Cytotoxicity Receptors*) expresados en las células NK y

linfocitos T. Esta interacción propicia que las células efectoras se activen y produzcan determinadas citocinas, como el IFN- $\gamma$ , favoreciendo la eliminación de las células tumorales (Albertsson et al., 2003; Smyth, Cretney, et al., 2005).

En esta fase del inmunomodelado, las células NK estimuladas por los macrófagos destruyen una gran parte del tumor mediante la expresión en membrana de ligandos proapoptóticos como el ligando de Fas (FasL) o el ligando de Apo2/TRAIL (Apo2L/TRAIL); o mediante la secreción de perforinas y granzimas contenidas en sus gránulos citoplasmáticos, tras la activación de los receptores activadores (Johnsen et al., 1999; Montel, Bochan, Hobbs, Lynch, & Brahmi, 1995; Smyth, Cretney, et al., 2001; Smyth et al., 2000). Esta destrucción celular libera una gran cantidad de TAAs, los cuales son reconocidos por las células presentadoras de antígenos que los fagocitan, comenzando así la respuesta inmune adaptativa. Las DCs inmaduras, estimuladas por las condiciones pro-inflamatorias, migran a los ganglios próximos al tumor, donde presentan los TAA fagocitados a los linfocitos T vírgenes (*naïve*), que inician su expansión clonal. Una vez activados, los linfocitos T CD4 y CD8 específicos contra antígenos tumorales se infiltran en el tumor y ejercen su función de manera dirigida contra las células neoplásicas llegando a destruirlas (Ikeda, Old, & Schreiber, 2002; Shankaran et al., 2001).

Además de los datos resultantes de los ensayos con modelos murinos, también se han obtenido evidencias de la existencia de un proceso de inmunovigilancia del cáncer en humanos. Así, se ha demostrado que la presencia de linfocitos que infiltran los tumores epiteliales denominados TILs (*tumor infiltrating lymphocytes*) se relacionan con una mayor supervivencia del paciente en diferentes tipos de cáncer (Dushyanthen et al., 2015; Gasparri et al., 2015; Schatton, Scolyer, Thompson, & Mihm, 2014). Sin embargo, los resultados muestran que numerosas poblaciones tumorales pueden resistir la presión del sistema inmune y desarrollarse en un individuo inmunocompetente.

### Equilibrio

Si la eliminación de las células transformadas en la etapa anterior no fue completa, la teoría del inmunomodelado del cáncer propone la existencia de una fase temporal de equilibrio dinámico entre el sistema inmunitario y el tumor en desarrollo. Esta fase es la más larga de las tres que

componen la teoría del “inmunodelado”. Los mecanismos moleculares que desencadenan la fase de equilibrio han sido poco estudiados debido a la dificultad de establecer modelos murinos (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004b; Thomas, 1982). Experimentos de xenotrasplante de tumores realizados en ratones con un sistema inmunológico comprometido revelaron que la inmunidad de un organismo no sólo puede eliminar las células cancerígenas, sino que además puede “moldear” o “esculpir” el carácter inmunogénico de un tumor en desarrollo. Así, al transplantar tumores que se habían formado en donantes tanto inmunodeprimidos como inmunocompetentes en receptores con un sistema inmunológico deficiente, se observó que los tumores de ambos orígenes progresaban en todos los casos. Sin embargo, si se trasplantaban tumores de ratones inmunodeprimidos en receptores con un sistema inmunitario normal, casi la mitad de los mismos eran rechazados. Por tanto, los tumores formados en presencia de un sistema inmunológico deficiente son, como grupo, más inmunogénicos que aquellos que se desarrollan en individuos inmunocompetentes (Shankaran et al., 2001). Esto se debe a que durante esta fase, y debido a la inestabilidad genética y cromosómica asociada al cáncer, se van generando nuevas variantes tumorales. Si estas variantes son muy inmunogénicas, serán rápidamente eliminadas por el sistema inmunitario, pero si estas variantes son poco inmunogénicas o generan mecanismos de evasión inmune no van a ser eliminadas y se irán fijando en la población tumoral.

Recientemente, otro estudio compara el microambiente celular de los tumores en equilibrio con aquellos que han entrado en fase de escape. Se encontraron mayores cantidades de células T CD8, células NK, linfocitos T  $\gamma\delta$  y una menor proporción de células NKT, linfocitos T reguladores (Treg) FoxP3<sup>+</sup> y MDSCs (células supresoras derivadas mieloides) en aquellos tumores que se encontraban en fase de equilibrio (X. Wu et al., 2013). Este estudio sugiere que el balance entre células inmunosupresoras y el componente celular citotóxico es capaz de llevar a cabo una respuesta inmune antitumoral que determina la permanencia del tumor en un estado durmiente. Aún no se ha determinado qué cambios en el balance favorecen el escape inmunológico o la eliminación, pero es probable que la evolución de las variantes tumorales que carecen de TAA o de la capacidad de presentarlos sea un factor importante que contribuye a la decisión del proceso.

Debido a la presión ejercida por el sistema inmunológico, resultarían clones tumorales con una capacidad antigénica reducida, de forma que algunos de ellos podrían ser capaces de evadir los mecanismos de defensa inmunitarios del individuo, lo que conduce a la última etapa de este modelo (Dunn et al., 2002; Dunn, Old, & Schreiber, 2004a).

## Escape

En esta fase, las variantes tumorales seleccionadas en la etapa de equilibrio por su baja inmunogenicidad y por su capacidad de evadir el sistema inmunitario son capaces de desarrollarse en un entorno inmunológicamente activo y manifestarse clínicamente. En este sentido, se han descrito numerosas estrategias de evasión de la respuesta inmunitaria por parte de los tumores. Un hecho común en las células transformadas es la pérdida o disminución de moléculas del MHC (*major histocompatibility complex*) de clase I (MHC-I), denominadas HLA (*human leukocyte antigens*) en humanos, o de los mecanismos de procesamiento y presentación antigénica, con el fin de evitar el reconocimiento de los tumores por los linfocitos T citotóxicos (Campoli & Ferrone, 2008). Este mecanismo ha sido observado en mayor o menor medida en aproximadamente el 80% de los tumores, en los cuales es importante la respuesta antitumoral mediada por células NK, ya que uno de los mecanismos de activación de estas células es el reconocimiento de la “ausencia” de las moléculas HLA, como explicaremos más adelante. A pesar de los esfuerzos del sistema inmune, las células tumorales consiguen aumentar la expresión de otras moléculas HLA no clásicas, como HLA-G, inhibiendo así la respuesta de las células NK (Rouas-Freiss, Moreau, Menier, & Carosella, 2003). Sin embargo, datos recientes muestran que HLA-G, no solo tendría un papel en la evasión inmune, sino que inhibiría la proliferación de células B malignas a través de la interacción con su receptor ILT2 (Rouas-Freiss, Moreau, LeMaout, & Carosella, 2014).

Asimismo, son numerosos los factores solubles que son producidos y liberados al microambiente, no solo por las propias células tumorales, sino también por determinadas células inmunológicas. Así, por ejemplo, los linfocitos Treg ( $CD4^+$ ,  $CD25^{\text{bright}}$   $Foxp3^+$ ) son linfocitos que se expanden y migran a los focos tumorales, donde constituyen una de las fuentes principales de  $TGF-\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), una potente citocina inmunosupresora que, entre otras acciones, inhibe el desarrollo y la proliferación de diferentes componentes del sistema inmunológico, tanto innato como adaptativo (Strauss et al., 2007).

Otros factores solubles de producción tumoral asociados a una supresión inmunológica son la citocina IL-10 (Sato et al., 2011), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Gabrilovich et al., 1998), la prostaglandina E2 (PGE2) (Phipps, Stein, & Roper, 1991), la fosfatidilserina (Hoffmann et al., 2005), Fas soluble (Abbasova et al., 2009), FasL (Ligando de

FAS) soluble y los ligandos solubles de receptores activadores e inhibidores de las células NK (Groh, Wu, Yee, & Spies, 2002; E. Song et al., 2001). Estos y otros factores, así como células del propio microambiente tumoral (macrófagos asociados a tumor, células reguladoras, etc.), contribuyen a la generación de unas condiciones inmunosupresoras favorables para el mantenimiento y la progresión tumoral.

## **CÉLULAS NATURAL KILLER Y SU PAPEL EN LA INMUNOVIGILANCIA DEL CÁNCER**

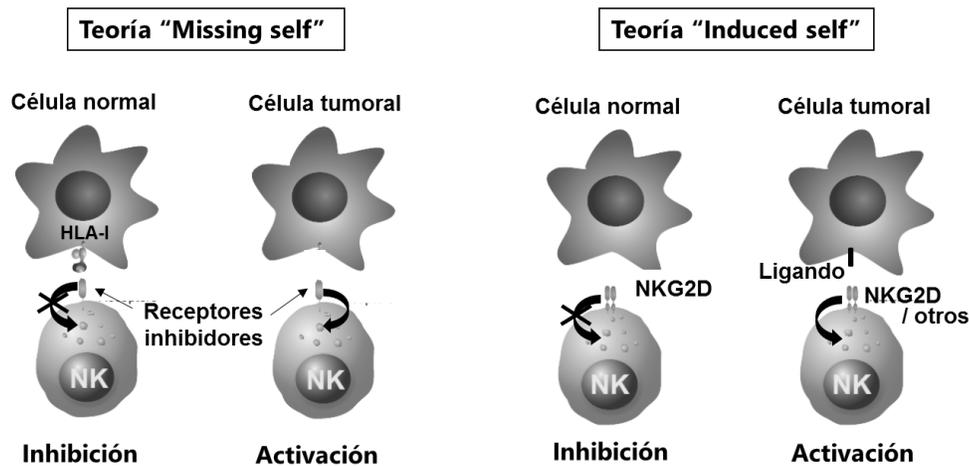
A principios de 1970, las células NK fueron descritas como una subpoblación de linfocitos con la capacidad de responder de manera espontánea frente a tumores sin haber sido sometidas a una inmunización previa. Durante los últimos 40 años, se ha ido conociendo más sobre la biología y las funciones de estas células. Las células NK están presentes en todo el organismo, aunque se localizan principalmente en sangre periférica, bazo, tejidos linfoides y médula ósea. Además, pueden ser atraídas a focos inflamatorios por la acción de diferentes señales quimiotácticas. Tras su activación, las NK liberan sobre las células diana gránulos citotóxicos que contienen perforina y varios tipos de proteasas granzima (principalmente A y B), induciendo así la apoptosis de estas células. Un segundo mecanismo efector de las células NK es su capacidad de secretar una serie de citocinas y quimiocinas, incluyendo IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor  $\alpha$* ), GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*), MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage Inflammatory Protein-1a*) y RANTES (*Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted*). De hecho, las células NK son las principales productoras de IFN- $\gamma$  *in vivo*, el cual es crucial para promover una respuesta Th1 (Bradley, Dalton, & Croft, 1996).

En humanos, las células NK se definen como células linfoides CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> y comprenden entre el 5-20% de los linfocitos en sangre periférica. Se pueden dividir en dos subpoblaciones, denominadas CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> (Cooper, Fehniger, & Caligiuri, 2001). La población CD56<sup>dim</sup> predomina en la sangre, constituyendo un 95% del total de células NK. En los sitios de inflamación, muestran un gran potencial citotóxico y, en términos generales, expresan receptores inhibitorios específicos para MHC-I. Por el contrario, la subpoblación CD56<sup>bright</sup> predomina en los ganglios linfáticos (~75% de las células NK) y mayoritariamente, tras su activación, son productoras de citocinas con un menor potencial citotóxico; además, se considera

que representan un estado precursor que termina por diferenciarse a células NK CD56<sup>dim</sup> (Chan et al., 2007).

Una de las peculiaridades de este tipo de linfocitos es el complejo sistema de regulación al que se ve sometida su actividad citotóxica y, sobre todo, los diversos mecanismos de reconocimiento que les permiten distinguir entre las células “sanas” y aquellas que están sometidas a algún tipo de estrés, como pueden ser las infectadas por virus o las células tumorales, frente a las que desencadenan las respuestas inmunitarias específicas. De forma llamativa, y aunque han sido englobadas desde un principio en el sistema inmunológico innato, son varios los trabajos que sugieren que las células NK comparten varias propiedades comunes con determinados componentes del sistema inmunológico adaptativo, como los linfocitos T citotóxicos (Sun & Lanier, 2009). Además, se sabe que las NK ejercen efectos reguladores sobre el sistema inmune adaptativo, particularmente sobre DCs y linfocitos T (Fu, Tian, & Wei, 2014).

Las células NK poseen un gran número de receptores inhibidores y activadores en su superficie, a través de los cuales se integran las señales que reciben de sus correspondientes ligandos que se hayan presentes en las células diana. Los numerosos avances logrados en los últimos años en el campo de la biología de las células NK han permitido proponer dos teorías que describen los mecanismos que regulan su actividad:



**Figura I.3. La actividad de las células NK está regulada por un balance de estímulos que son transmitidos por receptores inhibidores y activadores.** Algunos receptores inhibidores (como los KIR) interaccionan con moléculas “propias”, como las proteínas del HLA-I, que se expresan en condiciones “normales”, reprimiendo la actividad de las células NK. La transformación tumoral (junto con el daño genotóxico que conlleva) y las infecciones víricas reducen la expresión de las moléculas del HLA-I (“missing-self”), de forma que la señal de inhibición se pierde. Al mismo tiempo, en esas condiciones de estrés celular se induce la expresión de proteínas “propias”, como son las MIC y las ULBPs, que, al unirse con determinados receptores activadores (NKG2D en la imagen), son capaces de

activar a las células NK para que lisen a las células que las expresan (“*induced-self*”). Extraído y modificado de *Gonzalez S. et al.* 2011.

## **Modelo de reconocimiento de la pérdida de lo propio**

Se basa en las observaciones que originalmente llevaron a cabo Kärre y cols. (*Missing-self theory*), los cuales demostraron que las células tumorales con una expresión deficiente de moléculas del MHC-I eran lisadas de forma selectiva por la acción de las células NK (Karre, Ljunggren, Piontek, & Kiessling, 1986). De ello se deducía, por tanto, que las células “sanas” se encontraban protegidas frente a la actividad lítica de las NK, gracias a la expresión constitutiva en su superficie de estas moléculas inhibitoras propias (“*self*”). Hoy en día se conoce la existencia de numerosos receptores inhibidores en las células NK. Algunos de ellos reconocen a las moléculas del HLA-I clásicas como, por ejemplo, los KIR (*Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*) en humanos o los Ly49 en ratones; mientras que otros receptores, como el CD94/NKG2A que se asocia al HLA-E, se unen a moléculas del HLA no clásicas. Esta estrategia difiere de la llevada a cabo por los linfocitos B y T, que reconocen de manera específica la presencia de antígenos extraños (“*non-self*”) en las células diana, a través de un repertorio variado de receptores polimórficos de membrana. Por tanto, este modelo de regulación de las células NK explicaría por qué las células tumorales o las infectadas por virus, muchas de las cuales presentan generalmente una expresión reducida de las moléculas del HLA-I, son destruidas por acción de las células NK. Sin embargo, esta teoría no es capaz de esclarecer los mecanismos que determinan que las células NK no lisen algunas células autólogas que no expresan moléculas del HLA-I en su membrana (como los eritrocitos), o que se activen ante determinadas células tumorales en las que se mantiene un nivel normal de las proteínas del HLA-I.

## **Teoría de la inducción de lo propio**

Esta teoría se denominó “*induced-self*” o inducción de lo propio, y en ella se postula la existencia de receptores activadores en las células NK cuyos ligandos se expresan de forma específica en la superficie de las células que están sometidas a algún tipo de estrés (infecciones víricas, daño genotóxico, transformación tumoral, etc.) mientras que apenas se detecta su expresión en las

células sanas (Raulet, 2003). Entre estos receptores activadores destacan NKG2D, DNAM-1 y los NCRs. NKG2D, que en humanos reconoce a las moléculas MIC (*MHC class I-chain related proteins*) y a las ULBPs (*UL16-binding proteins*) (Cerwenka & Lanier, 2001a). Mientras que DNAM-1 tiene como ligandos a PVR (*Poliovirus Receptor* – CD155) y Nectina-2 (CD112) (Bottino et al., 2003). Los NCRs son un conjunto de 3 receptores descubiertos a finales de la década de 1990 presentes en las células NK humanas: NKp46 (NCR1; CD335), NKp44 (NCR2; CD336) y NKp30 (NCR3; CD337) (Kruse, Matta, Ugolini, & Vivier, 2014). La unión de estos receptores a sus ligandos induce la liberación de gránulos citotóxicos que lisan las células diana.

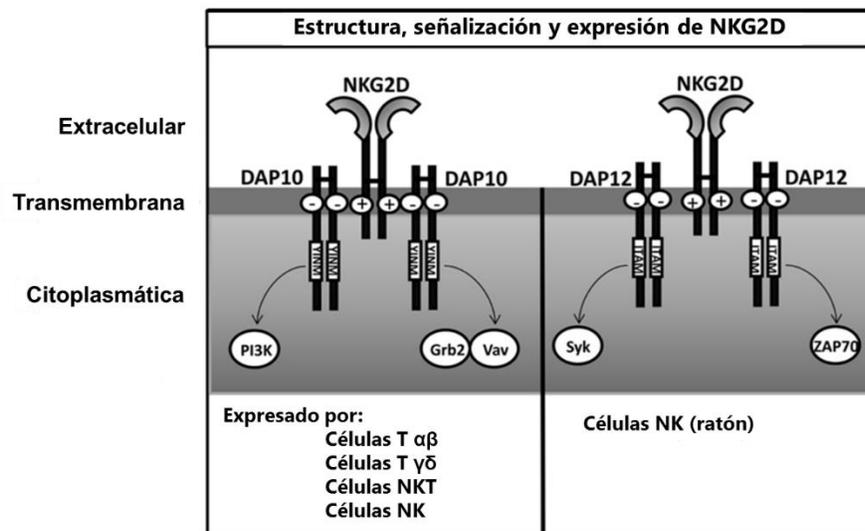
Si bien está establecido que los receptores inhibidores de las células NK poseen mayor afinidad por la unión a su ligando que los receptores activadores y, por ello, la señal de inhibición es generalmente dominante sobre la activadora, diversos estudios han demostrado que la unión de NKG2D con sus ligandos es capaz de activar respuestas citotóxicas en las NK frente a células tumorales incluso en presencia de niveles normales de moléculas del HLA-I. Este hecho indica que la señalización a través de este receptor es una de las vías más potentes involucradas en la regulación de las células NK (Cerwenka & Lanier, 2001a; Diefenbach & Raulet, 2001).

## **Sistema de “alarma” en las células NK: receptores activadores**

### NKG2D y sus ligandos

NKG2D (*Natural Killer Group 2, member D*; KLRG1; CD314) es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C. Se expresa de forma constitutiva en la superficie de las células NK, linfocitos T  $\gamma\delta$ , así como en linfocitos T CD8 y células NKT-like. Asimismo, en determinadas patologías como la artritis reumatoide o la leucemia linfoide crónica (LLC), se ha observado la presencia de este receptor en la membrana de linfocitos T CD4 (Huergo-Zapico et al., 2014; Maccalli, Scaramuzza, & Parmiani, 2009). NKG2D está codificado por el gen *KLRK1*, el cual se encuentra localizado en la región NKC (*Natural Killer gene Complex*) del cromosoma 12 humano (y cromosoma 6 murino). De forma análoga a otros receptores activadores, NKG2D se constituye como un complejo multimérico, en concreto un hexámero, en el que un homodímero del receptor se asocia a través de su región transmembrana con dos monómeros de moléculas adaptadoras citoplasmáticas especializadas, denominadas DAP10 y

DAP12 (Garrity, Call, Feng, & Wucherpfennig, 2005). En ratones, NKG2D puede interaccionar con ambas proteínas adaptadoras, mientras que en humanos el receptor sólo se une a DAP10. Esta diferencia en el patrón de asociación con DAP10 y DAP12 es debida a que en ratones existen dos isoformas de NKG2D (una corta y una larga), como consecuencia de un mecanismo de procesamiento alternativo del mRNA. En humanos, únicamente se ha descrito la existencia de la isoforma larga de NKG2D, la cual solo se une a DAP10 pero no a DAP12. De esta forma, tras la unión de NKG2D con sus ligandos, DAP10 es fosforilada por proteínas-quinasas pertenecientes a la familia SRC, lo que resulta en el reclutamiento de la subunidad p85 de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) o de la proteína Grb2 (*Growth Factor Receptor-bound Protein 2*), las cuales se unen de forma excluyente a DAP10 (Figura I.4).



**Figura I.4 Estructura del complejo formado entre el receptor NKG2D y las proteínas adaptadoras DAP10 y DAP12.** En ratones existen dos isoformas de NKG2D (una larga y otra corta), mientras que, en humanos, solo se expresa la isoforma larga del receptor. NKG2D se une a través de su región transmembrana a proteínas adaptadoras, necesarias para la transmisión de la señal activadora recogida por el receptor. Dependiendo de la isoforma de NKG2D que se exprese, este receptor se puede unir a la proteína adaptadora DAP10 (isoformas corta y larga) y/o a DAP12 (isoforma corta de NKG2D). La señalización a través de DAP10 implica la activación de las proteínas PI3K y Grb2, mientras que DAP12 es fosforilada por la acción de las tirosín-quinasas Syk y ZAP-70. Extraído de *Spear P. et al.* 2013

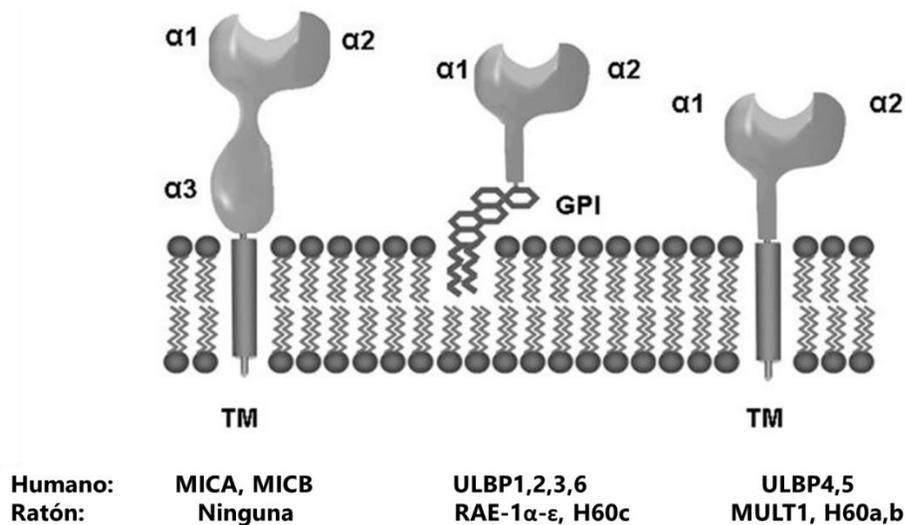
En último término, esta asociación desencadena una liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular que activa a las células NK, las cuales liberan gránulos citotóxicos (perforinas y granzimas) y comienzan a producir IFN- $\gamma$ , causando así la lisis de las células diana (Upshaw et al., 2006). Además de inducir respuestas citotóxicas, varios trabajos han postulado que NKG2D, a través de su asociación con DAP10, puede ejercer también funciones co-estimuladoras del receptor TCR de los linfocitos T

CD8 de forma similar a las desempeñadas por la molécula CD28 (Bauer et al., 1999; Maasho, Opoku-Anane, Marusina, Coligan, & Borrego, 2005). El cultivo *in vitro* de células NK junto con células que expresan ligandos de NKG2D produce bajos niveles de lisis de las células diana, lo que sugiere que se requieren mecanismos adicionales para lograr una señal efectiva mediada por NKG2D. Así, se ha descrito que la expresión del receptor en la superficie de las células inmunes, particularmente las células NK, puede ser modulada por distintas citocinas. Aunque hay gran controversia sobre el papel que ejercen determinadas citocinas sobre la regulación del receptor NKG2D, se sabe que IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21 aumentan su expresión, mientras que el TGF- $\beta$  y el IFN- $\gamma$  (exógeno) ejercen un efecto contrario (Burgess et al., 2008; Eisele et al., 2006; Horng, Bezbradica, & Medzhitov, 2007; H. Song et al., 2006; Takaki et al., 2005; C. Zhang et al., 2005).

Dado que los ligandos de NKG2D se expresan casi exclusivamente en la superficie de las células transformadas o infectadas, numerosos trabajos han sugerido que NKG2D puede jugar un papel relevante en el reconocimiento y el rechazo de las células tumorales. En este sentido, la generación de un modelo murino deficiente en NKG2D ha supuesto la primera evidencia *in vivo* de vigilancia inmunológica frente a tumores primarios a través de un receptor asociado a células NK (Guerra et al., 2008). Los ratones *Klrk1*<sup>-/-</sup> son viables y se desarrollan con normalidad, además presentan porcentajes normales de linfocitos y células NK, lo que sugiere que NKG2D es prescindible para el desarrollo de dichas células inmunológicas. Asimismo, la ausencia de NKG2D no altera la respuesta citotóxica de las células NK mediada por otros receptores activadores, tales como Ly49D o NKp46, frente a las células transformadas. Por otro lado, los ratones *Klrk1*<sup>-/-</sup> muestran una mayor incidencia de tumores espontáneos, tanto en modelos de cáncer de próstata TRAMP (*Transgenic Adenocarcinoma Murine Prostate*), como en modelos de linfomas B (Guerra et al., 2008). En conjunto, estos resultados demuestran, por tanto, que NKG2D desempeña un papel crucial en la respuesta inmunológica *in vivo* frente al desarrollo de tumores espontáneos.

En humanos, NKG2D reconoce a dos familias de proteínas de membrana relacionadas con el HLA-I, que están codificadas por genes localizados en diferentes regiones del cromosoma 6: las moléculas MIC, que incluyen a MICA y MICB; y la familia de las ULBPs (*UL16-binding proteins*) o RAET1 (*retinoic acid early transcripts 1*) en ratones (Eagle & Trowsdale, 2007), que deben su nombre a que algunas de estas proteínas, como ULBP1 y ULBP2, se unen a la proteína UL16

del citomegalovirus humano (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001). Hasta el momento, se ha descrito la existencia de 6 miembros de la familia génica de las ULBPs (ULBP1-6).



**Figura I.5 Representación esquemática de las propiedades bioquímicas y estructurales de los ligandos de NKG2D.** MICA/B son codificados por genes cercanos al gen de HLA-B en la región del MHC y presentan dominios extracelulares  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ , así como una región transmembrana y una cola citoplasmática. Las ULBPs son codificadas por genes localizados en 6q24.2-q25.3 y presentan solamente dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ . Algunas ULBPs poseen dominios transmembrana (ULBP4 y 5), mientras que otras presentan un anclaje de tipo glicosilfosfatidilinositol o GPI (ULBP1, 2, 3 y 6). Extraído de *Huergo-Zapico et al.*, 2014.

Aunque los ligandos de NKG2D (NKG2DLs) comparten una baja similitud de secuencia de aminoácidos (aproximadamente de un 20% a un 40% de identidad), estas moléculas poseen una estructura tridimensional similar, tal y como muestran los análisis cristalográficos que se han llevado a cabo con algunas de estas proteínas. No obstante, existen diferencias sustanciales en los dominios que las conforman. Así, mientras MICA, MICB, ULBP4 y ULBP5 son proteínas transmembrana, ULBP1, 2, 3 y 6 están ancladas a la membrana celular mediante una unión de tipo GPI (glicosilfosfatidilinositol). Más aún, MICA y MICB poseen tres dominios de tipo inmunoglobulina ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ), mientras que las ULBPs carecen del dominio  $\alpha 3$ . Asimismo, aunque su estructura está relacionada con la de las moléculas del HLA-I (comparten aproximadamente un 25% de homología entre ellas), los NKG2DLs no presentan péptidos antigénicos ni se asocian con  $\beta 2$ -microglobulina (ver Figura I.5). Una característica reseñable del sistema NKG2D/NKG2DLs es, por tanto, la promiscuidad de ligandos que presenta el receptor. Aunque el significado biológico de este hecho es aún desconocido, se ha propuesto que la existencia de tal complejidad de ligandos, puede suponer un mecanismo de defensa perfeccionado ante procesos

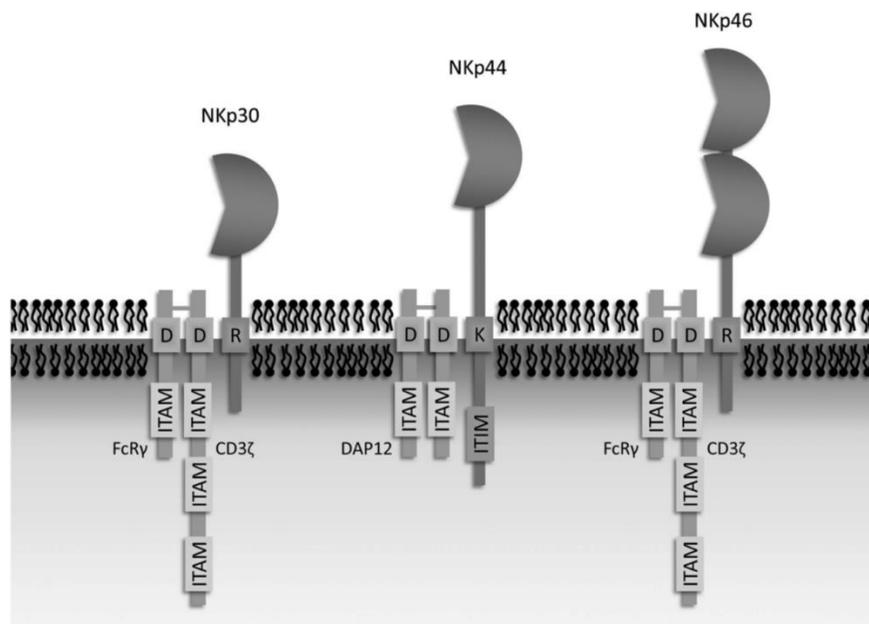
de evasión de la respuesta inmunológica por parte de células tumorales o infectadas (Gonzalez, Groh, & Spies, 2006).

### Receptor DNAM-1 y sus ligandos

Otro receptor activador involucrado en la respuesta antitumoral mediada por células NK es DNAM-1 que, al igual que NKG2D, es una glicoproteína transmembrana que se expresa de manera constitutiva en la mayoría de linfocitos T, células NK y macrófagos. Los ligandos de DNAM-1, PVR y nectina-2, fueron inicialmente descritos como moléculas de adhesión que, mayoritariamente, regulaban la migración trans-endotelial. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que su expresión está aumentada en algunos tumores. Al igual que los ligandos de NKG2D, también se han hallado formas solubles de PVR en el suero humano y en los sobrenadantes de cultivos celulares, lo cual sugiere que podrían estar implicados en mecanismos de evasión tumoral.

### NCRs y sus ligandos

Los NCRs son un grupo muy heterogéneo de receptores activadores descubiertos a finales de 1990. Todos ellos son proteínas transmembrana tipo I pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas que contienen uno o dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina a los cuales se unen los ligandos.



**Figura I.6 Estructura de los NCRs y sus moléculas adaptadoras.** Extraído de *Philip H Kruse et al.*; 2014.

Aunque la importancia de los NCRs en la eliminación de las células tumorales era conocida hace tiempo, los primeros ligandos identificados fueron proteínas virales como la proteína p65 del citomegalovirus humano, que fue identificada como uno de los ligandos de NKp30. Además, algunos componentes bacterianos han demostrado su capacidad de activar las células NK a través de la interacción con los NCRs. Por ejemplo, las NK pueden ser directamente activadas por *Mycobacterium bovis* (BCG) a través de la unión con NKp44 (Esin et al., 2004). En la actualidad sabemos que los ligandos de los tres NCRs están presentes en líneas tumorales de diversos orígenes, aunque algunos tejidos sanos también expresan ligandos para estos receptores. Por ejemplo, las DCs inmaduras pueden ser eliminadas por células NK activadas vía NKp30 (Ferlazzo et al., 2002), y la capacidad inmunoestimuladora de las DCs puede ser potenciada por las células NK vía NKp30 (Wehner, Dietze, Bachmann, & Schmitz, 2011).

La primera molécula celular identificada como ligando de NKp44 fue PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Aunque PCNA se asoció con el cáncer, fue sorprendente que se identificara como un ligando de NKp44, ya que su expresión estaba restringida al núcleo. Hoy en día sabemos que la expresión de PCNA está relacionada con la inhibición del potencial citotóxico de las células NK contra los tumores, en concreto con una disminución de la secreción de IFN- $\gamma$  (Garzetti et al., 1994). Además, se ha observado que PCNA co-localiza con HLA-I en la superficie de linfocitos

B en linfoma difuso de células B proporcionando un posible mecanismo que explica la expresión de PCNA en la superficie celular (Horton, Mathew, & Mathew, 2013).

Recientemente, ha sido identificado otro ligando celular para NKp44 denominado NKp44L (Baychelier et al., 2013). La secuencia de este nuevo ligando coincide parcialmente con la secuencia del gen MLL5 (*Mixed-Lineage Leukaemia protein 5*) aunque carece de los últimos 5 exones. MLL5 tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular. Aunque la expresión de MLL5 está restringida exclusivamente al núcleo, no se ha encontrado expresión de NKp44L en el núcleo, sino que únicamente está presente en el citoplasma. Sin embargo, las diferencias en la localización y distribución sugieren que NKp44L y MLL5 tienen diferentes funciones (Baychelier et al., 2013).

Por otro lado, *HLA-B-associated transcript 3* (BAT3) se ha identificado como un ligando de NKp30 (Pogge von Strandmann et al., 2007). Se ha descrito que BAT3 está involucrado en la respuesta celular al estrés y al daño genético mediada por p53; además, se sabe que tiene un papel importante en la apoptosis (W. Wu et al., 2012). Aunque se pensaba que, al igual que PCNA, la expresión de BAT3 estaba restringida al núcleo, en la actualidad sabemos que en células tumorales y en células apoptóticas la expresión de BAT3 se ve inducida y la proteína puede ser liberada al exterior a través de exosomas donde BAT3 se encontraría anclada a la membrana (Simhadri et al., 2008). Además, la disminución de la expresión de BAT3 en las células tumorales provoca una disminución de la citotoxicidad, sin embargo, la forma soluble de BAT3 incrementa la liberación de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por las células NK (Pogge von Strandmann et al., 2007). El único ligando de NKp30 que es una proteína transmembrana es B7-H6 (Baratin & Vivier, 2010). Pertenece a la familia B7 y como otros miembros de esta familia posee dos dominios inmunoglobulina extracelulares. Al menos por el momento no se ha encontrado expresión de B7-H6 en tejidos sanos, sin embargo se expresa en varios tipos de tumores, donde parece tener un papel relevante en la citotoxicidad mediada por células NK (Baratin & Vivier, 2010).

## **Regulación de los ligandos de NKG2D en cáncer**

Debido a la importancia del sistema NKG2D/NKG2DL para el desarrollo de esta tesis, nos centraremos en la descripción de los mecanismos que regulan la expresión de los ligandos de

este receptor, teniendo en cuenta que algunos de los mecanismos también están implicados en la regulación de los ligandos de otros receptores activadores.

El descubrimiento de moléculas “propias” cuya expresión está inducida en células tumorales ha supuesto, sin duda, un nuevo impulso para la *Inmunología Tumoral*. En este sentido, varios trabajos han evidenciado que la expresión natural o inducida de los ligandos de NKG2D, mediante el uso de determinados tratamientos farmacológicos, estimula drásticamente la capacidad de reconocimiento y de lisis de las células tumorales por parte de las células NK *in vitro* (Bauer et al., 1999; Bottino et al., 2003; Cosman et al., 2001). Así, varios estudios llevados a cabo en modelos animales han demostrado que la expresión de los ligandos humanos o murinos de NKG2D en las células tumorales favorece el rechazo inmunológico de los tumores incipientes *in vivo*, incluso cuando dichas células presentan niveles normales de las moléculas del HLA-I (Cerwenka & Lanier, 2001b; Smyth, Swann, et al., 2005). Por tanto, y considerando la relevancia terapéutica que potencialmente subyace a la modulación de la expresión de los ligandos de NKG2D en las células cancerígenas, una cuestión que surge es: ¿Qué procesos moleculares son los causantes de los altos niveles de expresión que presentan estas moléculas en células que inician el proceso tumoral?

Probablemente, uno de los trabajos más relevantes en este sentido fue llevado a cabo por Gasser y cols., los cuales demostraron que la transformación maligna de células primarias murinas mediante la transfección de diferentes oncogenes (como E1A, RasV12 o c-myc), o incluso la carencia de supresores de tumores como p53, no inducen la expresión de los NKG2DLs *in vitro*. Sin embargo, cuando las células transformadas eran implantadas en ratones inmunodeficientes, las líneas tumorales derivadas de los mismos sí presentaban altos niveles de expresión de estas moléculas (Gasser, Orsulic, Brown, & Raulet, 2005). En este sentido, el trabajo demuestra de forma fehaciente que el daño genotóxico es un proceso clave que regula la expresión de los NKG2DLs observada en las células tumorales, a través de un proceso que es dependiente de las quinasas ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) y ATR (*ATM- and Rad3-related*). Por tanto, los altos niveles de expresión de los NKG2DLs detectados en las células que inician el proceso tumoral pueden ser explicados, al menos en parte, por la activación crónica de las vías de respuesta al daño genotóxico que es consecuencia de la inestabilidad genómica inherente a las fases iniciales de los tumores (Gasser et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Trabajos posteriores de otros autores han señalado que el restablecimiento de la función de p53 es capaz de inducir la expresión de ULBP1 y ULBP2 en células tumorales (Li et al., 2011; Textor et al., 2011). Dado que ATM y ATR son

capaces de activar a p53, estos autores sugieren que la inducción de los NKG2DL, tras un daño genotóxico, puede seguir un mecanismo dependiente o independiente de p53.

Sin embargo, otros estudios llevados a cabo en modelos celulares diferentes han puesto de manifiesto que la expresión proteica de las RAE1 o de MICA sí se ve incrementada por la acción de oncogenes como E1A o BCR/ABL respectivamente, lo que sugiere que, probablemente, el papel de los oncogenes en la regulación de los NKG2DLs es dependiente del origen de la línea celular transformada o de otros factores adicionales (Boissel et al., 2006; Routes et al., 2005).

Varios estudios han demostrado la implicación de los factores de transcripción (TFs) Sp1 y Sp3 en la expresión de NKG2DLs en células tumorales (Lopez-Soto, Quinones-Lombrana, Lopez-Arbesu, Lopez-Larrea, & Gonzalez, 2006; Rodriguez-Rodero et al., 2007; Venkataraman, Suciú, Groh, Boss, & Spies, 2007). Estos TFs juegan un papel fundamental en la estimulación de la transcripción de genes *housekeeping* que carecen de caja TATA. Sin embargo, se encontró que los factores Sp estaban involucrados en la regulación epigenética de los ligandos o, aún más, en los procesos de trans-diferenciación celular relacionados con la progresión tumoral y la metástasis, como la transición epitelio-mesénquima (EMT). Así, la activación de los procesos de EMT en cánceres epiteliales a través de la inhibición de la actividad de Snail-1 o GSK-3, hace que las células-EMT sean más susceptibles a la lisis mediada por células NK (Lopez-Soto, Huergo-Zapico, et al., 2013). La inducción de los ligandos de NKG2D en la EMT esta mediada por Sp1, destacando así el papel de esta familia de TFs en la regulación de los NKG2DLs en cáncer. Además, se ha sugerido que otros TFs podrían controlar la expresión de los ligandos. La unión de HSF-1 (*heat-shock factor 1*) a HSE (*heat-shock elements*) en las regiones promotoras de MICA y MICB es crucial para la inducción de estas moléculas durante un proceso de estrés térmico (Groh et al., 1996; Venkataraman et al., 2007). Así mismo, se ha visto que la expresión de RAE-1 está acoplada directamente con la proliferación, siendo inducida bajo condiciones de altas tasas de proliferación celular, como ocurre en el cáncer. En consecuencia, la transcripción de los genes humanos que codifican los NKG2DLs y *Raet1* es activada por TFs de la familia E2F, cuyo papel como factores oncogénicos que regulan la expresión de genes relacionados con la transición G1/S y la síntesis de DNA está claramente establecida (Cam & Dynlacht, 2003; Jung, Hsiung, Pestal, Procyk, & Raullet, 2012). Otro estudio muestra que la expresión de los ligandos murinos de NKG2D, RAE-1 $\epsilon$  y MULT-1, en la superficie celular esta incrementada en células deficientes en JunB, un componente del complejo AP-1 (*Activator Protein-1*), el cual es un TF que regula la apoptosis y la

proliferación (Nausch et al., 2006). Por otro lado, la senescencia celular, una forma permanente de arresto del ciclo celular, se ha visto que induce la eliminación de células malignas en fibrosis hepática y también en tumores de una manera dependiente de NKG2D (Iannello, Thompson, Ardolino, Lowe, & Raulet, 2013; Krizhanovsky et al., 2008).

No obstante, y a pesar del interés que ha suscitado el estudio de los elementos moleculares que regulan la expresión de los NKG2DLs en células cancerígenas, dichos procesos son aún poco conocidos. Por ejemplo, no se han esclarecido los mecanismos causantes de las diferencias que presentan los patrones de expresión de estas moléculas entre sí. Así, si bien MICA y MICB se expresan de forma prácticamente constitutiva en un gran número de tumores de origen epitelial, estas moléculas apenas son detectadas en la mayoría de las leucemias.

Un estudio realizado en nuestro laboratorio, en el cual se analizaron muestras de biopsias de pacientes de cáncer de colon, así como muestras de mucosa de individuos sanos, revela como MICA se sobre-expresa en tumores epiteliales. Sin embargo, la expresión se va perdiendo con la progresión tumoral (Lopez-Soto, Huergo-Zapico, et al., 2013). En conjunto, estos resultados indican que MICA se expresa en los colonocitos normales, pero su expresión es apical y no es accesible a los linfocitos NKG2D<sup>+</sup> que se encuentran en la lámina propia y en el espacio intraepitelial. Lo mismo ocurre en los cánceres colorrectales más diferenciados, sin embargo, a medida que el tumor progresa, las células cancerígenas pierden su estructura epitelial y adquieren características mesenquimales, lo que se relaciona con una pérdida de la expresión de MICA.

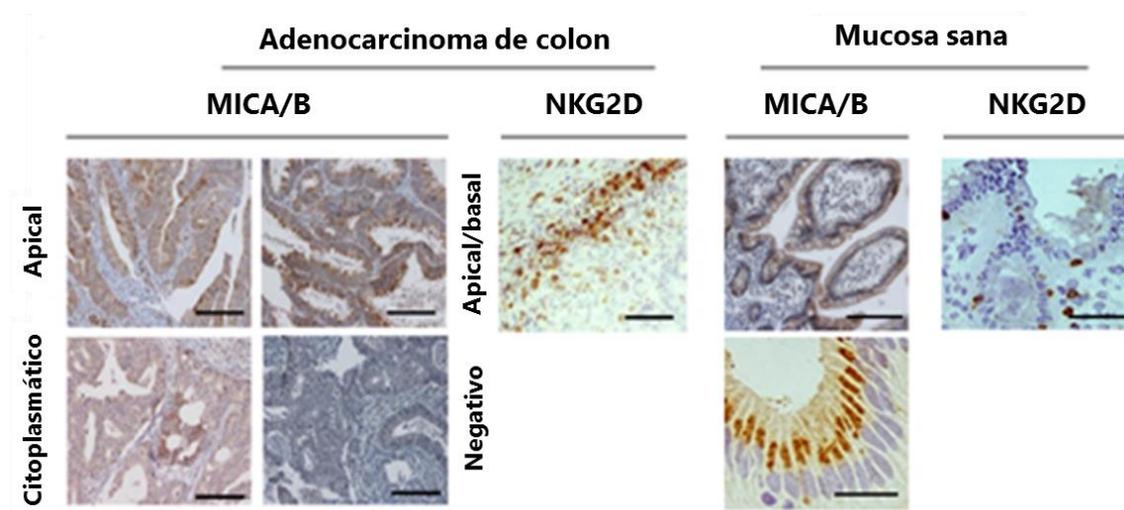
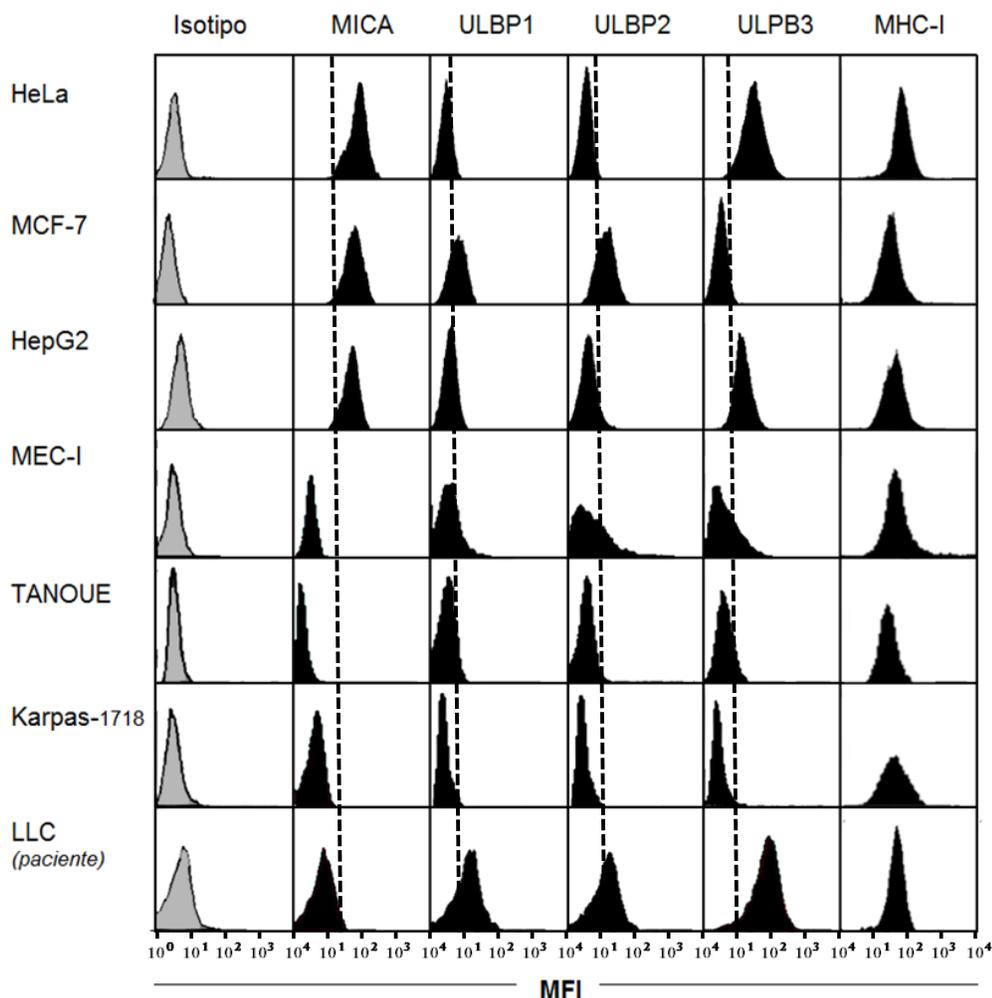


Figura I. 6 Expresión y distribución de MICA/B en muestras histológicas de tumores colorrectales. Imágenes de inmunohistoquímicas de la expresión de MICA/B (marrón) en tumores colorrectales y mucosa sana. En

las imágenes correspondientes a tumores, se muestran las distintas localizaciones subcelulares de MICA/B, mientras que en la mucosa sana se observa una polarización apical de la expresión del ligando. Las imágenes donde se muestra el marcaje de NKG2D (marrón) revelan cómo en la mucosa sana, su localización está limitada por la barrera epitelial, mientras que en tumores la distribución de los linfocitos NKG2D<sup>+</sup> es homogénea. Extraído de *Lopez-Soto et al., 2013*.

Por el contrario, las ULBPs poseen un patrón de expresión prácticamente opuesto, ya que principalmente se expresan en líneas celulares derivadas de leucemias y en un número reducido de tumores epiteliales (Pende et al., 2002).



**Figura I.7** Expresión de NKG2DLs en líneas celulares de diferentes orígenes y células tumorales de LLC. La expresión de MICA, ULBP1-3 y HLA-I fueron estudiadas mediante marcaje con anticuerpos específicos y análisis por citometría de flujo en diversas líneas celulares epiteliales (HeLa, MCF-7, Hep-G2), líneas linfoides B (MEC-I, Tanoue, Karpas-1718) y linfocitos B de 99 pacientes de LLC. En la figura se muestran histogramas representativos de cada línea y de un paciente de LLC. Extraído de la tesis titulada “*Diferencias en la respuesta inmunitaria mediada por NKG2D en cánceres epiteliales y mesenquimales*” de Leticia Huergo Zapico.

Sin embargo, el hecho de que tumores que expresan NKG2DLs puedan desarrollarse igualmente en individuos con un sistema inmunitario activo, sugiere que existen mecanismos tumorales de evasión de la vigilancia inmunológica mediados, al menos en parte, por la inhibición de la actividad del sistema NKG2D/NKG2DLs.

## **Evasión tumoral de la respuesta inmunológica: represión de los NKG2DLs**

Las células tumorales emplean diferentes estrategias para escapar de la señalización mediada por el receptor NKG2D y sus ligandos. Entre ellas, quizás la generación de formas solubles de los ligandos de NKG2D sea el mecanismo inmunosupresor más importante que afecta a este sistema. Así, las células cancerígenas pueden liberar determinados NKG2DL (MICA/B y ULBP2) gracias a la acción de proteasas típicamente relacionadas con el proceso tumoral, como son ADAM10 y ADAM17 (*A Disintegrin And Metalloproteinases10/17*) (Boutet et al., 2009; Waldhauer et al., 2008). La formación de NKG2DLs solubles por parte de las células tumorales presenta varias implicaciones en la señalización mediada por NKG2D: (a) por un lado, como es obvio, reduce la densidad de ligandos activadores de NKG2D en la superficie de dichas células; además, (b) dichas moléculas solubles compiten con los ligandos que se encuentran unidos a la membrana de las células transformadas por la unión con NKG2D y, finalmente, (c) se ha descrito que la asociación de MICA soluble con NKG2D induce la internalización y la degradación lisosomal del receptor en linfocitos T CD8 y en células NK (Groh et al., 2002). Recientemente, se ha demostrado que el procesamiento proteolítico de MICA que ocurre en determinadas células tumorales requiere la actividad de la chaperona ERp5 (*Endoplasmic Reticulum protein 5*), la cual cataliza un cambio conformacional de la estructura de MICA que permitiría el acceso de metaloproteasas que procesan esta proteína (Kaiser et al., 2007). Por otro lado, la generación de formas solubles no parece ser un proceso específico de un tipo de cáncer, ya que se ha descrito la presencia de NKG2DLs solubles en numerosas clases de tumores tanto de origen epitelial como hematopoyético (Groh et al., 2002; Salih, Holdenrieder, & Steinle, 2008; Waldhauer & Steinle, 2006).

Un mecanismo de evasión curioso es el proceso conocido como trogocitosis, que implica la transferencia de fragmentos de membrana plasmática desde la célula tumoral a la célula inmunológica lo cual implica también la adquisición de moléculas como MICA/B, resultando así, en la represión de las funciones dependientes de NKG2D (McCann, Eissmann, Onfelt, Leung, & Davis, 2007). Un estudio reciente sugiere que las células NK que expresan NKG2DLs tras sufrir un proceso de trogocitosis pueden ser lisadas por otras células NK activadas, una forma de reconocimiento *induced-self* conocida como “fratricida” (Nakamura et al., 2013).

Por otro lado, durante el desarrollo de las respuestas anti-tumorales, se liberan diversas citocinas en el microambiente tumoral que, en determinados casos, pueden bloquear la señalización mediada por NKG2D. En este sentido, se ha descrito que el TGF- $\beta$  o el IFN- $\gamma$  (exógeno) reprimen la expresión de MICA/B y ULBP2 y disminuyen los niveles de NKG2D en la superficie de los linfocitos T CD8 y las células NK (Eisele et al., 2006; Friese et al., 2004; Schwinn et al., 2009; C. Zhang et al., 2005). Finalmente, una observación que surgió del análisis de los patrones de expresión de los NKG2DLs en diferentes tejidos sanos o tumorales era que, si bien el transcrito de estas moléculas se expresaba frecuentemente en ambas condiciones, apenas se detectaba la expresión de las proteínas. Dos estudios recientes parecen explicar este hecho, al menos parcialmente, en base a la acción de determinados microRNAs (miRNAs) que regulan la expresión de los NKG2DLs. Los miRNAs son RNAs no codificantes que tienen un papel clave en el control de la expresión de diferentes componentes del sistema inmunológico o de genes supresores de tumores, ya que pueden reprimir la expresión génica mediante el bloqueo de la traducción proteica o a través de la degradación de mRNAs diana (Xiao & Rajewsky, 2009). Asimismo, la inhibición mediante RNAi de la expresión de Dicer, una ribonucleasa de la familia de las RNasa de tipo III clave en la biogénesis de los miRNAs, induce daño genotóxico, lo que, a su vez, incrementa la expresión de MICA y MICB en células tumorales (Tang et al., 2008). En conjunto, la complejidad y la diversidad de los mecanismos supresores que las células tumorales desarrollan para evadir la respuesta inmunológica a través de la modulación de NKG2D y sus ligandos pone de manifiesto la relevancia de las funciones que el sistema NKG2D/NKG2DLs desempeña en la inmunovigilancia del cáncer.

## **IMPLICACIÓN DE LAS CELULAS NK EN LA RESPUESTA INMUNE EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA**

Para la realización de esta tesis doctoral, hemos elegido como modelo de estudio la leucemia linfática crónica (LLC) para llevar a cabo algunos experimentos, ya que es una leucemia muy frecuente y en la que se ha establecido claramente el papel de la respuesta inmune en su patogenia.

La LLC es el síndrome linfoproliferativo crónico más prevalente en los países occidentales (20-40% del total de leucemias) siendo una enfermedad rara en países orientales. Habitualmente, la LLC afecta a personas mayores de 60 años (mediana de edad 70 años; tan solo el 20% son menores de 65 años), teniendo una mayor incidencia en hombres (aproximadamente el doble) que en mujeres. El curso clínico de la enfermedad es muy heterogéneo, algunos pacientes requieren tratamiento tras un largo periodo de tiempo en el que la enfermedad es indolente, mientras que en otras la LLC progresa rápidamente proporcionando, únicamente, unos pocos meses de supervivencia (Hallek, 2013).

### **Características fenotípicas y genéticas de los linfocitos B leucémicos**

Las células leucémicas son linfocitos B que tienen un fenotipo definido por 3 características principales: comparten antígenos B (expresión débil de los antígenos CD19, CD20, CD22 y reactividad habitual con CD23) con fuerte positividad del antígeno T CD5 en ausencia de otros marcadores de linfocitos T; expresan sólo una cadena ligera de las inmunoglobulinas ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y tienen una baja densidad de inmunoglobulinas de superficie. Estos elementos son adecuados para un diagnóstico preciso de la LLC y muy importantes para establecer el diagnóstico diferencial con otros síndromes linfoproliferativos crónicos, aunque el estudio suele completarse mediante el examen de la médula ósea. Para una correcta valoración deben analizarse también sus características citogenéticas y moleculares.

Desde el punto de vista genético, se estudian las mutaciones en los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVH), ya que el estado mutacional de estos genes permite clasificar la LLC en dos subtipos:

- Tipo I pre-germinal; en el que no se ha producido una mutación de los genes de las regiones variables de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas.
- Tipo II post-germinal; se ha producido la mutación de los genes de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas y tiene un mejor pronóstico.

Las células leucémicas presentan anormalidades cromosómicas que afectan a los cromosomas 6, 11, 12, 13, 14 y 17 (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999), las cuales han sido asociadas a una diferente evolución de la enfermedad y tienen valor pronóstico (Chiorazzi, Rai, & Ferrarini, 2005).

En más del 80% de los pacientes, la LLC se diagnostica por una analítica rutinaria o de forma casual, ya que suelen ser totalmente asintomáticos. En el resto de casos, los principales síntomas pueden ser: astenia, adenopatías (aumento de tamaño de los ganglios linfáticos) e infecciones repetidas. No es extraño que haya esplenomegalia (inflamación del bazo) o hepatomegalia (aumento del tamaño del hígado) que pueden producir molestias abdominales.

Casi el 99% de las células leucémicas de LLC se mantienen en fase G0 del ciclo celular, lo que apoya el concepto clásico propuesto por Galton de que la LLC es más una enfermedad linfoacumulativa que linfoproliferativa (Galton, 1966). Se han descrito numerosas mutaciones en los genes que controlan la apoptosis, que hacen que las células de LLC sean muy resistentes a la muerte programada, facilitando su acumulación (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999; Kipps, 1997; Puente et al., 2011). Debido a que los linfocitos B son células presentadoras de antígenos (APC), son capaces de interactuar con otras células inmunológicas de las que reciben señales de supervivencia y proliferación, como se ha descrito en el caso de linfocitos T CD4, que activan señales anti-apoptóticas mediadas por Bcl-2 (Herishanu, Katz, Lipsky, & Wiestner, 2013). También se ha estudiado el papel de la expresión de inmunoglobulinas específicas para auto-antígenos en la superficie de las células leucémicas que transmiten señales anti-apoptóticas en contacto con estos antígenos (Caligaris-Cappio & Hamblin, 1999; Chiorazzi et al., 2005).

## **Pronostico de la enfermedad**

El pronóstico de un paciente con LLC es sumamente variable, lo que hace muy importante la detección de factores pronósticos que puedan predecir su evolución como son: el estadio de la

enfermedad, el tiempo de duplicación linfocitario, la presencia de determinadas alteraciones citogenéticas como la delección (17p), la mutación de *TP53* y el incremento de determinados marcadores séricos, como la expresión de las proteínas ZAP-70 o CD38 en la superficie de las células leucémicas. Recientemente, como resultado de la secuenciación del genoma de la LLC dentro del proyecto co-liderado por los investigadores Carlos López Otín (Universidad de Oviedo) y Elías Campo (Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi y Sunyer -IDIBAPS-), se han identificado diversas mutaciones recurrentes en las células leucémicas, en los genes NOTCH1, exportina 1 (XPO1), MYD88 y KLHL6 (Puente et al., 2011), así como otras alteraciones epigenéticas, disfunciones en el procesamiento del RNA, alteraciones en los telómeros, etc.

Las mutaciones en la región variable de los genes de las inmunoglobulinas identifican dos formas distintas de la enfermedad en cuanto al pronóstico. Los pacientes con mutaciones tienen un mejor pronóstico, ya que tienden a progresar muy lentamente, y no suelen requerir tratamiento, de forma que pueden llegar a ser muy longevos. Por el contrario, los pacientes de LLC que no presentan dichas mutaciones, tienden a progresar más rápidamente, teniendo un peor pronóstico. De esta manera, se establecen dos posibles pronósticos de la enfermedad: (I) estable o favorable, con una esperanza de vida por encima de 10 años, y (II) progresivo o desfavorable, cuya esperanza de vida no llega a superar los 5 años. Para establecer este pronóstico se tienen en cuenta datos clínicos muy variados, siendo de especial interés las clasificaciones establecidas por los Drs. Rai y Binet (Binet et al., 1981; Rai et al., 1975) (Tabla I.1).

En Europa, la LLC se suele caracterizar según la clasificación de Binet, en la cual se distinguen 3 estadios diferenciados que se asocian con el pronóstico de la enfermedad, según el número de grupos de tejido linfático afectados (ganglios linfáticos del cuello, ganglios linfáticos de la ingle, ganglios linfáticos de las axilas, bazo e hígado) y si el paciente tiene o no anemia o plaquetopenia. Sin embargo, en Estados Unidos se acostumbra a establecer esta clasificación mediante el sistema Rai, muy similar al anterior. En las siguientes tablas se describen las características de los distintos estadios de la enfermedad según Rai y Binet.

**Sistema de clasificación de Rai**

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	RIESGO	SUPERVIVENCIA (media en años)
0	Linfocitosis en sangre y medula ósea.	Bajo	>12
I	Linfocitosis y adenopatías	Intermedio	8
II	Linfocitosis y hepatomegalia y/o esplenomegalia. Con o sin adenopatías.	Intermedio	6

<b>III</b>	Linfocitosis y anemia. Con aumento o no del tamaño de ganglios, bazo e hígado.	Alto	<2
<b>IV</b>	Linfocitosis y trombocitopenia. Con aumento o no del tamaño de ganglios bazo e hígado. Con o sin anemia.	Alto	<2

**Sistema de clasificación de Binet**

<b>ESTADIO</b>	<b>CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS</b>		<b>SUPERVIVENCIA (media en años)</b>
<b>A</b>	Ausencia de anemia y ausencia de trombocitopenia.	< 3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño	Equivalente a la población normal de similar sexo y edad.
<b>B</b>		≥ 3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño	7
<b>C</b>	Anemia y/o trombocitopenia	Cualquier número de áreas ganglionares aumentadas de tamaño	2

**Tabla I.1 Clasificación de la LLC propuesta por Rai (Rai et al., 1975) y Binet (Binet et al., 1981).**

## Sistema inmunológico en la LLC

En los últimos años se ha ido estableciendo la importancia del sistema inmunológico en el control y la progresión de la LLC. Un hecho señalado por varios autores es la expansión de subpoblaciones linfocitarias no leucémicas en el momento del diagnóstico. Este aumento, que afecta fundamentalmente a las poblaciones de linfocitos T CD8, CD4 y a las células NK, ha sido descrito también en otras leucemias y linfomas, en los que se ha asociado a un mejor pronóstico (Behl et al., 2006; Cox et al., 2008; De Angulo, Yuen, Palla, Anderson, & Zweidler-McKay, 2008; Ray-Coquard et al., 2009). En el caso concreto de la LLC, un elevado número absoluto de células NK y linfocitos T al diagnóstico se asocia a un mayor tiempo libre de tratamiento de los pacientes (Palmer et al., 2008). Nuestro grupo también describió que los números relativos de linfocitos T CD4 y CD8 al diagnóstico son factores pronóstico independientes, asociados a la supervivencia (Gonzalez-Rodriguez et al., 2010). A pesar del incremento numérico, los linfocitos T de la LLC

muestran una serie de defectos en su función, proliferación y perfiles de secreción de citocinas (Chiorazzi et al., 1979). Los primeros estudios sugieren que en la LLC hay un incremento de linfocitos T productores de IL-4 que son capaces de inducir la expresión del marcador CD30 mediante mecanismos dependientes de IL-4 y OX40L. La interacción de CD30 con CD30L expresado en la superficie de las células leucémicas resulta en un incremento de la producción de TNF- $\alpha$  que favorece la proliferación del clon maligno. Parece ser que la IL-4 es capaz de proteger a las células leucémicas del proceso de apoptosis. Hay evidencias que sugieren que la producción de IL-6 por las células de LLC favorece de alguna manera la secreción de IL-4 por los linfocitos T. Además, los niveles de IL-6 sérica se correlacionan con peores tasas de supervivencia en los pacientes de LLC (Fayad et al., 2001). Por otro lado, hay estudios que describen como los linfocitos T de pacientes con LLC muestran un aumento de producción de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  correlacionado con el estado de la enfermedad (Kiaii et al., 2005). Asimismo, se sabe que IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  protegen a las células leucémicas de la apoptosis e inducen su proliferación *in vitro* (Buschle et al., 1993; Digel et al., 1989).

Además, otras subpoblaciones de linfocitos se encuentran aumentadas en los pacientes de LLC en comparación con individuos sanos: los linfocitos T  $\gamma\delta$ , por ejemplo, muestran números absolutos elevados y exhiben actividad anti-leucémica a través del receptor NKG2D (Poggi et al., 2004). Además, aquellos pacientes en los que su número absoluto es elevado mostraron un avance más lento en el periodo de seguimiento de un año (Poggi et al., 2004). Por otro lado, las células NKT-like (CD3<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, CD16<sup>+</sup>) muestran valores similares a los individuos sanos en los estadios iniciales de la enfermedad, pero en estadios avanzados sus números absolutos se ven significativamente reducidos y su frecuencia se correlaciona inversamente con marcadores de mal pronóstico, como CD38, ZAP-70 o con la frecuencia de linfocitos Treg (Güven et al., 2003; Jadidi-Niaragh et al., 2012). Por último, existen numerosos estudios que describen aumentos en las frecuencias de linfocitos T CD4 reguladores y un papel en el mantenimiento del clon leucémico a través de la inhibición de la apoptosis. Además, sus frecuencias se correlacionan con factores de mal pronóstico y con la progresión de la enfermedad. Recientemente, un estudio ha descrito un aumento significativo de una subpoblación muy poco estudiada de linfocitos T CD8 reguladores en los pacientes de LLC (Jadidi-Niaragh et al., 2013). Estos linfocitos Treg ya han sido descritos en otros tumores sólidos y podrían ser claves en el proceso de evasión inmunológica y la progresión tumoral (Ha, 2009; Halvorsen, Mahmoud, & Bennewith, 2014).

La complejidad de esta enfermedad es aún mayor si tenemos en cuenta que las células leucémicas y el microambiente tumoral se encuentran en continua interacción con las diferentes poblaciones celulares inmunes. Esta constante interacción con el sistema inmunológico del individuo tiene como resultado la aparición de toda una serie de mecanismos de evasión que consiguen controlar el tráfico, la supervivencia y la proliferación de las células efectoras del sistema inmune. Adicionalmente, el sistema inmunitario es capaz de desencadenar respuestas anti-tumorales en algunas LLC. Dichas respuestas afectan a la progresión de la enfermedad y a la supervivencia del individuo. Por todo ello, el conocimiento de la evolución y la función de cada una de estas poblaciones es importante y debe ser tenido en consideración a la hora de diseñar terapias que generen pautas de tratamiento cada vez más individualizadas.

### Células NK y LLC

El continuo contacto del sistema inmunológico con las células leucémicas que a su vez ejerce una gran presión de modelado sobre los clones tumorales da lugar a la generación de mecanismos de evasión inmune que tienen como resultado toda una serie de defectos funcionales en las células NK de los pacientes de LLC (Foa et al., 1984; Jewell, Worman, Giles, Goldstone, & Lydyard, 1992; Katrinakis et al., 1996; Ziegler, Kay, & Zarling, 1981). Se sabe que las células NK de pacientes con LLC muestran niveles reducidos de la expresión del receptor NKG2D en superficie en comparación con donantes sanos (Hilpert et al., 2012; Huergo-Zapico et al., 2014). Además, la expresión de los NKG2DLs en células de leucemia es baja o ausente en la mayoría de los pacientes, lo que les confiere una elevada resistencia a la lisis mediada por células NKG2D<sup>+</sup> (Hilpert et al., 2012; Poggi et al., 2004). Recientemente, la presencia de formas solubles de los NKG2DLs en el suero de los pacientes con LLC, principalmente sMICA, sMICB y sULBP2, ha sido asociada a un peor pronóstico (Nuckel et al., 2010) y a la inhibición de la expresión del receptor NKG2D en las células NK (Hilpert et al., 2012; Huergo-Zapico et al., 2012; Reiners et al., 2013).

El contexto inmunológico en el que se desarrolla la LLC es extremadamente complejo y variable entre pacientes. Muchas de las alteraciones observadas podrían deberse al propio envejecimiento del sistema inmunológico, ya que esta patología afecta principalmente a personas de edad avanzada. Sin embargo, el conocimiento de los eventos moleculares y celulares que subyacen a esta disfunción inmunológica es clave a la hora de diseñar y elegir terapias. En este

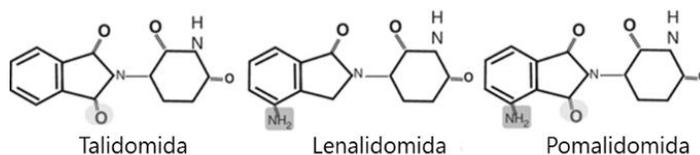
sentido, es crucial tener en cuenta que el uso continuado de medicamentos quimioterápicos puede mermar aún más la funcionalidad del sistema inmunológico de estos pacientes, reduciendo las posibilidades de éxito del tratamiento. Por ello, el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la LLC, centradas en el potenciamiento del sistema inmunitario, son de vital importancia para la supervivencia y la mejora de la calidad de vida de estas personas.

## **Nuevas estrategias de tratamiento en la LLC: Drogas inmunomoduladoras**

La quimioterapia, a pesar de ser efectiva en el tratamiento de muchos tipos de cáncer, es en muchas ocasiones perjudicial para el sistema inmunitario, pudiendo ocasionar una mayor susceptibilidad a las infecciones, segundas neoplasias y otros efectos secundarios a lo largo de la vida del individuo. Muchos de los pacientes de LLC que recaen, frecuentemente desarrollan resistencias a los fármacos, como ocurre con la quimioterapia basada en la fludarabina. En estos casos, las limitadas opciones de tratamiento y la aparición de factores de mal pronóstico en el nuevo clon leucémico (deleción 17p13 y/o mutaciones en p53) conllevan una peor evolución de la enfermedad. Por otro lado, aun cuando la quimioterapia basada en la fludarabina es eficaz, induce una toxicidad altamente notable, no pudiendo ser empleada en personas muy mayores, que, de hecho, son la mayoría de pacientes de LLC. Siguiendo esta línea, la inmunoterapia es una alternativa muy atractiva si tenemos en cuenta la biología de la LLC en la cual el microambiente tumoral juega un papel fundamental en la evolución de la enfermedad. Desde hace unos años, se han empezado a usar en clínica las denominadas drogas inmunomoduladoras (IMiDs), sobre todo en el tratamiento de los canceres hematológicos, aunque en la actualidad también se está investigando su eficacia en tumores sólidos.

Las IMiDs son un grupo de compuestos análogos de la talidomida, un derivado sintético del ácido glutámico que posee propiedades anti-angiogénicas y efectos anti-inflamatorios debido a su acción inhibitoria contra el TNF- $\alpha$ . La talidomida fue tristemente conocida a finales de la década de 1950 y principios de 1960 por sus efectos teratogénicos que afectaron a miles de niños en todo el mundo. A pesar de la retirada del fármaco de la mayoría de los mercados, se descubrió que era eficaz en el tratamiento del eritema nodoso leproso, una inflamación cutánea caracterizada por presentar altos niveles de TNF- $\alpha$  en suero. Además de su actividad anti-inflamatoria, se descubrió que la talidomida tenía propiedades anti-angiogénicas e inmunomoduladoras,

incluyendo la co-estimulación de linfocitos T y la activación de células NK. Todos estos hallazgos hicieron que creciera el interés por la investigación de este compuesto como un posible agente anti-tumoral. Por este motivo, Celgene Corporation comenzó a sintetizar análogos con un mayor potencial terapéutico, pero con menor toxicidad que la talidomida. Los dos primeros análogos en salir al mercado fueron la lenalidomida y la pomalidomida (Figura I.9).



**Figura I.9** Estructura química de la talidomida y sus análogos, lenalidomida (CC-5013) y pomalidomida (CC-4047).

Estos análogos no solo son mucho más potentes en la inhibición de TNF- $\alpha$  (la lenalidomida es 50.000 veces más potente que la talidomida), sino que también son más potentes en la estimulación del sistema inmunitario. En la siguiente tabla se recoge un resumen de los principales mecanismos de acción de las IMiDs conocidos hasta la fecha.

Efecto	Mecanismo	Potencia relativa		
		Talidomida	Lenalidomida	Pomalidomida
<i>Modulación inmune</i>				
CD4 y CD8 Co-estimulación de linfocitos T	La co-estimulación de linfocitos T está asociada a: - Incremento de la fosforilación de CD28 en células T y activación de la vía de señalización PI3-K - Activación de la actividad transcripcional de proteína de activación (AP)-1, clave en la producción de IL-2	+	++++	+++++
Supresión de linfocitos Treg	La pomalidomida y la lenalidomida inhiben la expansión de linfocitos Treg y la expresión de FOXP3, lo que no afecta a su supervivencia y apoptosis. No se vieron efectos sobre la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$ de los linfocitos Treg.	-	+	+
Producción de citocinas Th1	El efecto co-estimulador de las IMiDs sobre las células T y NKT resulta en un aumento de la producción de citocinas Th1, IL-2 e INF- $\gamma$ .	+	++++	+++++
Activación de células NK y NKT	Los IMiDs estimulan la expansión de células NKT mediada por DC y la producción de IFN- $\gamma$ . IMiDs inducen la activación de las células NK a través de la estimulación de la producción de IL-2 procedente de la co-estimulación de linfocitos T.	+	++++	+++++
Citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC)	Mejora la ADCC de células NK en presencia de lenalidomida y pomalidomida a través del incremento de la expresión de FasL y granzima B, pero no de perforina.	-	++++	++++
<i>Interferencia de las interacciones tumor-ambiente</i>				
Anti-angiogénesis	Los IMiDs inhiben la formación de nuevos vasos sanguíneos y la migración endotelial en modelos <i>in vitro</i> . La inhibición de la angiogénesis ocurre a través de la modulación de factores quimiotácticos involucrados en la migración de células endoteliales TNF- $\alpha$ , VEGF y $\beta$ FGF secretados por BMSC y no a través de la inhibición de la proliferación de células endoteliales.	++++	+++	+++
Propiedades anti-inflamatorias	La talidomida, lenalidomida y pomalidomida disminuyen la expresión de TNF- $\alpha$ producido por monocitos activados (estimulados con LPS). Acortan la vida media del mRNA de COX-2, lo cual resulta en una reducción de PGE2. Los mediadores o las vías de señalización involucrada en esto no se conocen aún.	+	++++	+++++
Regulación negativa de moléculas de adhesión	Los IMiDs reducen la expresión de moléculas de adhesión superficiales en células plasmáticas y PBMCs, de forma parcial a través de la inhibición de TNF- $\alpha$			
<i>Efectos anti-tumorales directos</i>				
Actividad anti-proliferativa	Los IMiDs inducen la actividad de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CDK) como p21, p27 y p15, inhibiendo la actividad CDK y causando parada del ciclo celular en fase G0/G1. Los IMiDs disminuyen la actividad de NF- $\kappa$ B lo que conlleva la reducción de proteínas anti-apoptóticas cIAP2 y FLIP. Los IMiDs inhiben las caspasas 3, 8 y 9 de forma variable.	+	+++	+++

Tabla I.1 Resumen de los principales mecanismos de acción de las IMiDs. Extraída y modificada de H.

Quach et al. *Leukemia* 2010.

Los análogos de la talidomida fueron sintetizados inicialmente con la idea de optimizar los efectos anti-TNF- $\alpha$  y las propiedades anti-angiogénicas mientras se reducía la toxicidad, pero debido a su gran potencial para modular las respuestas del sistema inmunitario han sido incorporados a diversos ensayos clínicos principalmente de cánceres hematológicos. Los primeros análogos en entrar en ensayos clínicos fueron la lenalidomida (CC-5013; IMiD3; Revlimid) y la pomalidomida (CC-4047; IMiD1; Acti-mid), ambos en ensayos clínicos de mieloma múltiple (MM). Sin embargo, actualmente son utilizados como tratamiento en otros cánceres hematológicos como la LLC.

### La lenalidomida y la LLC

La lenalidomida es un agente antineoplásico que ejerce su actividad a través de varios mecanismos como la activación del sistema inmunitario, inhibición de la angiogénesis y a través de efectos antitumorales directos. Su mecanismo de acción varía dependiendo de la enfermedad, pero hay evidencias que indican que la lenalidomida no tiene un efecto citotóxico directo sobre las células tumorales de la LLC; sino más bien promoviendo y restaurando la función del sistema inmunitario. Contrariamente a lo que pasa en otros tumores hematológicos como el mieloma múltiple, en la LLC no se han observado cambios en la concentración sérica de VEGF en aquellos pacientes que responden positivamente al tratamiento con lenalidomida (Ferrajoli et al., 2008).

Recuperar la función inmune es esencial para la actividad antitumoral de la lenalidomida en la LLC. La estimulación del sistema inmunitario que ejerce la lenalidomida parece tener efectos muy diversos, afectando a diferentes componentes celulares y a sus funciones. Se ha descrito que la lenalidomida induce la expresión de moléculas co-estimuladoras en las células leucémicas, restaurando así la inmunidad humoral y la producción de inmunoglobulinas (McDaniel, Pinilla-Ibarz, & Epling-Burnette, 2012). Además, la lenalidomida mejora la función de los linfocitos T y la capacidad de establecer sinapsis con las células leucémicas (Ramsay et al., 2008). Se ha observado también que la lenalidomida incrementa el número y la capacidad citotóxica de las células NK y disminuye la actividad supresora de los linfocitos Treg (Davies et al., 2001; Galustian et al., 2009).

Al contrario que los linfocitos B normales, las células leucémicas no son buenas APCs. Esto se debe a que expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD86,

lo que se asocia a una disminución de la capacidad de formar sinapsis inmunológicas correctamente con los linfocitos T. Se ha observado que, tras el tratamiento con lenalidomida, se restaura la expresión las moléculas co-estimuladoras y de marcadores de activación de las células B leucémicas, tales como CD40, CD80, CD86, CD54, CD95 (Fas), DR5 y HLA-DR (Aue et al., 2009; A. A. Chanan-Khan & Cheson, 2008; Chen et al., 2011). Así mismo, se ha observado que la lenalidomida recupera la expresión de CD154 (CD40L) en los linfocitos T, lo que no solo incrementa la sensibilidad de las células leucémicas a entrar en apoptosis, sino que también activa a los linfocitos B normales, favoreciendo la producción de anticuerpos (Lapalombella et al., 2010).

Los ensayos clínicos en pacientes de LLC que reciben lenalidomida como tratamiento de primera opción, revelan cambios en las subpoblaciones linfocitarias a expensas de un detrimento en el número de células leucémicas (CD19<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>) (Chen et al., 2011), observándose un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4, CD8 y células NK, poblaciones que juegan un papel clave en la inmunovigilancia contra el cáncer. No solo se detecta un aumento en el porcentaje de células inmunes, sino que a su vez hay un incremento de IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos T CD8, lo cual sugiere que la citotoxicidad mediada por estas células puede ser parte del mecanismo de acción de la lenalidomida (Lee et al., 2011). De forma similar a lo que ocurre con los linfocitos T CD8, se ha descrito que hay un aumento en los niveles de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  producidos por los linfocitos T CD4 durante los 3 primeros meses de tratamiento y que a partir del décimo cuarto mes retornan a niveles normales (Lee et al., 2011).

La mayoría de los efectos inmunomoduladores de la lenalidomida tienen lugar sobre la vía de secreción de las citocinas. Estudios llevados a cabo por Ferrajoli et al. muestran como, pacientes que responden al tratamiento con lenalidomida exhiben un incremento significativo en los niveles de IL-2R, IL-6 e IL-10, que tienen un efecto directo sobre las células inmunes (Ferrajoli et al., 2008). Así mismo, Davies et al. demostró en experimentos *in vitro* que la lenalidomida es capaz de estimular a las células mononucleares de una manera dependiente de IL-2, siendo capaces de eliminar las células de mieloma. Dicho efecto se inhibía en ausencia de células CD56<sup>+</sup>, indicando que las células NK y NKT son los principales mediadores de esta respuesta (Davies et al., 2001). Por otro lado, se observó un incremento de células CD56<sup>+</sup> en aquellos pacientes que respondían a lenalidomida, sugiriendo que la actividad terapéutica de la lenalidomida podría estar mediada por el aumento en el número y función de las células NK (Davies et al., 2001).

En 2010, Ito et al. identificaron la proteína cereblon (CRBN) como la principal diana del efecto teratogénico de la talidomida en el pez zebra (Ito et al., 2010). Estudios posteriores confirmaron que CRBN era imprescindible en la actividad inmunomoduladora y antitumoral de la lenalidomida y la pomalidomida (Gandhi et al., 2014). La unión de la lenalidomida a CRBN promueve el reclutamiento de los sustratos Ikaros (*IKZF1*) y Aiolos (*IKZF3*), los cuales son represores transcripcionales de la expresión de IL-2, hacia el complejo de ubiquitina ligasa E3 (compuesto por las proteínas CRBN, Rbx1, DDB1 y Cul4) permitiendo la ubiquitinación y degradación de dichos sustratos (Gandhi et al., 2014; Kronke, Hurst, & Ebert, 2014) lo cual, finalmente, se traduce en un aumento de la producción de IL-2, de la activación de linfocitos T y células NK y de la actividad antitumoral de las IMiDs.

Pese a todo ello, la capacidad de la lenalidomida de promover la actividad anti-leucémica de las células NK es limitada debido a que las células leucémicas, a través de mecanismos de evasión inmune, expresan bajos niveles (incluso, a veces, la expresión es nula) de ligandos de los receptores activadores (Huergo-Zapico et al., 2012), siendo extremadamente resistentes a la lisis mediada por células NK. Para incrementar la actividad citotóxica frente a las células leucémicas es necesario favorecer su reconocimiento por parte del sistema inmune. En línea con esta idea, la lenalidomida es un excelente agente para ser combinado con otros fármacos que aumenten la inmunogenicidad del tumor y favorezcan la actividad citotóxica de las células NK. Es el caso del rituximab, un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la molécula CD20 presente en la superficie de linfocitos B maduros. La unión del rituximab a los linfocitos B permite la eliminación de las células leucémicas CD20<sup>+</sup> a través del receptor de IgG denominado CD16 de las células NK (y NKT-like), mediante citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC). Experimentos *in vitro* han señalado que la lenalidomida disminuye la expresión de CD20 en las células leucémicas, bloqueando el efecto del rituximab (Lapalombella et al., 2008). Sin embargo, otros estudios apuntan a que la lenalidomida y el rituximab podrían ejercer un efecto sinérgico sobre la activación de la respuesta inmunitaria contra las células leucémicas en la LLC (L. Wu et al., 2008; L. Zhang et al., 2009).

En resumen, la lenalidomida, ya sea sola o en combinación con otros fármacos o anticuerpos monoclonales como el rituximab, supone una alternativa terapéutica muy efectiva, no solo para pacientes de LLC que han recaído tras el tratamiento con quimioterápicos, sino también como primera línea de tratamiento de esta enfermedad. El potente efecto inmunoestimulador de

la lenalidomida hace que sea un excelente candidato para su uso en numerosas neoplasias, pudiendo ser combinado con otros fármacos que aumenten la inmunogenicidad del tumor, como es el caso de algunas drogas anti-mitóticas que inducen la expresión de los ligandos de los receptores activadores de NK; lo que resulta en una mayor eliminación de las células tumorales por parte del sistema inmunitario del individuo.

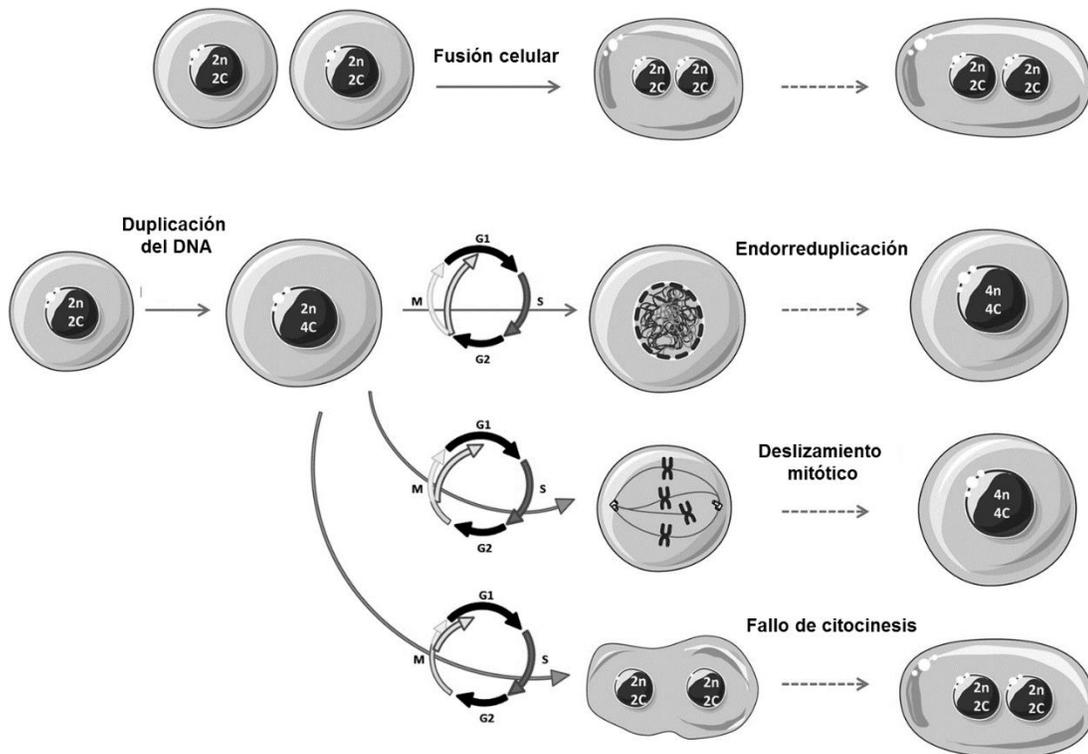
## **INMUNOVIGILANCIA DE LA PLOIDÍA TUMORAL**

Durante estos últimos años, en nuestro laboratorio hemos analizado el papel de diferentes medicamentos quimioterápicos en la regulación de la expresión de los NKG2DLs. En esta Tesis nos hemos centrado en particular en el papel de los fármacos anti-mitóticos, ya que trabajos recientes han mostrado que la hiperploidía en los tumores, además de contribuir a la oncogénesis es capaz de incrementar la inmunogenicidad permitiendo la eliminación de esas variantes tumorales. La inmunovigilancia o mecanismo de eliminación que controla la ploidía es un proceso dependiente de los linfocitos T CD4 y CD8. Estos resultados tan controvertidos, sugieren que la hiperploidía tumoral inducida por carcinógenos o por oncogenes proporciona una herramienta de reconocimiento que es utilizada por el sistema inmune para la eliminación del tumor (Senovilla, Vitale, et al., 2012).

Por norma general, los organismos eucariotas con reproducción sexual son diploides ( $2n$ ), es decir, poseen dos juegos haploides de cromosomas homólogos. La acumulación de más de dos juegos de cromosomas, la poliploidía ( $>2n$ ), es algo bastante común en la naturaleza, especialmente en su forma más simple, la tetraploidía ( $4n$ ). Al contrario de lo que ocurre en plantas o en algunos animales, como los insectos, en los mamíferos no es frecuente el fenómeno de la poliploidización celular. Sin embargo, durante el desarrollo programado de algunos tejidos y órganos sí tienen lugar cambios en la ploidía de las células somáticas. Así, aunque la inmensa mayoría de las células de mamífero son diploides, se pueden encontrar células multinucleadas y células endopoliploides con una frecuencia relativamente alta (0,5-20%), especialmente en tejidos con una alta tasa proliferativa como la placenta. La endopoliploidización, que en ocasiones constituye un mecanismo para aumentar el tamaño celular, ha sido documentada en múltiples tipos celulares, incluyendo megacariocitos y neuronas.

Sin embargo, la poliploidía también tiene sus costes. Existen muchas evidencias que sugieren que las células poliploides son genéticamente inestables y que constituyen un estado transitorio o intermedio en el camino hacia la aneuploidía y, por último, hacia el cáncer, donde estas células poseen una serie de ventajas metabólicas (Merlo, Wang, Pepper, Rabinovitch, & Maley, 2010; Pellman, 2007). Esta hipótesis podría explicar por qué algunos cánceres contienen grandes alteraciones en el número de cromosomas, pero raramente presentan simples ganancias o pérdidas de un cromosoma puntual.

La poliploidización somática suele producirse por (I) fusión celular (*cell-to-cell fusion*), generando células multinucleadas cuyo ciclo celular se encuentra parado en fase G1; (II) endoreduplicación, en la que las células llevan a cabo dos rondas consecutivas de replicación del material genético sin pasar por mitosis; (III) deslizamiento mitótico (*mitotic slippage*), un fenómeno en el que las células no consiguen finalizar la fase de mitosis con éxito debido a que el punto de control del “ensamblaje del huso mitótico” (SAC- *Spindle assembly checkpoint*) del ciclo celular se encuentra continuamente activado, haciendo que estas células entren en un nuevo ciclo replicativo; o (IV) fallo de citocinesis, en el cual la célula no es capaz de dividir el citoplasma dando como resultado una célula binucleada (Ganem, Storchova, & Pellman, 2007; Gordon, Resio, & Pellman, 2012).



**Figura I.3 Principales mecanismos de tetraploidización.** Las células tetraploides pueden ser generadas mediante fusión celular, endorreduplicación, deslizamiento mitótico o fallo de citocinesis. Aunque la fusión celular y el fallo en la citocinesis producen descendencia binuclear, la endorreduplicación y el deslizamiento mitótico resultan en células mononucleares (no se produce cariocinesis). C, número de cromátidas; n, número de cromosomas. Extraído y modificado de *Gentric G et al.*

La idea de que las células tetraploides pueden constituir un estado transitorio intermedio durante la tumorigénesis fue postulada por Theodor Boveri hace más de 100 años (Boveri, 2008). Existen varias evidencias que apoyan esta idea, en primer lugar, en los estadios tempranos del desarrollo tumoral se ha descrito la presencia de células tetraploides (Olaharski et al., 2006). Un estudio revela que las células tetraploides se acumulan en la fase pre-maligna del cáncer de esófago de Barrett, en el cual la aparición de eventos tetraploides se correlaciona con la pérdida de funcionalidad de p53 (Galipeau et al., 1996). Además, algunos tipos de cánceres poseen un cariotipo tetraploide (Rajagopalan & Lengauer, 2004). Por otro lado, p53 y retinoblastoma (Rb), ambas proteínas implicadas en impedir la proliferación de células poliploides, están frecuentemente ausentes o no son funcionales en las células tumorales (Sherr & McCormick, 2002). Por último, la mayoría de los tumores poseen centrosomas supernumerarios, debido a fallos en las divisiones celulares que tuvieron lugar previamente (Nigg, 2002); además, algunas proteínas

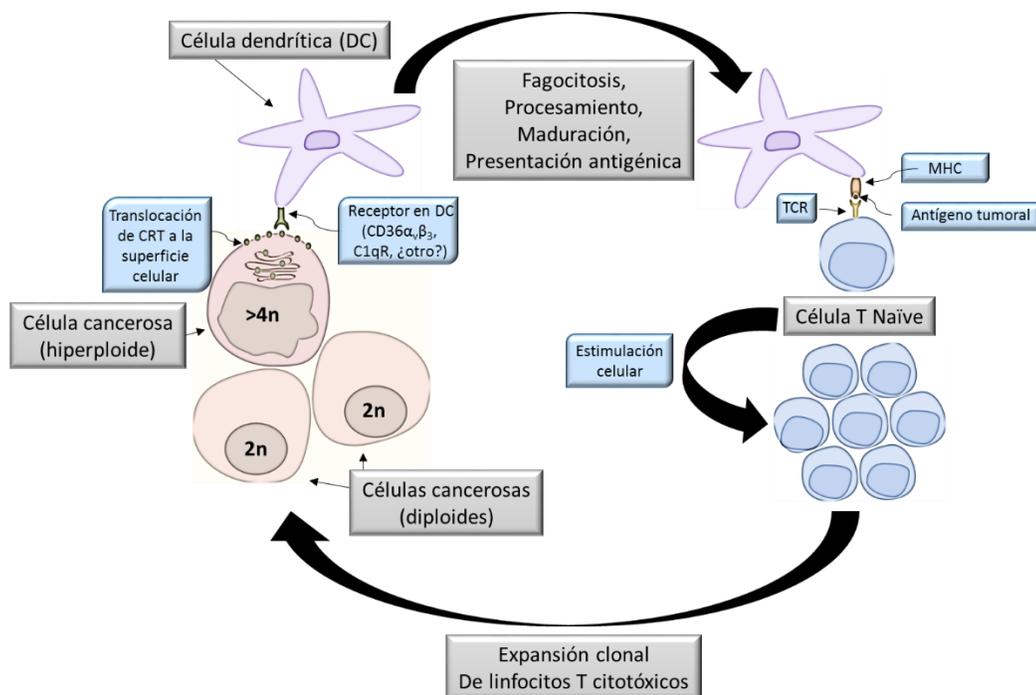
supresoras de tumores (por ej: BRCA2 o LATS1) que se necesitan para completar con éxito la citocinesis aparecen frecuentemente mutadas en cáncer (Daniels, Wang, Lee, & Venkitaraman, 2004; Yang et al., 2004).

Recientemente, un estudio proporciona datos experimentales sobre el potencial tumorigénico de las células tetraploides. Células mamarias tetraploides p53<sup>-/-</sup> murinas, generadas mediante la exposición a un inhibidor de la actina, dihidrocitocalasina B (DCB), producen cáncer si son inoculadas en ratones *nude*. Por el contrario, células diploides aisladas de la misma manera no son capaces de formar tumores en los mismos ratones. Esto se debe a que la tetraploidía aumenta la frecuencia de alteraciones cromosómicas promoviendo el desarrollo del tumor (Fujiwara et al., 2005).

Dado los aparentes daños que se producen durante el proceso de poliploidización, es lógico pensar que las células poseen una serie de mecanismos para prevenir la proliferación y la supervivencia de las estas células. Una de las consecuencias de la poliploidía, al menos en determinadas células, es la acumulación de aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales (Gordon et al., 2012). Estudios recientes han demostrado que, si en células no-transformadas inhibimos la citocinesis celular con un fármaco, como por ejemplo la citocalasina, se bloquea la transición hacia un estado binucleado, a través de mecanismos que implican la activación de genes oncosupresores como p53, CDKN1A (*Cyclin-Dependent Kinase INhibitor 1A*), CDKN2A y Rb. Por el contrario, si lo que exponemos al fármaco son células transformadas con el papovirus SV-40 (que inactiva p53 y Rb), dichas células seguirán conservando su capacidad proliferativa y serán capaces de generar aneuploidias (Hirano & Kurimura, 1974). Estas observaciones han hecho que algunos investigadores se planteen la existencia de un “punto de control de la tetraploidía” dependiente de p53 y Rb que bloquee la proliferación y la re-replicación del DNA en las células tetraploides, parando el ciclo celular en la fase G1. La proteína p53 tiene un papel fundamental en el control de la ploidía, ya que su ausencia facilita la generación/supervivencia de células tumorales poliploides (Sherr & McCormick, 2002). En muchos casos, las células tetraploides, que son generadas como consecuencia de la inhibición de la citocinesis o la cariocinesis, sucumben rápidamente a la apoptosis; esto sugiere que el “punto de control de la tetraploidía” puede consistir en la eliminación selectiva de células tetraploides apoptóticas (Castedo et al., 2006). De acuerdo con esta hipótesis, la depleción del factor pro-apoptótico Bax mediante el uso de un RNAi imita el efecto permisivo que causa la deficiencia de

p53 durante la tetraploidización (*in vitro*). De forma similar, la sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica BCL-2 facilita la poliploidización en ausencia de p53. Los genes de ambos, *P53* y *RB*, están frecuentemente mutados o ausentes en cáncer, una situación que, sin duda, contribuye a la aparición de variantes tumorales poliploides y, finalmente, aneuploides (Sherr & McCormick, 2002). La célula posee una serie de mecanismos intrínsecos para impedir la supervivencia, proliferación o replicación de células poliploides, pero cuando estos mecanismos de control fallan, las células son capaces de sobrevivir y proliferar. Sin embargo, no está todo perdido, ya que hay una serie de mecanismos de control, esta vez extrínsecos, en los que el sistema inmunológico es el principal mediador.

Durante décadas, se consideró que los tumores eran entidades inmunogénicamente silenciosas. Esta visión simplista fue desechada definitivamente gracias a la “teoría del peligro” (*Danger Theory*) publicada por Polly Matzinger en 1994 (Matzinger, 1994) y que logró un cierto consenso de la comunidad científica acerca de este tema. De acuerdo con esta teoría, el sistema inmunitario no solo discrimina entre lo “propio” y lo “extraño”, sino que es capaz de reaccionar ante situaciones de peligro, independientemente de su origen. En este contexto, varios mecanismos podrían explicar por qué los tumores en desarrollo son capaces de romper la tolerancia inmunológica. Como hemos mencionado anteriormente, las células tumorales expresan TAAs que, al menos en ciertas circunstancias, son capaces de desencadenar una respuesta inmune específica contra el tumor. Así mismo, las células malignas, frecuentemente, sobre-expresan moléculas en su superficie celular (por ejemplo NKG2DLs) que activan los componentes de la inmunidad innata, como las células NK. Por último, el tratamiento con determinados agentes quimioterápicos desencadena un tipo peculiar de apoptosis que *de facto* es inmunogénica, activando una respuesta inmune tumoral liderada por linfocitos T citotóxicos. Entre otros procesos, la muerte celular inmunogénica (ICD) se caracteriza por la exposición en la superficie celular de calreticulina (CRT), una proteína residente en el retículo endoplásmico (ER), donde es reconocida por macrófagos o DCs como una señal “*eat me*” (cómeme), iniciando así una respuesta inmunológica. En comparación con sus homologas diploides, las células hiperploides exhiben un elevado grado de estrés del ER, que se manifiesta con la fosforilación del *eukaryotic Initiation Factor 2a* (eIF2 $\alpha$ ) y que tiene como consecuencia la exportación de la CRT a la superficie celular (ecto-CRT) desencadenando una respuesta inmune similar a la que se produce durante la ICD (Zanetti & Mahadevan, 2012).



**Figura I. 8. Inmunovigilancia de la ploidía tumoral.** La hiperploidía en las células cancerosas activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) en el retículo endoplásmico (ER), la cual promueve la exportación de la proteína ER-residente calreticulina a la superficie celular, donde es reconocida por macrófagos y DCs como una señal de fagocitosis. Los TAA serán presentados a los linfocitos T específicos, favoreciendo su expansión clonal. Las células T citotóxicas resultantes atacarán preferentemente a las células hiperploides, permitiendo la atenuación del crecimiento tumoral. Modificado de *Zanetti, M et al. 2012*

Experimentos recientes muestran cómo en respuesta a la presencia de ecto-CRT, las células hiperploides inoculadas en hospedadores inmunocompetentes forman tumores con una menor incidencia que sus precursoras tumorales diploides. Por contra, células tumorales diploides e hiperploides generan tumores con la misma incidencia cuando son inoculadas en ratones inmunocomprometidos (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Cabe destacar que los tumores derivados de células hiperploides que son recuperados de ratones inmunocompetentes muestran un menor grado de ploidía, un nivel de estrés del ER más bajo, y presentan menos CRT que los ratones xenoinjertados generados con las mismas células en animales inmunodeficientes. Además, los tumores inducidos por carcinógenos desarrollados en ratones inmunocompetentes exhiben un menor grado de ploidía y un nivel de estrés del ER más bajo que las mismas lesiones desarrolladas en ratones inmunocomprometidos (*Rag2<sup>-/-</sup>*, *γc<sup>-/-</sup>*, *Stat1<sup>-/-</sup>* o *Dnam1<sup>-/-</sup>*) (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Igualmente, en cáncer de mama se observó que aquellos pacientes que habían respondido positivamente a la quimioterapia con fármacos antimetabólicos mostraban una mayor cantidad de

linfocitos T CD8 infiltrantes y menos linfocitos inmunosupresores FOXP3<sup>+</sup> que aquellos pacientes que no habían respondido a la terapia (Senovilla, Vacchelli, et al., 2012). Adicionalmente, las pocas células tumorales que se podían detectar en los pacientes que sí habían respondido al tratamiento mostraban un diámetro nuclear menor y una disminución en los niveles de fosforilación de eIF2 $\alpha$ ; en comparación con las células neoplásicas de los pacientes en los que la terapia no había sido efectiva (Senovilla, Vitale, et al., 2012).

Estos hallazgos ponen de manifiesto la existencia de un mecanismo de inmunovigilancia tumoral no descrito hasta la fecha, donde las células transformadas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmunitario a través, al menos en parte, del reconocimiento de CRT en su superficie.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

El objetivo principal de esta tesis es dilucidar nuevos mecanismos de activación de las células NK que puedan contribuir a la eliminación de las células tumorales. Nuestra hipótesis es que, para activar a las células NK es necesario incrementar su proliferación, actividad citotóxica y su capacidad de producción de citocinas. Recientemente, se ha descrito que los IMiDs tienen la habilidad de mejorar la funcionalidad de diversos componentes del sistema inmune, entre ellos las células NK, aunque su mecanismo de acción no está completamente dilucidado aún. En esta tesis pretendemos explorar la capacidad de la lenalidomida de activar la respuesta inmune antitumoral mediada por las células NK en la LLC, ya que es un fármaco de uso clínico en esta enfermedad. Sin embargo, como hemos descrito previamente en la LLC, y como ocurre en muchos otros tumores, las células cancerígenas son muy poco inmunogénicas, y las células NK, incluso aunque estén altamente activadas, tienen enormes dificultades para reconocerlas. Por ello, en la segunda parte de este estudio, hipotetizamos que para aumentar la actividad antitumoral de las células NK es necesario, en paralelo, aumentar la inmunogenicidad del tumor y si, con ello, la combinación de ambos mecanismos tiene un efecto sinérgico. Para ello, pretendemos estudiar si diversos fármacos quimioterápicos son capaces de activar la expresión de los ligandos activadores de las células NK y de esta manera pueden promover el reconocimiento y eliminación de las células tumorales.

Los objetivos concretos de esta tesis son:

1. Desarrollo de estrategias que permitan incrementar la actividad antitumoral de las células NK.
2. Inducción de la inmunogenicidad del tumor que favorezca el reconocimiento de las células tumorales por las células NK.



# **CAPÍTULO II**

## *MATERIAL Y MÉTODOS*

## PACIENTES DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA Y DONANTES

En este estudio fueron analizados un total de 17 pacientes que cumplieron los criterios de diagnóstico establecidos por la OMS: un número mayor de  $5 \times 10^9/l$  linfocitos en sangre periférica con morfología y fenotipo característicos de LLC durante al menos tres meses.

Las muestras de sangre de pacientes con LLC fueron facilitadas por la Dra. Ana González Rodríguez y el Dr. Ángel Payer del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Oviedo, donde se realizó el diagnóstico de las mismas. Todos los pacientes dieron su consentimiento informado mediante la firma del documento generado al efecto y aprobado por el Comité Ético del HUCA.

Las muestras de sangre donantes sanos usadas como control en los experimentos se obtuvieron del Centro Comunitario de Sangre y Tejidos del Principado de Asturias.

## MATERIALES

### Líneas celulares

En el desarrollo de esta tesis se han utilizado las líneas celulares recogidas en la siguiente tabla:

<i>Nombre</i>	<i>Tipo celular / origen</i>	<i>Procedencia</i>
<b><i>NKL</i></b>	Leucemia linfagénica de células granulares o leucemia de células Natural killer	Donadas por el Dr. Eduardo Martínez Naves (Universidad Complutense de Madrid)
<b><i>K-562</i></b>	Leucemia mieloide crónica	American Type Culture
<b><i>HCT-116</i></b>	Carcinoma colorrectal	Collection (ATCC, Manassas,
<b><i>Hep-G2</i></b>	Hepatocarcinoma	VA)

Tabla II.1 Líneas celulares empleadas en la presente tesis.

En la siguiente tabla se detallan las características genéticas de las líneas celulares empleadas en el capítulo IV.

<i>Línea celular</i>	<i>Enfermedad</i>	<i>Cariotipo</i>	<i>p53 status</i>
<b><i>K-562</i></b>	Leucemia mieloide crónica	Triploide (N=67)	<b>Mutado</b>
<b><i>HCT-116</i></b>	Carcinoma colorectal	Cercano diploide (N=45)	<b>Silvestre</b>
<b><i>Hep-G2</i></b>	Carcinoma hepático	Normalmente = 55 (rango = 50 to 60)	<b>Silvestre</b>

**Tabla II.2 Principales características de las líneas celulares empleadas.**

Las líneas celulares HCT-116 y Hep-G2 fueron cultivadas en medio DMEM (Cultek S.L.U), mientras que las líneas celulares NKL y K-562 fueron cultivadas en medio RPMI (Lonza). En todos los casos, los medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (FBS - Sigma) descomplementado (30 minutos a 55°C), L-glutamina 2 mM (Invitrogen), piruvato sódico 1 mM (Invitrogen) y antibiótico (mezcla de penicilina y estreptomina –Invitrogen), denominándose en este caso como medio de cultivo “completo”. En los experimentos relativos al estudio de la lenalidomida, el suero utilizado para suplementar el medio de cultivo RPMI, fue suero AB<sup>+</sup> humano. Para el cultivo de la línea celular NKL se añadieron 50 U/ml de IL-2 (Peprotech). En todos los casos las condiciones de incubación fueron 37°C, 95% de humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Células mononucleares de sangre periférica**

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron obtenidas a partir de *Buffy coats* de sangre procedente de donantes sanos o de muestras de sangre de pacientes con LLC mediante centrifugación sobre gradiente de Ficoll (Sigma) a 2200 r.p.m. durante 30 minutos a temperatura ambiente. En determinados experimentos trabajamos únicamente con linfocitos de sangre periférica (PBLs) por lo que los monocitos fueron eliminados por adhesión en placa durante 1 h.

## **Otros materiales**

Otros materiales utilizados fueron: forbol 12-miristato 14-acetato (PMA), monensina, ionomicina, 7-aminoactinomicina-D (7-AAD), ciclosporina (CsA), citocalasina D, nocodazol, docetaxel, GSK2606414, salubrinal, LY294002, Hoechst 33342, IL-2, IL-15 e IL-21 (Peptotec), lenalidomida (Celgene Corporation), rituximab (donado por el HUCA).

Otros reactivos de uso habitual en el laboratorio, así como material fungible, fueron adquiridos en diversas casas comerciales como Sigma, Invitrogen, Cultek, etc.,...

## TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### Transformación de *Escherichia coli* con plásmidos y purificación de DNA plasmídico

Para la obtención de DNA plasmídico (vectores utilizados en las transfecciones de células tumorales), se utilizaron bacterias *Escherichia coli* XL1-Blue competentes obtenidas por el método del cloruro de rubidio (Hanahan, 1983) y almacenadas hasta su uso a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La transformación de la bacteria se realizó por *shock* térmico como se detalla a continuación: Se mezclaron 200  $\mu\text{l}$  de bacterias competentes con 0,5 ng de plásmido y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos. A continuación, se les dio un choque térmico a  $42^{\circ}\text{C}$  durante 45 segundos para favorecer la entrada del plásmido en la célula e inmediatamente después, se metieron en hielo durante 2 minutos más. Finalmente, se añadió 1 ml de medio LB (Sigma), libre de antibiótico de selección, y se mantuvieron en un incubador de bacterias con agitador durante 1h a  $37^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo, 100  $\mu\text{l}$  del pre-inoculo se sembraron en placas de medio sólido LB (medio LB con 20 g/l de agar; Sigma) con 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina (antibiótico de selección) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante al menos 12 horas.

Para la purificación de DNA plasmídico, se seleccionó una colonia bacteriana que fue sembrada en 1,5 ml de medio LB líquido con 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ampicilina y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación durante 12 horas (hasta alcanzar la fase logarítmica del crecimiento). La extracción del DNA plasmídico se realizó siguiendo el protocolo del kit comercial *High pure Plasmid isolation kit* (Roche). La pureza y concentración del plásmido fueron analizadas en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

### Transfección transitoria de un shRNA de ATM

Todas las transfecciones se llevaron a cabo utilizando lipofectamina LTX (Life Technologies). Células de las líneas tumorales K-562 y HCT-116 se sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos ( $5 \times 10^4$  células/pocillo) 24 horas antes de realizar la transfección. Transcurrido este tiempo, se incubaron 300 ng del *shRNA* específico de ATM (pSuper.ATMi - Addgene) o del plásmido vacío pSuper.basic (Addgene) en 50  $\mu\text{l}$  de medio DMEM o RPMI (según corresponda) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Por otro lado, se incubaron 0,75  $\mu\text{l}$  de lipofectamina

LTX en 50 µl de medio de cultivo durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se mezclaron el plásmido y la lipofectamina (a partes iguales) durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de micelas. Por último, los 100 µl de mezcla (+ 400 µl adicionales de medio de cultivo) se añadieron a las células, previamente lavadas con PBS para eliminar los restos de antibiótico. Trascorrida la noche, se les eliminó el plásmido y se añadió medio de cultivo nuevo. Tras 48 horas de incubación, se procedió a tratar las células con citocalasina D, donde permanecieron en presencia del fármaco otras 48 horas más. Finalmente, se analizó la presencia de MICA en la membrana plasmática de dichas células mediante citometría de flujo.

### **PCR cuantitativa**

El nivel de expresión de ATM se determinó en las distintas líneas celulares mediante PCR cuantitativa. Para ello, lo primero que se hizo fue purificar el RNA total de los cultivos celulares con el kit comercial *High Pure RNA Isolation* (Roche). El RNA obtenido en cada muestra fue analizado para determinar su pureza y concentración en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Se utilizó 1 µg de RNA para la síntesis de cDNA mediante retrotranscripción del RNA acoplada a la PCR (RT-PCR) siguiendo las instrucciones del kit *High Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems). El cDNA obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo la amplificación génica por PCR. En el caso de las PCRs semi-cuantitativas se utilizaron 10 µmoles de dNTPs, 150 pmoles de cada oligonucleótido y 2,5 unidades de Taq DNA polimerasa (Bioline), así como MgCl<sub>2</sub> y el tampón correspondiente de dicha enzima. Las reacciones de amplificación se efectuaron en un termociclador convencional Surecycler 8800 (Agilent technologies).

Para la PCR cuantitativa, el cDNA fue diluido 5 veces en dH<sub>2</sub>O y se usaron 4 µl como molde en reacciones de PCR en las que se añadió el reactivo *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), en un volumen final de 20 µl. En este caso, las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador ABI7300 (Applied Biosystems), usando para ello los programas de amplificación aconsejados por el fabricante. Como medida para evitar las posibles diferencias debidas a la cantidad de mRNA de partida, los niveles de expresión del gen de interés fueron normalizados con respecto a la expresión del gen endógeno *GADPH*, determinado en las mismas muestras. Los resultados obtenidos fueron analizados de acuerdo con la fórmula  $2^{-\Delta(\Delta C_t)}$ ,

siguiendo el método descrito previamente (Livak & Schmittgen, 2001). En la siguiente tabla se recogen las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los genes:

<i>Gen</i>	<i>Primer directo</i>	<i>Primer indirecto</i>
<i>ATM</i>	5'-TGGCTACAGATTGCAACCCAA-3'	5'-TGGTGTACGTTCCCATGTC-3'
<i>GAPDH</i>	5'-CGGAGTCAACGGATTTGGTC-3'	5'AATCATATTGGAACATGTAAACCATGTAGT-3'

**Tabla II.3 Oligonucleótidos usados en la amplificación específica de cada gen.**

## Western blot

El análisis se llevó a cabo con extractos de proteína total de las líneas celulares K-562 y HCT-116. Para la obtención de dichos extractos, las células se lisaron en un tampón que contenía Tris 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, SDS 0,1%, Triton X-100 1%, EDTA 1 mM, NaF 10 mM, ditiotreitól 1 mM, *cocktail* inhibidor de proteasas (Roche) y *cocktail* inhibidor de fosfatasas (PhosSTOP, Roche). Las proteínas solubles fueron separadas mediante centrifugación a 15.000 x g durante 5 minutos a 4°C. La concentración proteica se determinó mediante el ensayo del BCA (*bicinchoninic acid*) de Pierce. Para preparar las muestras se re-suspendieron 15 µg de proteína de cada extracto en un volumen final de 20 µl de tampón de disociación (SDS 2%, glicerol 9%, 2-mercaptoetanol 0,6%, Tris 60 mM a pH 6,8). A continuación se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en geles de poliacrilamida al 10% para separar las proteínas mediante electroforesis. Seguidamente el gel se incubó en tampón de transferencia (CAPS 10 mM, NaOH 4 mM, metanol 20%). La transferencia a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno – Millipore) se realizó en el mismo tampón de transferencia durante 90 minutos a 50 V en un soporte Miniprotean II (Bio-Rad). Una vez transferidas las proteínas a la membrana, se tiñeron con Ponceau para verificar que se habían cargado cantidades similares de proteína total en todas las calles. Las membranas de PVDF se bloquearon con leche en polvo desnatada al 3% disuelta en tampón TBST (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween-20 0,05%) durante 1 hora, tras lo cual la membrana se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario diluido en leche al 3% en TBST. La membrana se lavó durante 45 minutos con TBST y, por último se incubó 1 hora con el anticuerpo secundario 1:10.000 conjugado con HRP (*horseradish peroxidase* – Jackson Immunoresearch Laboratories) en

leche al 1,5% en TBST. Tras lavar de nuevo con TBST, se llevó a cabo la detección de los complejos antígeno-anticuerpo mediante generación de quimioluminiscencia con un sustrato comercial de HRP (Immobilon-Millipore).

***Anticuerpos primarios***

<b><i>Molécula</i></b>	<b>Origen</b>	<b>Clon</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>
<i>eIF2<math>\alpha</math></i>	Conejo IgG	Poly6067	Biolegend	1:500
<i>eIF2<math>\alpha</math> fosforilado Ser51</i>	Conejo	D9G8	Cell Signaling	1:1000
<i><math>\alpha</math>-actina</i>	ratón mAb	AC-74	Sigma	1:5000

**Tabla II.4** Anticuerpos primarios utilizados en los ensayos de Western-blot.

## TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

### Purificación de células B leucémicas

En determinados experimentos, las células B leucémicas de pacientes con LLC fueron aisladas, usando el kit comercial *Human B Cell Enrichment Kit without CD43<sup>+</sup> Depletion* (EasySep), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células B leucémicas se utilizaron posteriormente en experimentos funcionales, previa comprobación de la pureza (90~95%) en el citómetro de flujo.

### Purificación de células NK

A partir de PBMCs de donantes sanos, obtenidos por centrifugación en gradiente de densidad como se ha descrito previamente, se purificaron las células NK policlonales mediante el kit comercial *NK Cell Enrichment Cocktail-RosetteSep* (StemCell Technologies Inc.). Para los ensayos de citotoxicidad con células NK policlonales, se cultivaron las células purificadas en presencia de 50 U/ml de IL-2 (Peprotech) durante al menos 24 h.

En el caso de ensayos de co-cultivo, las células NK fueron mantenidas en presencia de IL-2 (100 ng/ml) durante 5 días antes de ser enfrentadas a las células tumorales.

### Citometría de flujo

#### – Inmunofenotipaje de células leucémicas

Las muestras de pacientes con LLC fueron diagnosticadas en el Servicio de Hematología del HUCA siguiendo la rutina clínica definida. En la tabla se recogen los anticuerpos utilizados:

<i>Molécula</i>	<i>Origen</i>	<i>Clon</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Dilución</i>
<i>CD3</i>	Ratón mAb	SK7	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD3</i>	ratón mAb	33-2A4	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD4<sup>+</sup></i>	ratón mAb	SK4	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD5</i>	ratón mAb	L17F12	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD8<sup>+</sup></i>	ratón mAb	SK1	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD8<sup>+</sup></i>	ratón mAb	SK1	PE	BD Bioscience	Recomendada

<i>CD10</i>	ratón mAb	HI10a	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD10</i>	ratón mAb	HI10a	APC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD11c</i>	ratón mAb	s-HCL-3	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD19</i>	ratón mAb	SJ25C1	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD19</i>	ratón mAb	SJ25C1	PerCP	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD20</i>	ratón mAb	S-HCL-1	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD20</i>	ratón mAb	L27	PerCP	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD20</i>	ratón mAb	L27	APC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD23</i>	ratón mAb	EBVCS-5	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD25</i>	ratón mAb	2A3	APC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD38</i>	ratón mAb	HB-7	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD38</i>	ratón mAb	SK7	PerCP	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD4<sup>+</sup>5</i>	ratón mAb	2D1	PerCP	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD4<sup>+</sup>5</i>	ratón mAb	SK3	APC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD56</i>	ratón mAb	MY31	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD79</i>	ratón mAb	SN8	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>CD103</i>	ratón mAb	B-ly7	FITC	IQP	Recomendada
<i>FMC7</i>	ratón mAb	FMC7	FITC	BD Bioscience	Recomendada
<i>IgA</i>	ratón mAb	N/F	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>IgG</i>	ratón mAb	G20-193	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>IgM</i>	ratón mAb	N/F	PE	BD Bioscience	Recomendada
<i>Zap70</i>	ratón mAb	pY292	PE	BD Bioscience	Recomendada

**Tabla II.5** Anticuerpos utilizados para el inmunodiagnóstico de la LLC en el Servicio de Hematología del HUCA. mAb=Anticuerpo monoclonal.

### — Citometría de células inmunológicas

Los PBMCs de pacientes y donantes sanos purificados como se describió previamente, fueron incubados en 100 µl de PBS con un 1% de seroalbúmina bovina (BSA) a 4°C en presencia de anticuerpos específicos para las siguientes moléculas: CD3, CD4, CD8, CD56, CD19, NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44, NKp46 y CD69 (Tabla II.5). Tras 15 minutos de incubación, las células fueron lavadas mediante centrifugación en PBS (1500 rpm, 5 minutos). Tras el lavado, las células marcadas fueron analizadas en un citómetro BD FACS Canto™ II (Becton Dickinson).

Para la cuantificación de citocinas intracelulares, las células fueron incubadas en medio de cultivo RPMI complementado con brefeldina A (GolgiPlug; BD Biosciences), PMA 50 ng/ml

(Sigma) e ionomicina 1 µg/ml (Sigma) durante 5 horas. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente marcadas con anticuerpos específicos contra CD3, CD4, CD8 y CD56 con el objetivo de poder diferenciar las poblaciones celulares. A continuación las células fueron fijadas y permeabilizadas con una solución comercial (Cytofix/Cytoperm™ solution; BD Biosciences) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, las células fueron marcadas con anticuerpos específicos para IL-2 e IFN-γ durante 30 minutos a 4°C y su expresión fue analizada mediante citometría de flujo.

<i>Molécula</i>	<i>Origen</i>	<i>Clon</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Dilución</i>
<i>CD3</i>	Ratón mAb	33-2A3	FITC	Immunostep S.L	Recomendada
<i>CD3</i>	Ratón mAb	OKT3	PECy7	Biolegend	Recomendada
<i>CD4</i>	Ratón mAb	HP2/6	PerCP	Immunostep S.L	Recomendada
<i>CD56</i>	Ratón mAb	B-A19	APC	Immunostep S.L	Recomendada
<i>CD8</i>	Ratón mAb	143-44	Pacific Blue	Immunostep S.L	Recomendada
<i>CD19</i>	Ratón mAb	A3-B1	APC	Immunostep S.L	Recomendada
<i>NKG2D</i>	Ratón mAb	BAT-221	PE	Miltenyi	Recomendada
<i>DNAM-1</i>	Ratón mAb	11A8	PE	Biolegend	Recomendada
<i>NKp30</i>	Ratón mAb	P30-15	APC	Biolegend	Recomendada
<i>NKp44</i>	Ratón mAb	P44-8	APC	Biolegend	Recomendada
<i>NKp46</i>	Ratón mAb	E92	Pacific Blue	Biolegend	Recomendada
<i>CD69</i>	Ratón mAb	FN50	Pacific Blue	Biolegend	Recomendada
<i>IL-2</i>	Ratón mAb	JES6-5H4	PE	Biolegend	Recomendada
<i>IFN-γ</i>	Ratón mAb	XMG1.2	PE	Biolegend	Recomendada

**Tabla II.6** Anticuerpos utilizados en el fenotipado de las diversas subpoblaciones inmunes. mAb=Anticuerpo monoclonal.

#### → Citometría de las líneas celulares tumorales

Las líneas celulares adherentes (HCT-116 y Hep-G2) se separaron de las placas de cultivo usando una solución de tripsina/EDTA (Invitrogen). La acción de la tripsina se detuvo con la adición de suero fetal bovino (FBS) al 10% en PBS. Tras un centrifugado para eliminar el sobrenadante (1500 r.p.m., 5 minutos), las células se resuspendieron en 100 µl de PBS para proceder a los marcajes. En el caso de la línea celular no adherente K-562, las células se recuperaron de la superficie de cultivo mediante pipeteo y posterior lavado con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo.

Las células fueron marcadas con los anticuerpos primarios específicos de las moléculas MICA, ULBP1-3, PVR, nectina-2, B7-H6, calreticulina y HLA-I (tabla II.7) durante 1 h a 4°C (condiciones estándar para los anticuerpos primarios utilizados en esta tesis). Tras esta incubación, las células fueron lavadas en PBS por centrifugación y se procedió al marcaje con el anticuerpo secundario correspondiente según el origen del anticuerpo primario (tabla II.7). Debido a la presencia de fluorocromos, esta incubación se realizó en ausencia de luz. Para células marcadas con el anticuerpo primario anti-Calreticulina, el anticuerpo secundario usado fue un policlonal de cabra anti-IgG de conejo conjugado con FITC (AbD Serotec). Mientras que para las células marcadas con los anticuerpos primarios anti-MICA, anti-ULBP1, anti-ULBP2, anti-ULBP3, anti-PVR, anti-Nectina-2, anti-B7-H6 y anti-HLA-I, el anticuerpo secundario usado fue un policlonal de cabra anti IgG murino conjugado con ficoeritrina (AbD Serotec). Tras lavar, las células marcadas se analizaron por citometría de flujo utilizando un citómetro BD FACSCanto™ II (Becton Dickinson).

<b>Molécula</b>	<b>Origen</b>	<b>Clon</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>
<i>Calreticulina</i>	conejo mAb		SantaCruz	1:50
<i>MICA</i>	ratón mAb	159233	R&D Systems	1:1000
<i>ULBP1</i>	ratón mAb	AUMO2	BamOmaB	1:200
<i>ULBP2</i>	ratón mAb	BUMO1	BamOmaB	1:200
<i>ULBP3</i>	ratón mAb	166510	R&D Systems	1:200
<i>PVR (CD155)</i>	ratón mAb	SKIL4	Biolegend	1:5000
<i>Nectina-2 (CD112)</i>	ratón mAb	TX31	Biolegend	1:5000
<i>B7-H6</i>	ratón mAb	855001	R&D Systems	1:200
<i>HLA-I</i>	ratón mAb	W6/32	Universidad Complutense de Madrid	1:2000
<b>Secundarios</b>				
<i>IgG de ratón-PE</i>	cabra		AbD Serotec	1:1000
<i>IgG de conejo-FITC</i>	cabra		AbD Serotec	1:1000

**Tabla II.7** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en citometría de líneas celulares para la determinación de los ligandos de NKG2D, DNAM-1 y NKp30, así como calreticulina y HLA-I. mAb=Anticuerpo monoclonal.

## **Ensayos de proliferación**

En todos los casos, PBMCs, células NK o linfocitos B fueron teñidos con CFSE 1  $\mu$ M durante 10 minutos a 37°C y en absoluta oscuridad. La tinción se detuvo añadiendo 5 volúmenes de medio de cultivo completo a 4°C e incubando 5 minutos en hielo. Una vez transcurrido dicho tiempo, las células se centrifugaron para eliminar los restos de CFSE y a continuación se lavaron dos veces más con la misma solución fría. Tras los lavados, las células se resuspendieron en medio RPMI completo y fueron marcadas con diferentes anticuerpos fenotípicos característicos de las diferentes poblaciones linfocitarias. La proliferación celular fue determinada en base a la dilución del colorante CFSE resultante de cada división celular.

## **Ensayos de citotoxicidad**

Para determinar, bien el grado de resistencia a la lisis mediada por células NK de las células tumorales o bien la propia capacidad lítica de las células NK, se emplearon dos técnicas experimentales diferentes: (1) ensayo de citotoxicidad fluorimétrico y (2) ensayo de desgranulación de CD107a (LAMP-1).

### **1. Ensayo de citotoxicidad fluorimétrico**

En estos experimentos se enfrentaron células tumorales de diversos orígenes a la acción citotóxica de células NK procedentes de donantes sanos (NK policlonales) o a la línea celular NKL (que expresa altos niveles de receptores activadores).

Para ello, 100.000 células de las líneas tumorales diana (K-562, HCT-116 y Hep-G2) fueron marcadas con el colorante de membrana CFSE. Una vez marcadas, fueron co-incubadas con las células NK o NKL a diferentes ratios 2:1, 10:1 y 20:1 (según proceda) durante 4 horas a 37°C. Transcurrido este tiempo, se añadió 7-AAD (7-Amino-actinomicina D, Sigma), un colorante de vitalidad capaz de intercalarse en el DNA de las células muertas, a una concentración de 10  $\mu$ g/ml en PBS. Seguidamente, se procedió al análisis citométrico de las muestras. Como control negativo del experimento se utilizaron células diana que no habían sido enfrentadas a las células efectoras y

así poder determinar la lisis espontánea derivada del periodo de cultivo. En los casos en los que se realizaron bloqueos del receptor NKG2D, DNAM-1 o NKp30, las células NKL se incubaron en presencia del anticuerpo bloqueante de NKG2D/DNAM-1/NKp30 (15 µg/ml) o de un control isotópico (15 µg/ml) durante 1 h antes de ser enfrentadas a las células diana.

<i>Molécula</i>	<i>Origen</i>	<i>Clon</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Dilución</i>
<i>NKG2D</i>	Ratón mAb	5C6	SantaCruz Biotech	Bloqueante
<i>DNAM-1</i>	Ratón mAb	DX11	BD	Bloqueante
<i>NKp30</i>	Ratón mAb	P30-15	Biolegend	Bloqueante
<i>IgG control</i>	Ratón mAb	IgG normal	SantaCruz	Bloqueante

**Tabla II.8** Anticuerpos bloqueantes utilizados en experimentos de citotoxicidad. mAb=Anticuerpo monoclonal.

Los experimentos fueron realizados siempre por triplicado. A partir de los datos de mortalidad obtenidos se determinó la lisis específica, calculada según la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de lisis específica} = \frac{[(\% \text{ células CFSE}^+ \text{ y 7-AAD}^+ \text{ de la muestra}) - (\% \text{ células CFSE}^+ \text{ y 7-AAD}^+ \text{ del control negativo})]}{(100 - \% \text{ células CFSE}^+ \text{ y 7-AAD}^+ \text{ del control negativo})} \times 100$$

#### → **Ensayo de desgranulación CD107a**

Para determinar la liberación de gránulos citotóxicos producida por la exposición de las células NK y NKT-like a células tumorales, se midió la presencia de la proteína CD107a (LAMP-1). Esta proteína se encuentra en la membrana de los lisosomas, pero cuando se produce la liberación de gránulos citotóxicos queda expuesta en la membrana plasmática. Para realizar estos experimentos, PBMCs de donantes sanos estimulados durante 48 h con IL-2 (5 ng/ml), IL-15 (25 ng/ml), IL-21 (20 ng/ml) o durante 7-14 días con lenalidomida. Fueron co-incubadas con células K-562 o células leucémicas primarias (ratio 5:1, células efectoras:células K562/leucémicas) en medio RPMI completo suplementado con monensina (GolgiStop; BD Biosciences). Como

control positivo de la desgranulación, se incubaron los PBMCs en presencia de PMA (50 ng/ml) e ionomicina (250 ng/ml). El anticuerpo anti-CD107a-PE (BD Bioscience) estuvo presente en el cultivo durante las 4 h de incubación. Algunos experimentos de desgranulación de CD107a fueron llevados a cabo en presencia o ausencia de rituximab (20 µg/ml) con el objetivo de evaluar la ADCC. Trascurridas las 4 horas, las células fueron marcadas con anticuerpos para CD3, CD4, CD8 y CD56 (tabla II.5) y analizadas mediante citometría de flujo.

## **Generación de modelos celulares de poliploidía y análisis del ciclo celular**

Las líneas celulares K-562, HCT-116 y HepG-2 fueron cultivadas durante 48 horas en presencia de 0,6 µg/ml de citocalasina D, 100 nM de nocodazol o 3 nM de docetaxel. Tras el periodo de incubación, se cuantificó el contenido de DNA. Para ello  $5 \times 10^5$  células se lavaron para eliminar los restos de medio de cultivo y se incubaron durante 15 minutos con una solución que contiene 100 µl de RNAsa A (100 µg/ml) en PBS. Posteriormente, se añadieron 400 µl de yoduro de propidio (IP) (50 µg/ml en 0,1% citrato sódico) y se incubaron 15 minutos a 4°C en oscuridad.

Para analizar de forma simultánea la expresión de los ligandos de los receptores activadores y el contenido de material genómico, se utilizó un colorante del DNA que es permeable en células vivas. Para ello, las células tumorales, previamente marcadas para los diferentes ligandos, fueron resuspendidas en 500 µl de medio de cultivo que contenía 10 µg/ml de Hoechts 33342 (Life Technologies) e incubadas durante 45 minutos a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo, las muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo (BD FACSCanto II).

## **Ensayos de apoptosis**

Para determinar el efecto de terminadas drogas sobre la viabilidad celular, se llevaron a cabo ensayos de apoptosis. En todos los casos, las células fueron resuspendidas en tampón *Binding Buffer* (Hepes/NaOH 0,01 M (pH=7,4), NaCl 0,14 M, CaCl<sub>2</sub> 2,5 M) y marcadas con un anticuerpo específico para anexina-V conjugado con FITC y con 7-AAD durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, las células se analizaron en un citómetro de flujo (BD FACSCanto II).

## **Co-cultivo NK/Tumorales**

Las células K-562, HCT-116 y Hep-G2 fueron co-cultivadas con células NK purificadas de donantes sanos para analizar el efecto producido sobre los receptores activadores. Para ello, las células tumorales fueron tratadas con los compuestos citocalasina D, nocodazol y docetaxel durante 48 horas para generar variantes tumorales hiperploides. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron para eliminar cualquier resto de los fármacos, y se co-cultivaron con células NK a un ratio 1:5 (Tumoral: NK) durante 48 horas. Las células NK previamente habían sido expandidas en cultivo durante 5 días en presencia de IL-2 (100 ng/ml). Pasado dicho tiempo, las células NK fueron marcadas con anticuerpos específicos para CD3, CD56, NKG2D, DNAM-I y NCRs (tabla II.5) y analizadas mediante citometría de flujo (BD FACSCanto II).

## **EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN O BLOQUEO**

### **Bloqueo de la producción de IL-2**

Para determinar el papel de la IL-2 sobre la proliferación de ciertas subpoblaciones inmunes, se inhibió su acción mediante el uso de un anticuerpo bloqueante contra la subunidad  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (R&D systems) o bien empleando un fármaco inmunosupresor que inhibe la transcripción de la *IL-2* como es la ciclosporina A (CsA; Sigma). Para ello, PBMCs marcados con CFSE y sometidos a diversos estímulos fueron cultivados en presencia de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del anticuerpo bloqueante de IL-2R $\alpha$  o 1  $\mu\text{M}$  de CsA durante 7 ó 14 días dependiendo del estudio.

### **Inhibición farmacológica de ATM**

Para determinar el efecto que produce la inhibición de ATM en los niveles de MICA en las células poliploides, se utilizó el inhibidor farmacológico de ATM, KU55933 (Tocris). Para ello  $5 \times 10^5$  células de las líneas K-562 y HCT-116 fueron incubadas en medio RPMI o DMEM (dependiendo de la línea celular) completo en presencia de 10  $\mu\text{M}$  de KU55933, durante 1 h antes de ser tratadas con citocalasina D (0,6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 48 horas más. Tras el tiempo de incubación

se determinó la cantidad de la proteína MICA en la membrana plasmática mediante citometría de flujo.

El mismo procedimiento fue realizado en los experimentos de inhibición de PI3K, PERK y de la defosforilación de eIF2 $\alpha$ :

***Inhibidores farmacológicos***

<b><i>Molécula o vía</i></b>	<b>Inhibidor</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Concentración</b>
<i>ATM</i>	KU55933	Tocris	10 $\mu$ M
<i>PI3K</i>	LY-294002	Sigma	10 $\mu$ M
<i>PERK</i>	GSK2606414	Selleckchem	1 $\mu$ M
<i>Defosforilación de eIF2<math>\alpha</math></i>	Salubrinal	Sigma	20 $\mu$ M

**Tabla II.9 Inhibidores farmacológicos utilizados en esta tesis doctoral.**

## ESTADÍSTICA Y ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de igualdad de medias, se utilizaron las pruebas U de Mann Whitney cuando se comparaban 2 muestras independientes. Los análisis de interdependencia de variables fueron calculados con la correlación de Pearson cuando ambas variables eran normales y la correlación de Spearman cuando al menos una de las variables no era normal. Todos los análisis se consideraron significativos cuando el valor  $p < 0,05$ . Los test utilizados y las significaciones obtenidas se muestran en los pies de Figura. En todos los casos la estadística de los datos fue realizada con el programa informático SPSS (IBM)

Las imágenes obtenidas mediante citometría de flujo fueron obtenidas mediante el programa informático BD FACSDiva software (BD Bioscience). Los gráficos que recogen los resultados de los experimentos fueron realizados con Microsoft Excell.



# **CAPÍTULO III**

*EFECTO DE LA LENALIDOMIDA SOBRE EL  
SISTEMA INMUNE DE PACIENTES DE LEUCEMIA  
LINFÁTICA CRÓNICA*

## **BREVE INTRODUCCIÓN AL TEMA**

En esta parte inicial de la tesis pretendemos estudiar la capacidad de inducir la actividad antitumoral de las células NK. Para ello, estudiaremos la capacidad de la lenalidomida para activar la respuesta inmune en la LLC. Hemos elegido este modelo porque numerosas evidencias ponen de manifiesto que el sistema inmunitario juega un papel fundamental en la progresión y la eficacia terapéutica de la LLC. El sistema inmune es capaz de prevenir el desarrollo del cáncer, bien eliminando aquellas variantes más inmunogénicas antes de que el tumor sea clínicamente detectable o bien atenuando la progresión de éste (Dunn et al., 2002). Sin embargo, los pacientes en estado avanzado de la enfermedad suelen desarrollar múltiples defectos inmunológicos que comprometen la respuesta contra el cáncer. Actualmente, la LLC se considera una enfermedad incurable por lo que el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas supone el mayor reto científico en este campo.

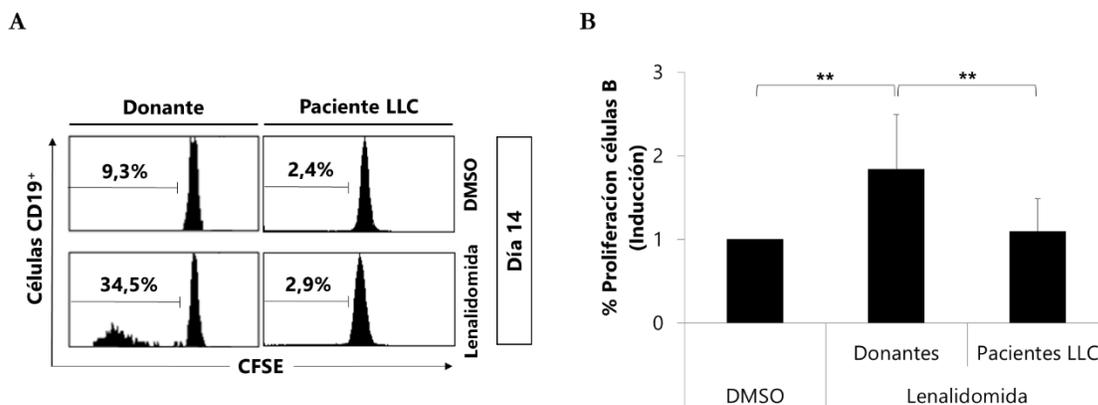
La lenalidomida es un medicamento inmunomodulador de uso clínico en muchos desordenes hematológicos incluyendo mieloma múltiple (MM), síndrome mielodisplásico y LLC. Sin embargo sus mecanismos de acción aún no han sido esclarecidos totalmente, por lo que es esencial profundizar en este tema para optimizar el tratamiento de los pacientes.

En este capítulo, analizaremos los mecanismos de acción que subyacen a la acción terapéutica de la lenalidomida en LLC. Para ello, estudiamos el papel de este medicamento en la proliferación, supervivencia y actividad inmune de las diferentes subpoblaciones linfocitarias, poniendo especial énfasis en el efecto sobre las células NK, y comparamos los resultados obtenidos con sus efectos en las células inmunes de donantes sanos.

## RESULTADOS

### La lenalidomida no afecta a la proliferación de las células leucémicas

En primer lugar, se analizó si la lenalidomida tenía algún efecto sobre la proliferación de las células B (CD19<sup>+</sup> CD5<sup>+</sup>). Para ello, PBMCs procedentes de donantes sanos y de pacientes con LLC fueron marcados con CFSE e incubados en presencia de lenalidomida durante 14 días, ya que, a tiempos mas cortos no se observaron efectos en la proliferación (no mostrado). Como se muestra en la figura III.1, la lenalidomida no tuvo efecto alguno sobre la proliferación de las células leucémicas. No obstante, sí observamos un incremento significativo (1,8- veces de inducción,  $p < 0,01$ ) en la proliferación de los linfocitos B de donantes sanos tratados con la droga durante 2 semanas.



**Figura III.1 Efecto de la lenalidomida sobre la proliferación de las células B.** PBMCs obtenidos de donantes sanos (n=10) y de pacientes de LLC (n=17) fueron marcados con CFSE e incubados en presencia de lenalidomida (1  $\mu$ M) o DMSO durante 14 días. La fluorescencia del CFSE en los linfocitos B (CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) fue analizada mediante citometría de flujo. **A.** Se muestran histogramas representativos de un donante y un paciente de LLC. **B.** El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto al porcentaje de células B en proliferación (\*\* $p < 0,01$ ). Test U de Mann-Whitney.

Posteriormente, se estudió el efecto de la lenalidomida sobre la apoptosis de las células leucémicas. Para ello, se usaron PBMCs aislados de sangre periférica de pacientes de LLC, los cuales contenían cantidades variables de células leucémicas (rango entre 70% y 95%) y de células no malignas. Tras 48 horas en presencia de lenalidomida, no se observó ningún efecto en la apoptosis de las células leucémicas (no mostrado). Sin embargo, tras 7 días de cultivo con lenalidomida, se detectó un aumento significativo en la apoptosis en el clon leucémico (1,6 veces

de inducción,  $p < 0,01$ ) (Figura III.2A y B). Cabe destacar que el porcentaje de apoptosis de las células leucémicas se correlacionó de manera significativa con el porcentaje de células inmunes no malignas a tiempo 0 ( $r = 0,87$ ,  $p = 0,009$ ) (Fig III.2C). Específicamente, existe una alta correlación entre el porcentaje de células NKT-like ( $CD3^+CD8^+CD56^+$ ) y la inducción de apoptosis de las células leucémicas ( $r = 0,84$ ,  $p = 0,01$ ) (Fig III.2D)

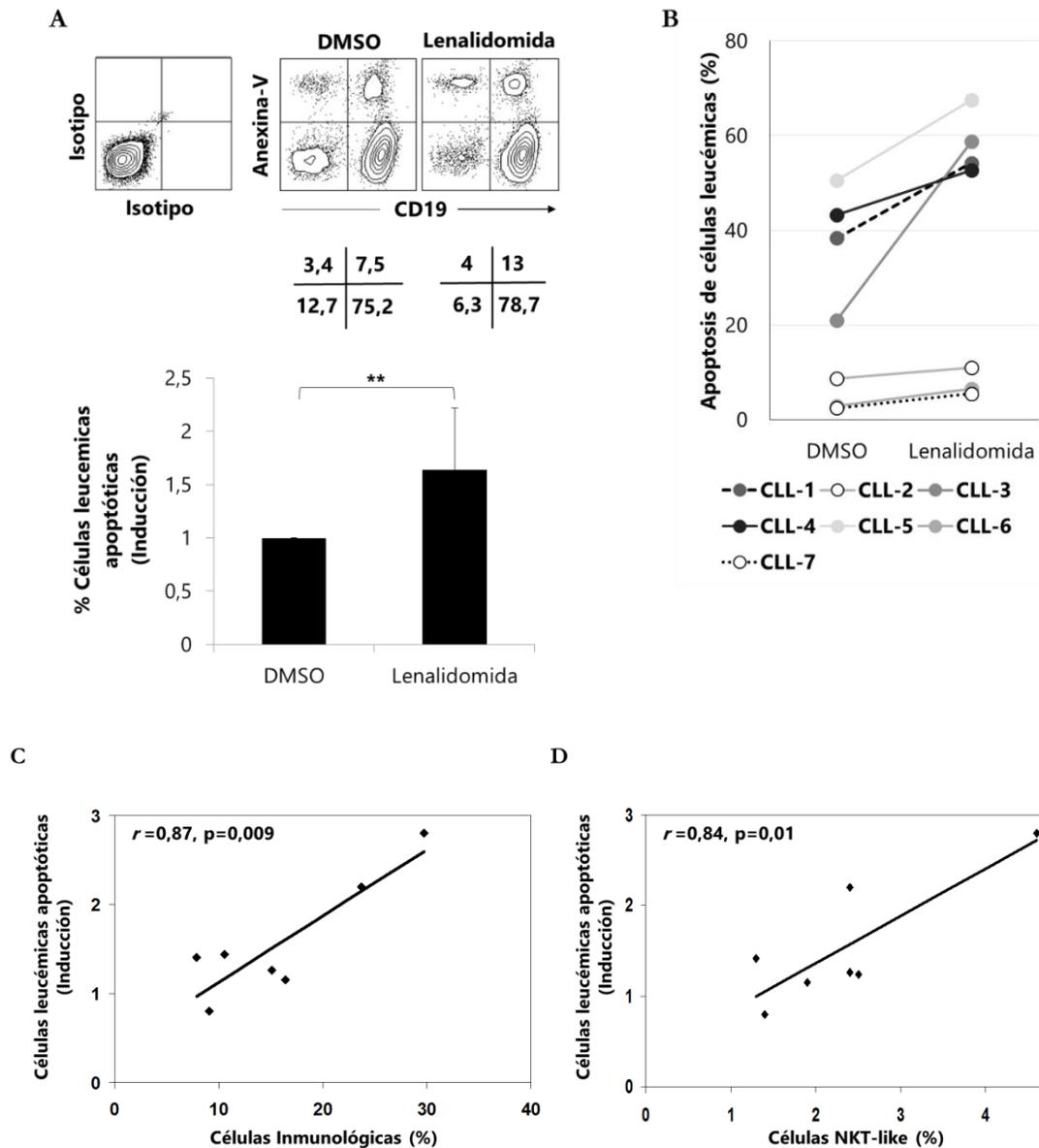
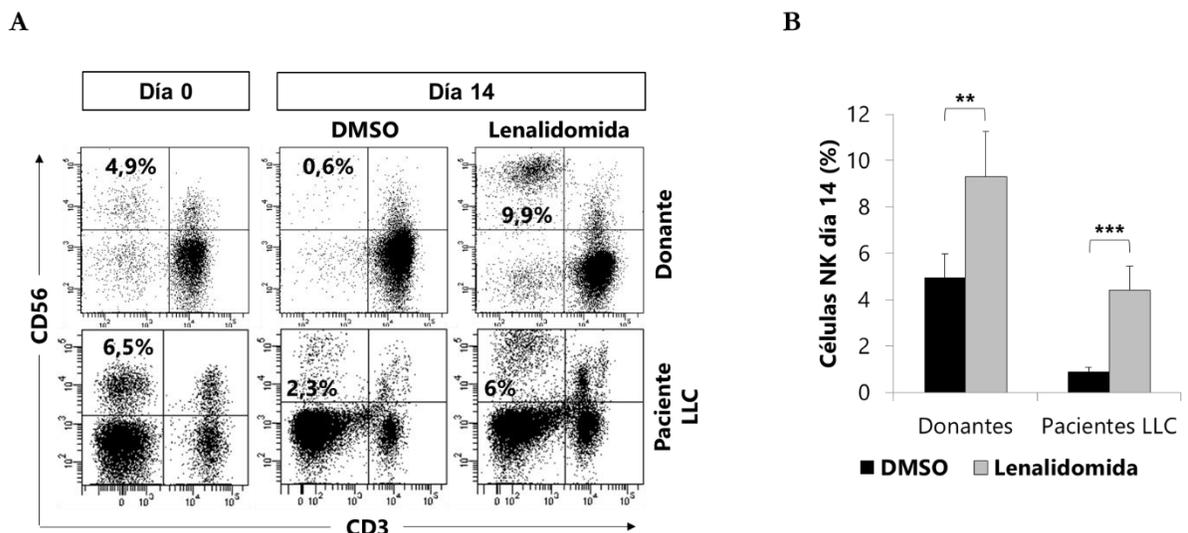


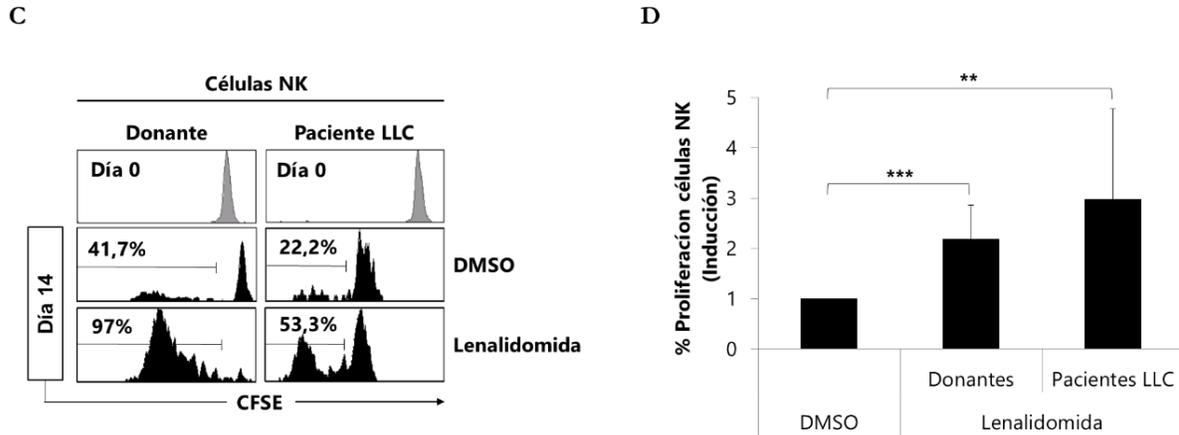
Figura III.2 Efecto de la lenalidomida sobre la apoptosis de las células leucémicas. A. PBMCs de pacientes de LLC (n=7) fueron cultivados en presencia de lenalidomida (1  $\mu$ M) o DMSO durante 7 días y posteriormente fueron marcados con un anticuerpos  $\alpha$ -CD19 y anexina-V para determinar el porcentaje de células leucémicas en apoptosis. Se muestran los dot-plots representativos obtenidos mediante citometría de flujo de un paciente de LLC. Los números hacen referencia el porcentaje de células en cada cuadrante del gráfico. El grafico de barras representa la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto al porcentaje de células leucémicas en

apoptosis (\*\* $p < 0,01$ ). Test U de Mann-Whitney. **B.** El gráfico de dispersión representa el porcentaje de células apoptóticas del control (DMSO) vs. lenalidomida en cada paciente de LLC analizado. **C y D.** Correlación entre el porcentaje de células leucémicas en apoptosis y el porcentaje inicial de células inmunes no malignas ( $r = 0,87$ ;  $p = 0,009$ ) (C) y el porcentaje de células NKT-like ( $r = 0,84$ ;  $p = 0,01$ ) (D). Correlación de Spearman.

### La lenalidomida incrementa la proliferación de células NK

Posteriormente, analizamos el papel de la lenalidomida sobre las células NK. Además del efecto observado sobre los linfocitos B, es importante destacar que el porcentaje de células NK aumentó significativamente tras el cultivo con lenalidomida (Figura III.3A y B). Este incremento fue superior en pacientes de LLC con respecto a donantes (9,8 vs 3,4- veces de inducción del porcentaje celular). Para analizar si el incremento en el porcentaje de células NK era debido a un aumento en su tasa proliferativa, se purificaron PBMCs de pacientes de LLC y donantes sanos y se marcaron con CFSE antes de ser cultivados en presencia de lenalidomida. La proliferación de las células NK fue analizada a los días 3, 6, 9, 12 y 14, pero no fue hasta después del decimosegundo día cuando observó un incremento significativo en la proliferación celular, tanto en muestras de pacientes como de donantes (Figura III.3C y D), siendo el nivel de inducción en pacientes superior al observado en donantes (2,98 vs. 2,19- veces de inducción del porcentaje de células NK en proliferación). De forma llamativa, se observó que la respuesta a la lenalidomida presentaba una gran variabilidad inter-paciente, abarcando desde la no respuesta al tratamiento hasta una inducción de 9,2 veces sobre el porcentaje de células NK que habían proliferado en el control negativo.

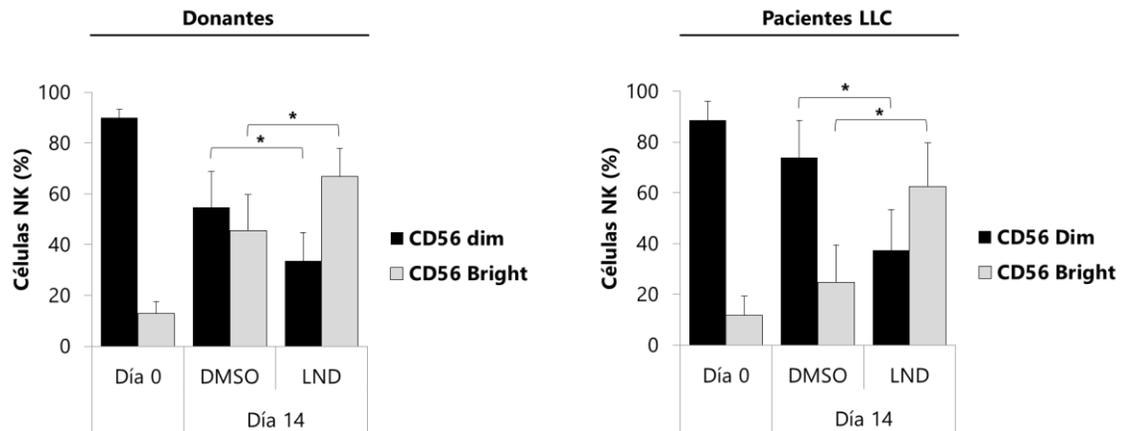




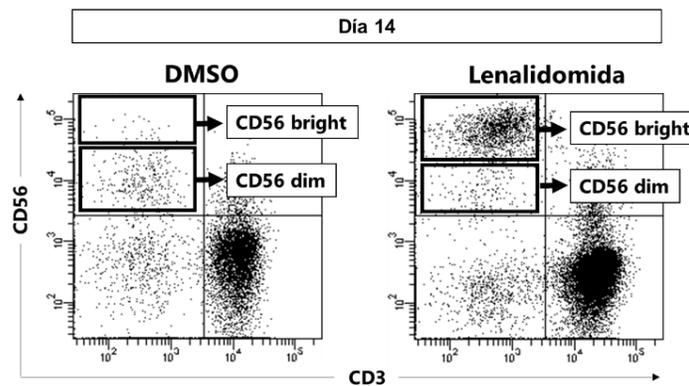
**Figura III.3 La lenalidomida estimula la proliferación de las células NK.** **A.** Se muestran los dot-plots de un donante y un paciente de LLC en los cuales se representa el porcentaje de células NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) antes y después de ser estimulados con lenalidomida (1  $\mu$ M) durante 14 días. **B.** El gráfico de barras muestra la compilación de los resultados obtenidos en pacientes de LLC (n=17) y donantes sanos (n=10). Los resultados se expresan como la media y la desviación típica de la inducción del porcentaje de células NK (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Test U de Mann-Whitney. **C.** PBMCs obtenidos a partir de donantes sanos (n=10) y pacientes con LLC (n=17) fueron marcados con CFSE e incubados en presencia de lenalidomida (1  $\mu$ M) o DMSO durante 14 días. Se muestran histogramas representativos de un donante y un paciente de LLC. **D.** El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción observada en el porcentaje de células NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) en proliferación (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). Test U de Mann-Whitney.

Cabe destacar que las dos poblaciones mayoritarias de células NK (CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup>) proliferaron en presencia de lenalidomida (no mostrado). Sin embargo, el efecto observado sobre la inducción del porcentaje de la subpoblación CD56<sup>bright</sup> fue mucho más potente (Figura III.4A). De manera más específica, lo que se observó es que la lenalidomida invierte el ratio CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> de 0,82 a 1,99 en donantes sanos y de 0,33 a 1,67 en pacientes de LLC (Figura III.4B).

A



B



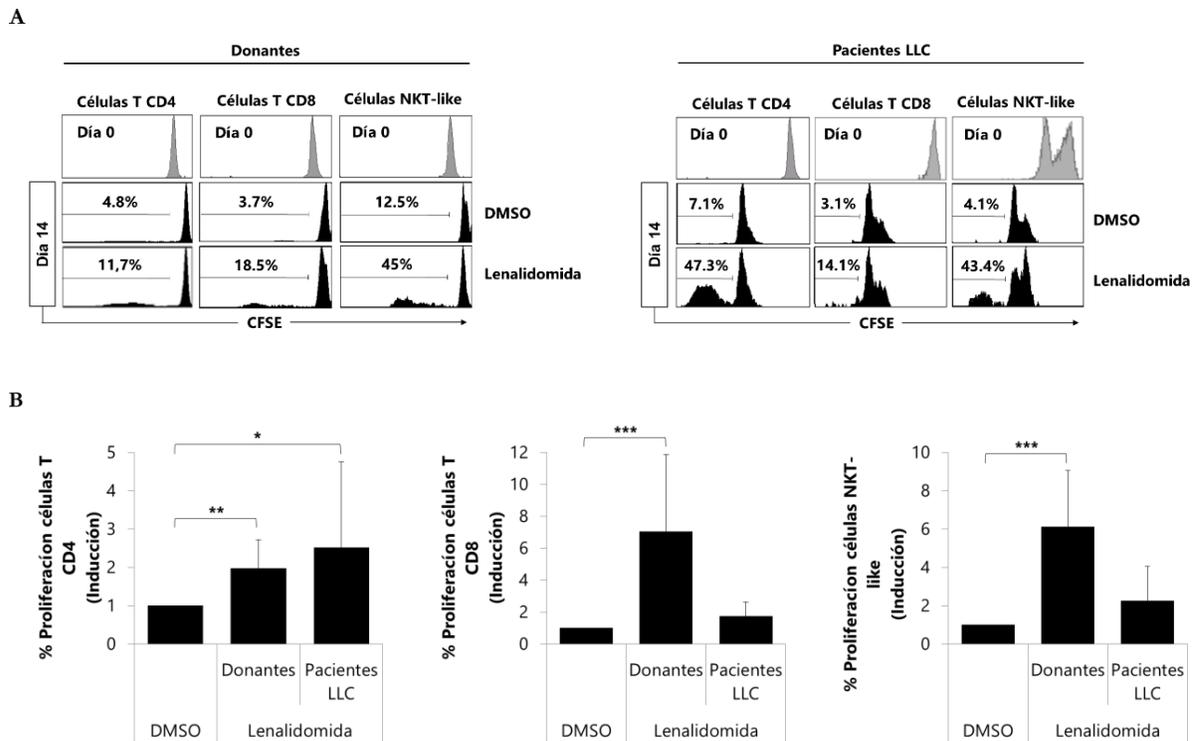
**Figura III.4. Efecto de la lenalidomida sobre las subpoblaciones de células NK.** **A.** Los gráficos muestran la evolución del porcentaje de células NK (CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>) tras la estimulación con lenalidomida (LND) durante 14 días (\*p<0,05; \*\*p<0,01). Test U de Mann-Whitney. **B.** Dot-plots representativos extraídos de un donante sano que muestran la inversión del ratio CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> en respuesta a la lenalidomida.

### La lenalidomida también estimula la proliferación de los linfocitos T

Siguiendo la misma estrategia, examinamos el efecto que ejercía la lenalidomida sobre la proliferación de los linfocitos T (Figura III.5). Se observó que, dentro de las células T, los linfocitos T CD4 eran la subpoblación que más proliferaba en presencia de lenalidomida, siendo dicha proliferación mayor en pacientes de LLC que en donantes (2,52 vs. 1,98- veces de inducción). De manera similar a lo observado en las células NK, existía una gran variabilidad inter-individual en la proliferación de los linfocitos CD4. Más aún, se observó que el porcentaje de células CD4 después del tratamiento con lenalidomida se correlacionaba positivamente con

la proliferación de células NK observada en pacientes de LLC ( $r=0,49$ ,  $p=0,04$ ), sugiriendo que ambos fenómenos podrían estar relacionados.

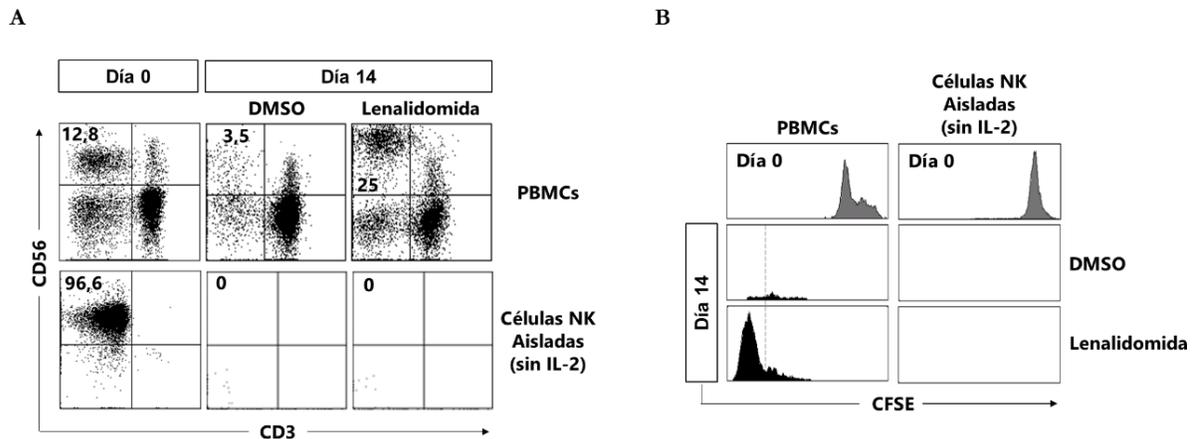
Los linfocitos T CD8 también proliferaron en respuesta a lenalidomida, aunque el nivel de inducción fue muy superior en donantes sanos con respecto a los pacientes (7,03 vs. 1,72- veces de inducción). Las células T CD8 proliferaron en el 100% de los donantes estudiados, mientras que en lo que respecta a pacientes de LLC, únicamente proliferaron en el 66% de las muestras analizadas. Resultados similares se obtuvieron con las células NKT-like, que en presencia de lenalidomida proliferaron, siendo el efecto mucho mayor en donantes que en pacientes (6,12- vs 2,45- veces de inducción).



**Figura III.5 Efecto de la lenalidomida sobre la proliferación de los linfocitos T.** **A.** Los histogramas muestran la expresión de CFSE en los linfocitos T CD4, CD8 y células NKT-like antes y después de ser estimulados con lenalidomida durante 14 días. **B.** Los gráficos muestran la compilación de los resultados obtenidos del análisis de pacientes de LLC ( $n=17$ ) y donantes sanos ( $n=10$ ); en ellos se representan la media y la desviación típica de la inducción del porcentaje de proliferación de linfocitos T CD4, CD8 y NKT-like tratados con lenalidomida con respecto a las células control (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Test U de Mann-Whitney.

## La interleucina-2 es imprescindible para la proliferación de células NK y NKT-like mediada por lenalidomida

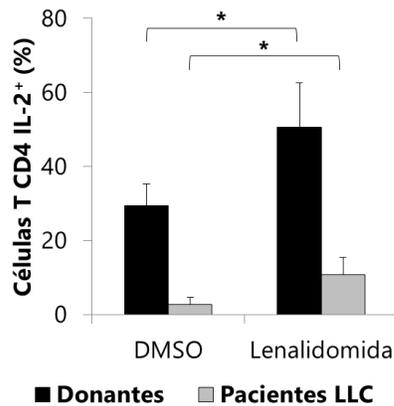
Llegados a este punto del estudio, nos propusimos analizar cuál era el o los mecanismos que subyacían al incremento de la proliferación observada en las células NK en respuesta a la lenalidomida. En primer lugar, analizamos si la lenalidomida ejercía un efecto directo sobre la proliferación celular. Para ello, PBMCs o células NK aisladas de los mismos donantes sanos fueron incubados en presencia de la droga inmunomoduladora. La eliminación del resto de poblaciones inmunes inhibió por completo la proliferación de las células NK, sugiriendo que el efecto de la lenalidomida sobre la proliferación de dichas células era un efecto indirecto.



**Figura III.6** El efecto estimulador de la lenalidomida sobre las células NK es debido a un mecanismo indirecto. **A.** PBMCs o células NK aisladas (>95% de pureza) procedentes del mismo donante (n=4) fueron marcadas con CFSE y estimuladas con lenalidomida (1  $\mu$ M) o DMSO durante 14 días para evaluar su capacidad proliferativa. **A.** Imágenes de citometría de flujo representativas obtenidas a partir de una de las muestras analizadas. Los números representan el porcentaje de células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) en cada situación. **B.** Se muestran histogramas representativos de la expresión de CFSE en células NK de uno de los donantes analizados.

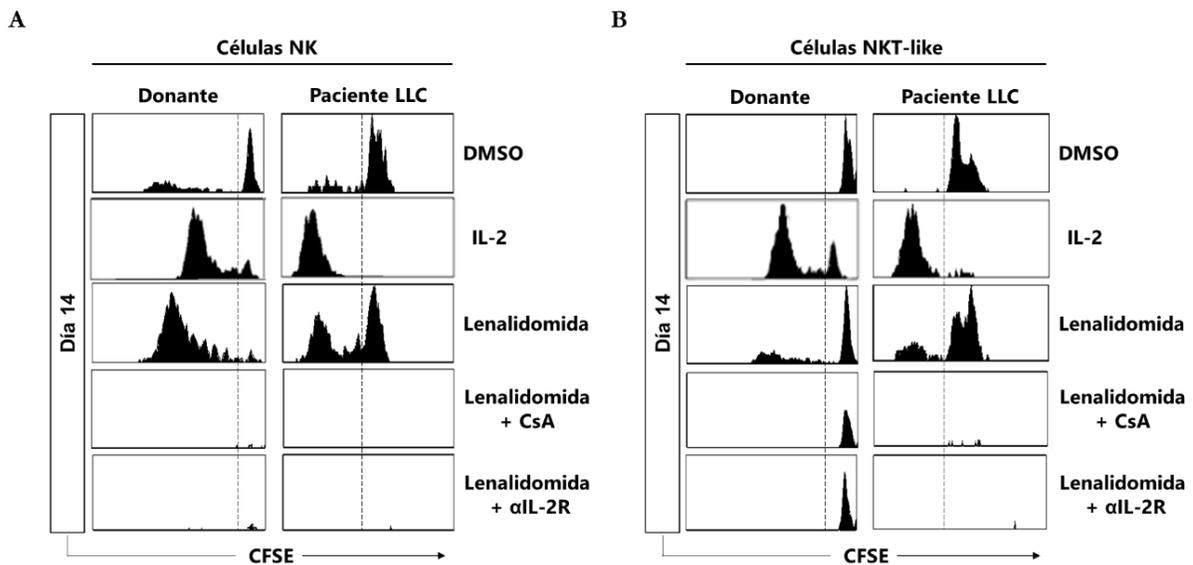
La IL-2 es una citocina producida principalmente por los linfocitos T CD4 y es uno de los principales mediadores de la proliferación de células NK. Por ello, decidimos estudiar qué papel podría tener la lenalidomida sobre la secreción de esta citocina. Para ello, se llevó a cabo un análisis de los niveles de IL-2 intracelular en los linfocitos T CD4 tras el cultivo con lenalidomida. Como se muestra en la figura III.7, el tratamiento con lenalidomida incrementó significativamente la producción de IL-2 en dicha subpoblación linfocitaria, tanto en donantes (32% vs. 53%, p<0,05) como en pacientes (4,1% vs. 14,3%, p<0,05). Sin embargo, existe una

clara inmunodeficiencia en el porcentaje de células productoras de IL-2 en los pacientes de LLC. La lenalidomida es capaz de restaurar parte de la producción de esta citocina que, aunque no alcance los niveles normales, es suficiente para inducir la proliferación de las poblaciones inmunes citotóxicas.



**Figura III.7. Producción de IL-2 por los linfocitos T CD4.** PBMCs obtenidos a partir de donantes sanos (n=4) y pacientes de LLC (n=4) fueron estimulados con lenalidomida durante 14 días, tras los cuales se analizó los niveles de IL-2 intracelular en los linfocitos T CD4. El gráfico representa la media y la desviación típica del porcentaje de células CD4 IL-2+ (\*p<0,05). Test U de Mann-Whitney.

Por otro lado, la presencia de un anticuerpo bloqueante contra el receptor de IL-2 en el medio de cultivo y el bloqueo de la producción de la citocina con ciclosporina A tuvieron un efecto claramente inhibitorio sobre la proliferación de células NK y NKT-like (Figura III.8), indicando que el incremento en la producción de IL-2 mediado por la lenalidomida es indispensable en la expansión de las células NK y NKT-like.

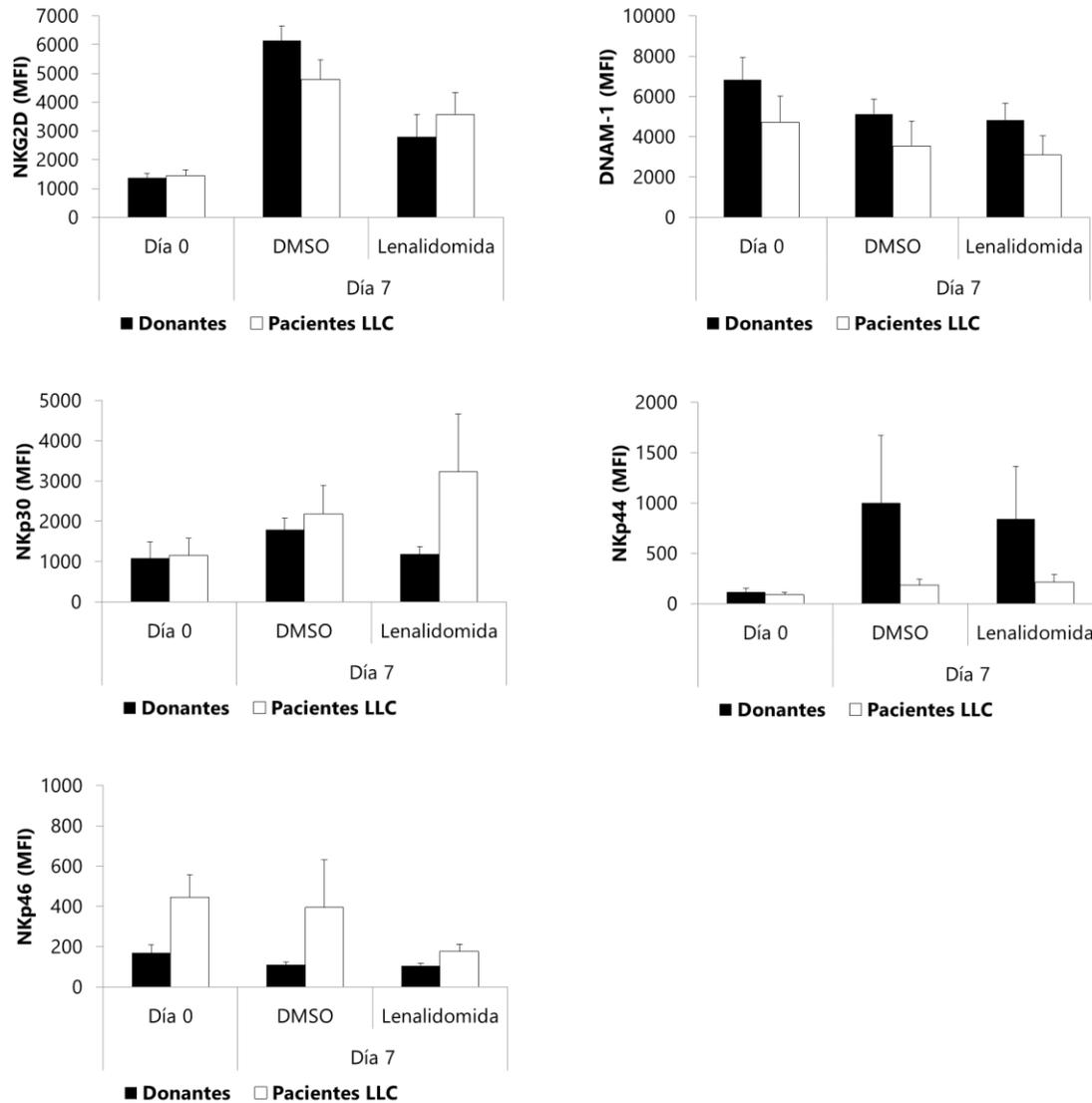


**Figura III.8 La IL-2 es la citocina responsable de la proliferación de las poblaciones citotóxicas.** PBMCs procedentes de donantes sanos (n=4) o pacientes de LLC (n=4) fueron marcados con CFSE e incubados en presencia de IL-2 (control positivo de proliferación, 50 U/ml) o lenalidomida (1  $\mu$ M) en combinación con CsA (1  $\mu$ M) o con un anticuerpo bloqueante  $\alpha$ IL-2R (15  $\mu$ g/ml) durante 14 días. La expresión de CFSE en las células NK **(A)** y NKT-like **(B)** se analizó mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de un donante sano y un paciente de LLC representativos.

En conjunto, estos resultados indican que la lenalidomida induce la producción de IL-2 en los linfocitos T CD4, promoviendo de esa manera la proliferación de células NK y NKT-like. Vale la pena mencionar que la IL-2 exógena fue capaz de inducir la proliferación de células NK en aquellos pacientes que no respondieron al tratamiento con lenalidomida.

### **La lenalidomida estimula la citotoxicidad natural mediada por células NK y la ADCC contra células leucémicas primarias**

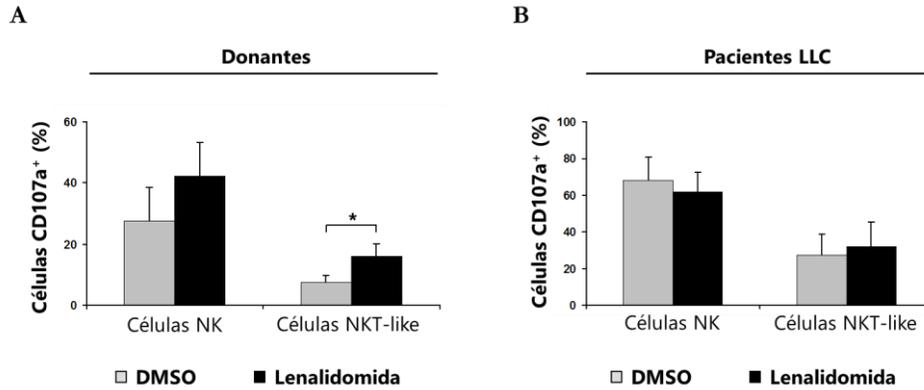
Dada la capacidad de la lenalidomida de activar a las células NK, nos propusimos analizar si también tenía algún efecto sobre las características fenotípicas de dichas células. Para ello, PBMCs procedentes de donantes sanos y de pacientes de LLC fueron incubados con lenalidomida durante 7 días y, transcurrido este tiempo, se analizó la expresión de los receptores activadores NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44 y NKp46 mediante citometría de flujo (Figura III.9). Los resultados de estos experimentos muestran cómo únicamente NKp30 sufre un incremento en los pacientes de LLC en respuesta a la lenalidomida, mientras el resto de receptores disminuyen como consecuencia de la presencia de droga durante el cultivo. Cabe destacar que el nivel basal de expresión del receptor NKp46 se encuentra aumentado en los pacientes de LLC en comparación con los niveles observados en donantes (2,32- veces de inducción).



**Figura III.9 Efecto de la lenalidomida sobre la expresión de los receptores activadores de células NK.** PBMCs procedentes de donantes sanos (n=3) o de pacientes de LLC (n=4) fueron incubados en presencia de lenalidomida (1  $\mu$ M) durante 7 días tras lo cual se analizó la expresión de NKG2D, DNAM-1, Nkp30, Nkp44 y Nkp46 en la superficie de las células NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. Los gráficos muestran la compilación de resultados obtenidos antes y después del tratamiento con lenalidomida representados como la media y la desviación típica de la MFI (Intensidad Media de Fluorescencia) de cada receptor.

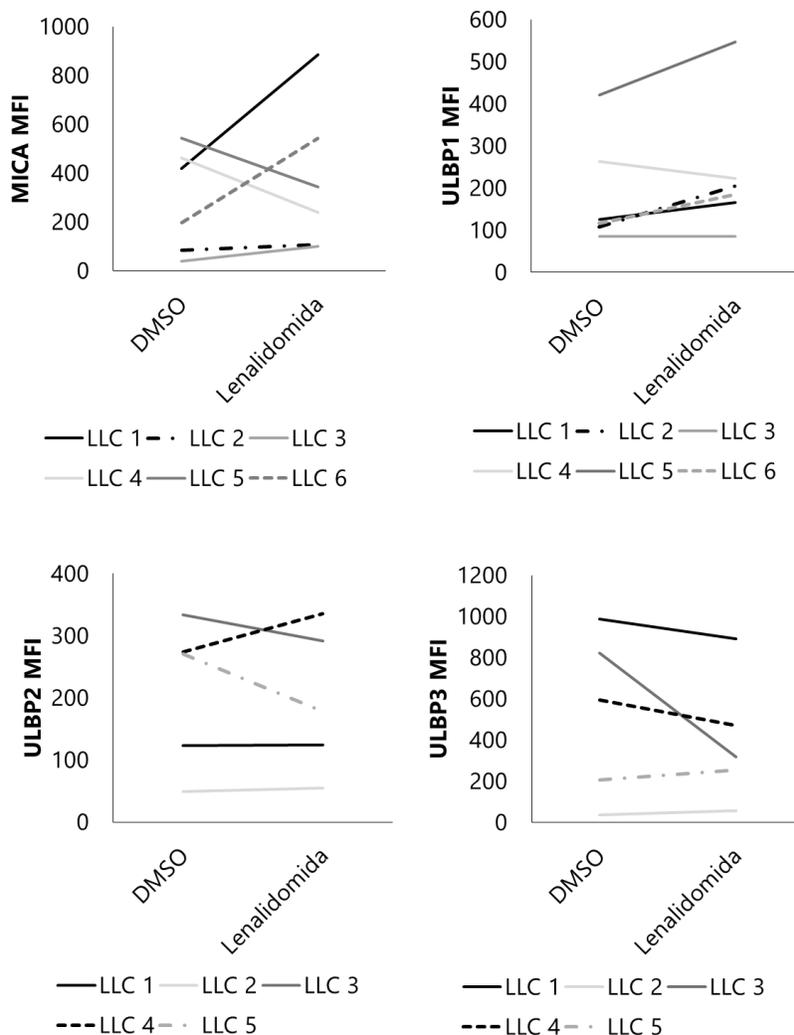
Seguidamente, analizamos cuál era el efecto de la lenalidomida sobre la actividad citotóxica de las células NK y NKT-like. Para ello, PBMCs de donantes y pacientes de LLC fueron estimulados con lenalidomida durante 14 días, transcurrido dicho tiempo, se realizó un ensayo de citotoxicidad (desgranulación de CD107a) usando como células diana la línea tumoral K-562. La lenalidomida fue capaz de incrementar la actividad citotóxica de células NK (1,5 veces

de inducción) y de las células NKT-like (2,1 veces de inducción,  $p < 0,05$ ) procedentes de donantes sanos. Sin embargo, no se observó un cambio significativo en la capacidad citotóxica de células NK y NKT-like de pacientes de LLC en respuesta a la lenalidomida.



**Figura III.10 Efecto de la lenalidomida sobre la actividad citotóxica de las células NK y NKT-like frente a la línea K-562.** PBMCs procedentes de donantes sanos ( $n=4$ ) o pacientes con LLC ( $n=4$ ) fueron incubados en presencia de lenalidomida ( $1 \mu\text{M}$ ) durante 14 días. Los PBMCs estimulados fueron co-cultivados con células de la línea K-562 en una relación 5:1 (efectora:diana) y, transcurridas 4 horas, se analizó la expresión de CD107a en las células NK ( $\text{CD3}^+\text{CD56}^+$ ) y NKT-like ( $\text{CD3}^+\text{CD8}^+\text{CD56}^+$ ). Los gráficos representan la media y la desviación típica del porcentaje de células CD107a+ ( $*p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Por otro lado, quisimos analizar si la lenalidomida era capaz de modular la respuesta citotóxica de las células NK en frente a células leucémicas primarias. Lo primero que evaluamos fue si la lenalidomida tenía algún efecto sobre la expresión de los NKG2DLs. Para ello, PBMCs aislados de pacientes de LLC fueron estimulados con la droga durante 7 días, tras los cuales se analizó la expresión de MICA y ULBP1-3 en las células leucémicas ( $\text{CD19}^+$ ). Como se observa en la figura III.11, el tratamiento con lenalidomida produjo una respuesta muy variable sobre la expresión de los diferentes ligandos de NKG2D, dejando clara la gran variabilidad inter-paciente que existe en esta enfermedad.

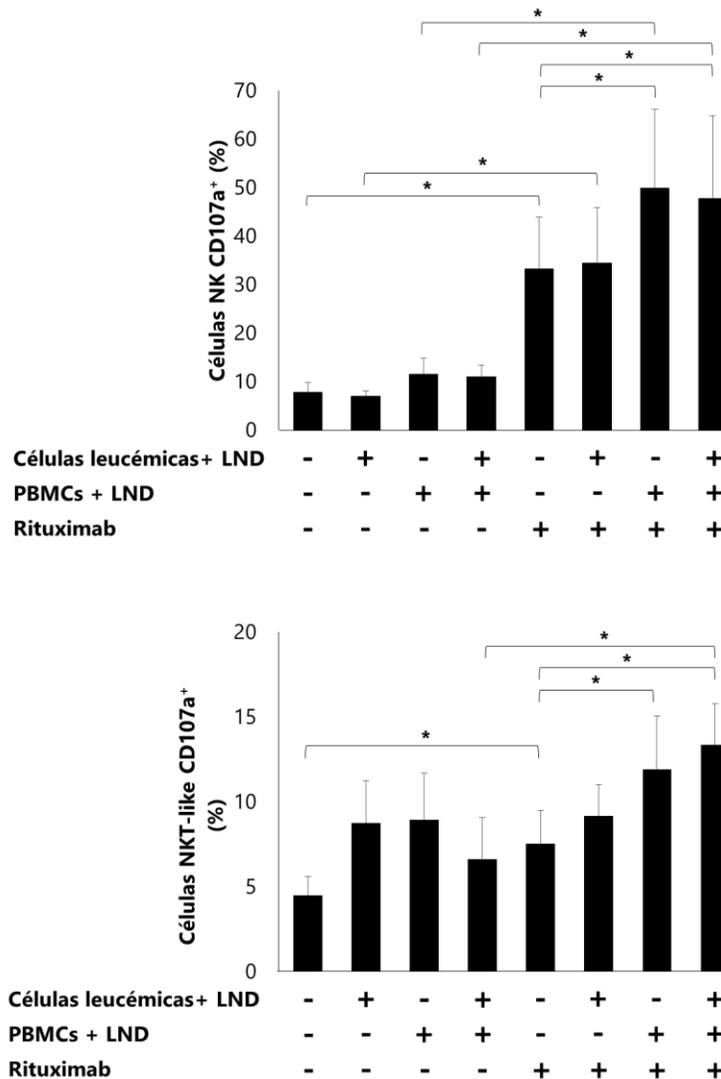


**Figura III.11** Expresión de MICA y ULBP1-3 en la membrana de células leucémicas. PBMCs de pacientes con LLC (n=5) fueron tratados durante 7 días con lenalidomida 1 μM o DMSO y se analizó la expresión de los NKG2DLs en las células B leucémicas (CD19<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo.

Por último, PBMCs procedentes de donantes sanos fueron estimulados con lenalidomida durante 14 días. Trascurrido este tiempo, los PBMCs se co-cultivaron durante 4 horas con células leucémicas previamente purificadas y tratadas o no con lenalidomida. El tratamiento con la droga resultó en un incremento de la actividad citotóxica de las células NK (1,46-veces de inducción) y las células NKT-like (1,97-veces de inducción) frente a células leucémicas primarias (Figura III.12). Cabe destacar que el tratamiento de las células leucémicas con lenalidomida no tuvo un efecto acumulativo sobre la lisis de dichas células, sugiriendo que el efecto principal de la droga



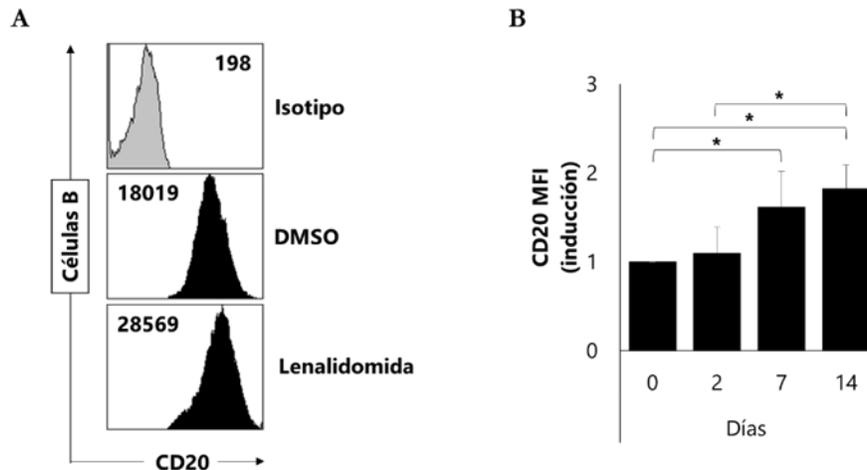
B



**Figura III.11 La lenalidomida incrementa la citotoxicidad natural y la ADCC contra células leucémicas primarias.** **A.** PBMCs procedentes de donantes sanos (n=4) y células leucémicas purificadas (>90% de pureza) obtenidas a partir de muestras de LLC (n=4) fueron tratadas con lenalidomida durante 14 días. Los PBMCs estimulados con lenalidomida (o DMSO) se co-cultivaron con las células leucémicas, que a su vez habían sido tratadas o no con lenalidomida, en una relación 5:1 (PBMC:LLC) en presencia o ausencia de rituximab (20 µg/ml). Se evaluó la expresión de CD107a en los linfocitos T CD8, células NKT-like y células NK mediante citometría de flujo. Se muestran dot-plots representativos de la expresión de CD107a en las poblaciones celulares indicadas. Los números representan los porcentajes de células CD107a+ en cada condición. **B.** Los gráficos de barras muestran la media y la desviación típica del porcentaje de células NK y NKT-like positivas para CD107a (\*p<0,05). Test U de Mann-Whitney.

Para caracterizar el mecanismo que controla el efecto cooperativo observado entre rituximab y lenalidomida, los PBMCs de pacientes de LLC fueron tratados con lenalidomida y

posteriormente se determinó la presencia de CD20 en la superficie celular a los 2, 7 y 14 días de cultivo. No se vio un efecto claro en la expresión de CD20 a las 48 horas de tratamiento; sin embargo, sí se observó un incremento significativo en la expresión a los 7 y 14 días (1,62-veces de inducción,  $p < 0,05$ ; y 1,83-veces de inducción,  $p < 0,05$ ; respectivamente) (Fig.III.13A y B)



**Figura III.13 Análisis de la expresión de CD20 en las células leucémicas.** **A.** PBMCs procedentes de pacientes de LLC (n=4) fueron cultivados en presencia de lenalidomida (1  $\mu$ M) durante 2, 7 y 14 días y la expresión de CD20 se analizó en la superficie de las células B (CD5<sup>+</sup> CD19<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de la expresión de CD20 a día 14 de las células control (DMSO) respecto de las células estimuladas con lenalidomida. Los números representan la MFI en cada condición. **B.** El gráfico de barras muestra la media y la desviación típica de la MFI de CD20 en las células tratadas con lenalidomida respecto a las células control (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney. MFI: Media de Intensidad de Fluorescencia.

Nuestros hallazgos ponen de manifiesto que la lenalidomida promueve la proliferación y la actividad citotóxica de células NK y NKT-like, así como la capacidad de inducir ADCC contra células leucémicas de pacientes de LLC tratadas con rituximab. Pero, sobre todo, nuestros resultados indican que las células NK y NKT-like son los principales mediadores en el efecto citotóxico que ejerce la lenalidomida en la LLC.

## DISCUSIÓN

La activación del sistema inmune representa una de las opciones terapéuticas más prometedoras para hacer frente a la LLC, particularmente para aquellos pacientes que sufren recaídas o recidivas de la enfermedad. A este respecto, la lenalidomida es un fármaco inmunomodulador con una demostrada actividad terapéutica en LLC, mieloma múltiple, síndrome mielodisplásico y otros cánceres hematológicos. Aunque, debido a su pleiotropismo, aún no se ha podido definir claramente el mecanismo o mecanismos responsables de su actividad terapéutica (A. Chanan-Khan et al., 2006; Ferrajoli et al., 2008; Gonzalez-Rodriguez et al., 2013; Sher et al., 2010). La evidencia clínica del potencial terapéutico de la lenalidomida se debe a los múltiples efectos farmacodinámicos que ha mostrado esta droga tanto *in vitro* como en modelos animales. Los estudios realizados hasta la fecha muestran que la lenalidomida puede actuar bajo varios mecanismos distintos dependiendo del cáncer hematológico del que se trate. Así, las diferencias en cuanto a la eficacia de la terapia con lenalidomida pueden ser explicadas, al menos en parte, por el estatus inmunológico del individuo y por la patofisiología específica de la enfermedad. Nuestros resultados indican que la lenalidomida no tiene actividad anti-leucémica directa en la LLC, sino que implica mecanismos indirectos de activación de las células del sistema inmune, particularmente células NK y linfocitos T CD4.

Nuestro estudio revela que la lenalidomida muestra efectos muy diversos sobre los diferentes tipos celulares del sistema inmunológico, siendo las células NK las que juegan un papel más relevante en la actividad anti-tumoral en la LLC. De este modo, la lenalidomida induce la proliferación de células NK, siendo este efecto más pronunciado en pacientes de LLC que en donantes sanos. En concordancia con nuestros resultados, estudios *in vivo* muestran como el número de células NK se incrementa tras el tratamiento con lenalidomida, además, los niveles de células NK antes del tratamiento están correlacionados con la respuesta a la terapia en LLC (Awan et al., 2010; A. Chanan-Khan et al., 2006; Kotla et al., 2009). Adicionalmente, hemos observado que la lenalidomida estimula la proliferación de las células T, en particular de los linfocitos T CD4 la cual es mayor en pacientes de LLC que en donantes. Por el contrario la capacidad proliferativa de linfocitos T CD8 y células NKT-like es superior en donantes sanos que en pacientes de LLC. De forma llamativa hemos observado que el porcentaje de linfocitos T CD4 se correlaciona de manera significativa con la capacidad proliferativa de las células NK

tras el tratamiento con lenalidomida, lo que sugiere que ambos procesos celulares podrían estar relacionados. Por otro lado, la depleción de las células T bloquea por completo la proliferación de las células NK sugiriendo la existencia de un fuerte vínculo entre ambas poblaciones. Se ha descrito que la lenalidomida facilita la translocación al núcleo de los factores NFAT (*Nuclear factor of activated T-cells*) y AP-1 (*activating protein-1*) a través de la activación de la vía PI3K, lo cual promueve la secreción de IL-2 por parte de las células T (Hayashi et al., 2005). Recientemente, se ha descubierto que una de las principales dianas de la lenalidomida es el CRBN, la unión de la droga a este factor facilita la degradación en el proteasoma de los factores de transcripción Ikaros y Aiolos, dos factores que reprimen la transcripción de la IL-2 (Gandhi et al., 2014). En concordancia con estas observaciones, nuestros resultados demuestran que la proliferación de células NK y NKT-like se debe a la acción de la IL-2 secretada por los linfocitos T CD4. En consecuencia, el bloqueo de la actividad de la IL-2 inhibe por completo su proliferación. Sin embargo, debemos destacar que nuestro estudio revela la existencia de una gran variabilidad inter-individual en la respuesta a la lenalidomida y que, aquellos pacientes que no respondieron al tratamiento con lenalidomida si lo hicieron cuando se les aportó IL-2 exógena, sugiriendo que los linfocitos T de dichos pacientes podrían tener algún defecto en la ruta de síntesis o secreción de IL-2. El análisis de las consecuencias terapéuticas de esta variación en la respuesta a lenalidomida puede llegar a ser un importante factor predictivo en el tratamiento de esta enfermedad que debe ser investigado en profundidad.

Además, observamos que la lenalidomida mejora la capacidad citotóxica de las células NK y NKT-like frente a las células leucémicas. Este efecto es debido mayoritariamente a la activación de las células inmunes ya que, el tratamiento de las células leucémicas con lenalidomida no produjo ningún cambio notable en su susceptibilidad a la lisis. El inmunofenotipado de las células NK reveló que la lenalidomida es capaz de aumentar la expresión del receptor activador NKp30 en la superficie de dichas células, lo cual sugiere que este receptor podría estar involucrado en la respuesta citotóxica de las células NK en la LLC. Sin embargo, el hecho de que la lenalidomida solo tenga un modesto efecto sobre la inducción de la actividad anti-tumoral de las células NK no es inesperado, ya que las células leucémicas expresan bajos niveles de los ligandos de los receptores activadores de células NK, probablemente debido a mecanismos de evasión tumoral que las hace más resistentes a la eliminación por parte del sistema inmunológico (Huergo-Zapico et al., 2012). Además, hay que tener en cuenta que el receptor activador NKG2D se encuentra disminuido en pacientes de LLC (Huergo-Zapico et al., 2014), no siendo

capaz la lenalidomida de restaurar su expresión, lo que dificulta aún más la eliminación de los clones leucémicos.

Por ello, para incrementar la actividad anti-tumoral del sistema inmunitario en la LLC es necesario favorecer el reconocimiento de las células leucémicas por parte de las células NK y NKT-like. En consonancia con esta idea, la lenalidomida es un buen candidato para ser combinado con otros fármacos que aumenten la inmunogenicidad del tumor como el rituximab (L. Wu et al., 2008). Nuestros resultados muestran que la lenalidomida y el rituximab son capaces de cooperar ejerciendo un efecto sinérgico sobre la activación de la ADCC, favoreciendo la eliminación las células leucémicas. Este sinergismo se debe, al menos en parte, a que la lenalidomida es capaz de aumentar la expresión de la molécula CD20 en la superficie de las células B leucémicas.

En conjunto nuestros hallazgos proporcionan una base firme para el uso combinado de lenalidomida con rituximab en el tratamiento de la LLC, y sugiere que la combinación de lenalidomida con otros agentes que incrementen la inmunogenicidad del tumor, por ejemplo, induciendo la expresión de los ligandos para los receptores activadores de células NK en la superficie de las células leucémicas como inhibidores de histonas desacetilasas (Lopez-Soto, Folgueras, Seto, & Gonzalez, 2009), agentes antimetabólicos, etc..., puede ser una estrategia terapéutica muy atractiva en el tratamiento de la LLC que debe ser tomada en cuenta.

En conclusión, este estudio indica que la activación de los linfocitos T CD4 y de las células NK son los mecanismos clave que subyacen al efecto terapéutico de la lenalidomida en LLC, estos resultados proporcionan información para la optimización y la mejora de la eficacia de la lenalidomida en el tratamiento de los pacientes con LLC.



# **CAPÍTULO IV**

*INDUCCIÓN DE LA INMUNOGENICIDAD TUMORAL  
MEDIANTE FÁRMACOS ANTIMITÓTICOS*

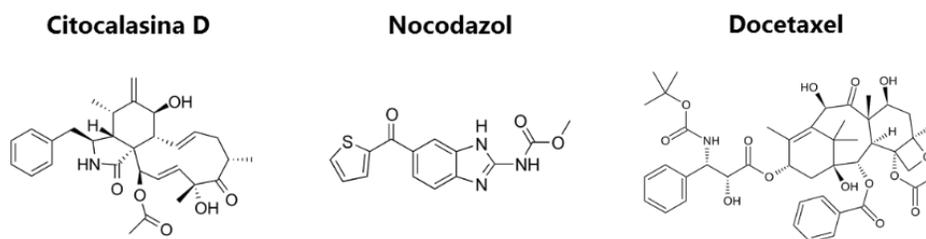
## **BREVE INTRODUCCIÓN AL TEMA**

Como mencionamos anteriormente una de nuestras hipótesis es que para producir una completa activación de las células NK no basta con restituir su actividad usando medicamentos inmunomoduladores como la lenalidomida y el rituximab. Sino que también es necesario emplear estrategias que hagan a las células tumorales más “visibles” para el sistema inmunitario. Durante la realización de esta tesis doctoral se describió que la poliploidía tumoral estaba sometida a un exhaustivo control por parte del sistema inmune (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Por ello, nos propusimos estudiar el papel de ciertos fármacos antimetabólicos sobre la inmunogenicidad tumoral, concretamente sobre la regulación de los ligandos activadores de células NK y su repercusión en la inmunovigilancia mediada por dichas células.

## RESULTADOS

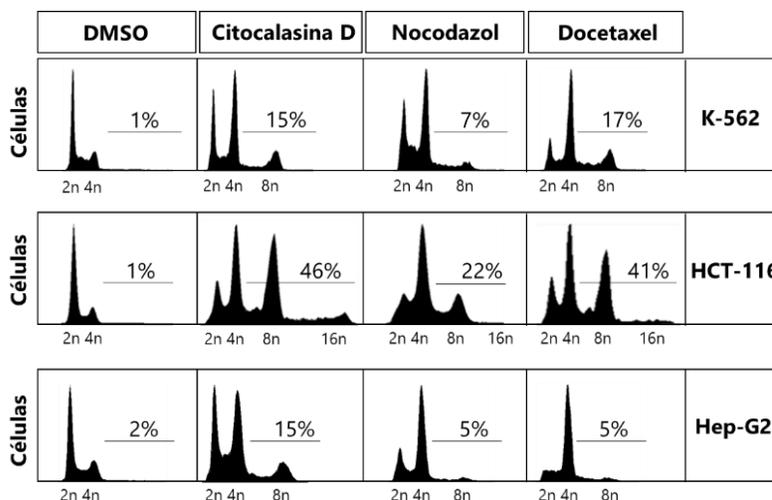
### Generación de células tumorales hiperploides mediante inducción farmacológica

Células K-562, HCT-116 y Hep-G2 (Tabla II.2) fueron tratadas con determinados agentes antimitóticos que inducen hiperploidía celular (Figura IV.1).



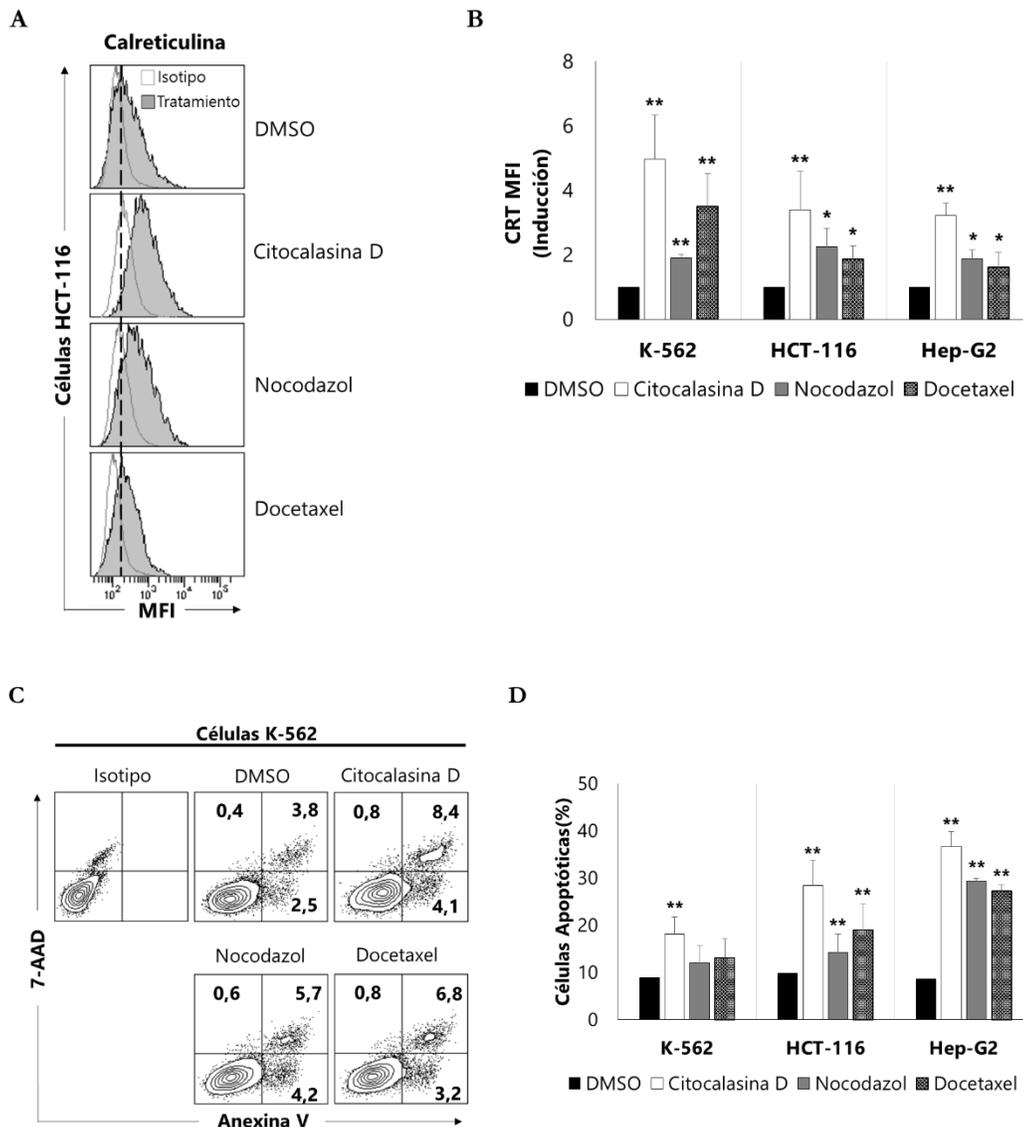
**Figura IV.1 Agentes inductores de poliploidía celular.** La citocalasina D (cit D) es un metabolito de origen fúngico capaz de unirse a los filamentos de actina e impedir su polimerización. Nocodazol y docetaxel son agentes antineoplásicos que ejercen su actividad interfiriendo la polimerización de los microtúbulos. Todos ellos tienen actividad antimitótica.

Como se observa en la figura IV.2, el tratamiento con citocalasina D, así como con nocodazol o docetaxel, resulta en la acumulación de células hiperploides (contenido en DNA >4n). Siendo la línea celular HCT-116 la que mayor grado de poliploidía presenta con las 3 drogas empleadas, generándose incluso células con un genotipo hiperploide 16n.



**Figura IV.2 Análisis del contenido genómico.** Ciclo celular representativo de las líneas tumorales K-562, HCT-116 y Hep-G2 tratadas con citocalasina D (0,6 µg/ml), nocodazol (100 nM) o docetaxel (3 nM) durante 48 horas y analizadas mediante citometría de flujo. En cada histograma se especifica el % de células poliploides (>4n).

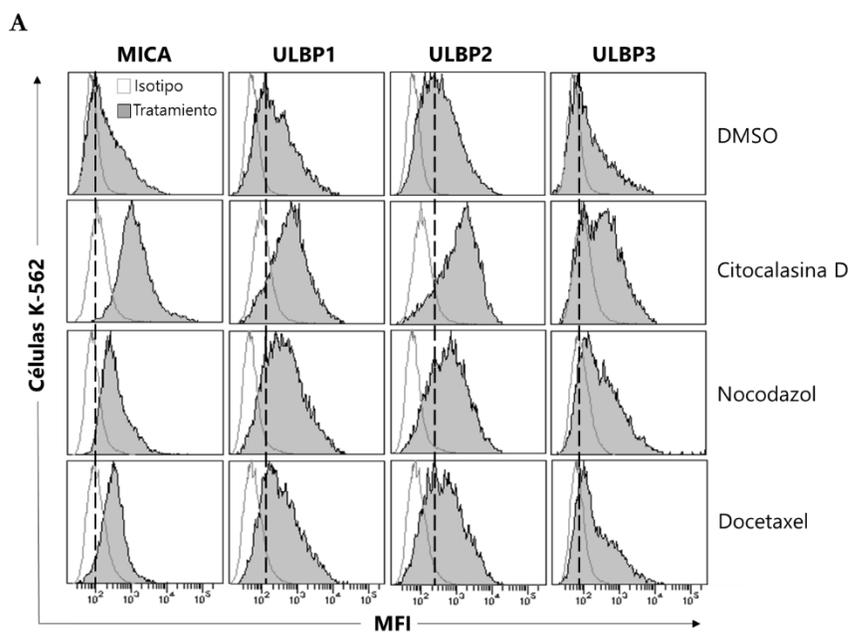
Como previamente se había descrito (Senovilla, Vitale, et al., 2012), la adquisición de un genotipo hiperploide se asocia con la exposición de CRT en la superficie celular y un incremento de la apoptosis celular (Figura IV.3).



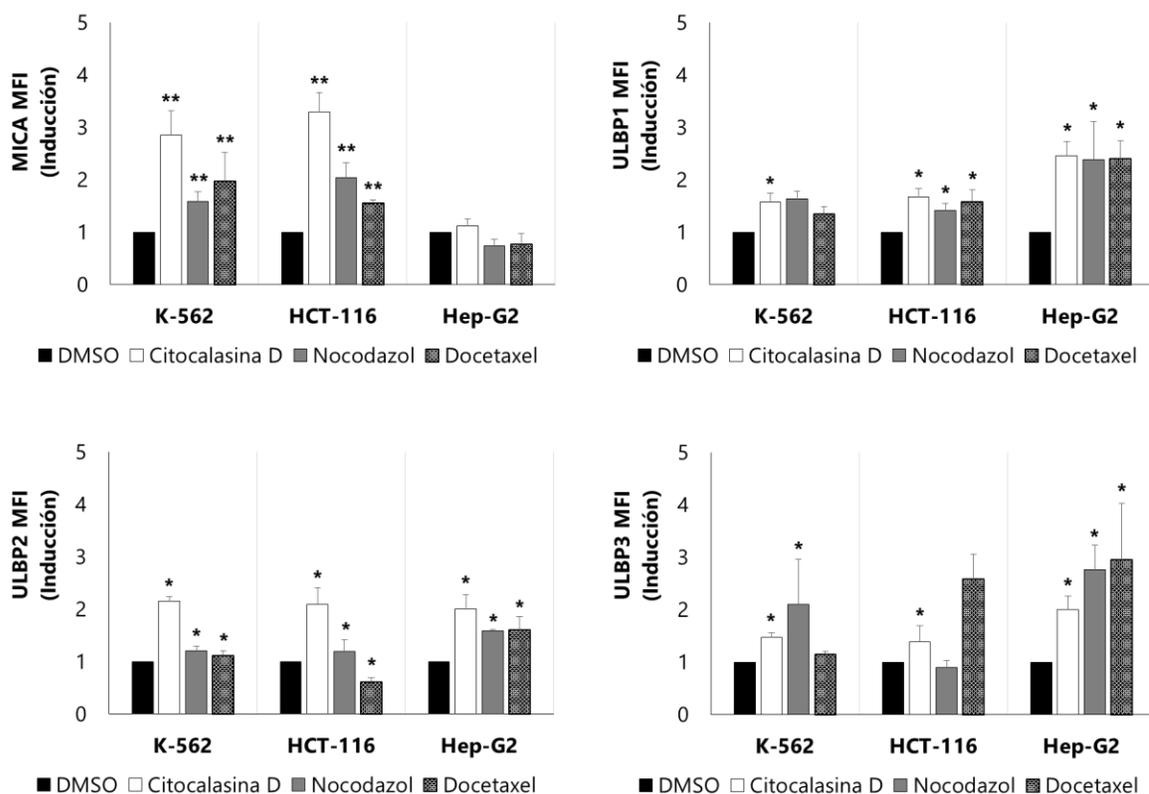
**Figura IV.3 Características de la poliploidía celular.** **A.** Análisis citométrico de la expresión en membrana de CRT tras el tratamiento con citocalasina D (0,6 µg/ml), nocodazol (100 nM) o docetaxel (3 nM) durante 48 horas. En la figura se muestran histogramas representativos obtenidos de la línea HCT-116. **B.** Las barras representan la media y la desviación típica de la inducción de la MFI de CRT de al menos 3 experimentos independientes (\*p<0,05 y \*\*p<0,01). Test U de Mann-Whitney. **C.** Análisis de viabilidad y apoptosis. Células tratadas con citocalasina D, nocodazol y docetaxel fueron marcadas con anexina-V y 7-AAD y analizadas mediante citometría de flujo. Se muestran los dot-plots de un experimento llevado a cabo con la línea celular K-562. **D.** El gráfico representa la media y la desviación típica del porcentaje de células apoptóticas (Anexina-V<sup>+</sup>/7-AAD<sup>+</sup>) de al menos 3 experimentos independientes (\*\*p<0,01). Test de U Mann-Whitney.

## La adquisición de hiperploidía incrementa la expresión de ligandos de los receptores activadores de células NK

A continuación, se analizó el efecto de los quimioterápicos sobre la expresión de ligandos de los receptores activadores de las células NK (NKG2D, DNAM-1 y NKp30) mediante citometría de flujo. Como se observa en la figura IV.4, hay ciertas diferencias debidas a la línea celular y al tratamiento empleado pero, en todos los casos, se observa un incremento en la expresión de los ligandos de NKG2D. MICA se indujo principalmente en la líneas K-562 y HCT-116, mientras que la línea Hep-G2 exhibe una fuerte inducción de las moléculas ULBP1-3.

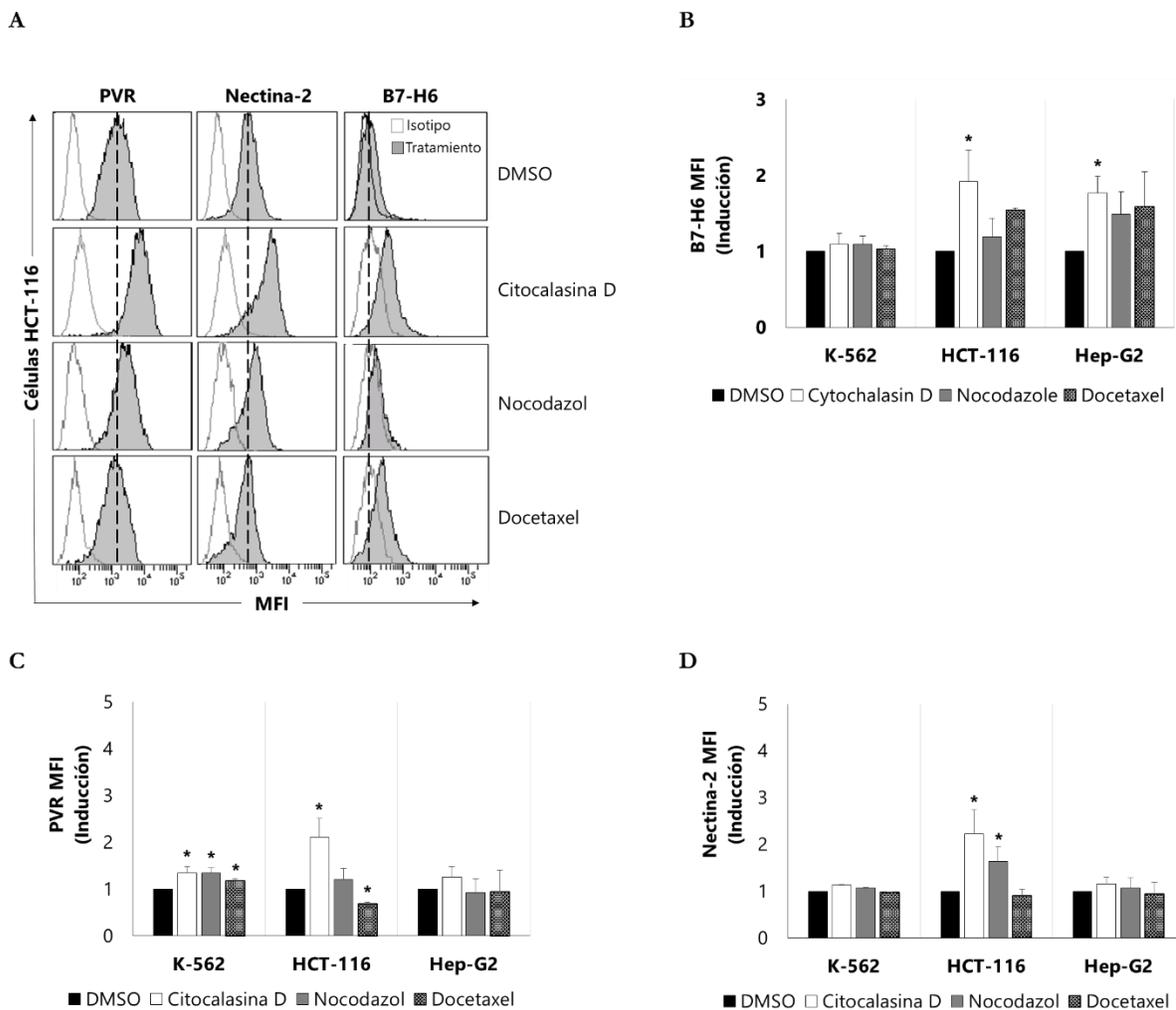


B



**Figura IV.4** La expresión de los ligandos de NKG2D está incrementada en las células tumorales tratadas con agentes inductores de hiperploidía. Las líneas tumorales K-562, HCT-116 y Hep-G2 fueron tratadas con citocalasina D, nocodazol y docetaxel durante 48 horas y posteriormente se evaluó la expresión en membrana de los ligandos de NKG2D. **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de MICA, ULBP1, ULBP2 y ULBP3 en la línea K-562. **B.** Los gráficos representan las medias y las desviaciones típicas de la inducción de MFI de al menos 3 experimentos independientes (\*p<0,05 y \*\*p<0,01). Test U de Mann-Whitney.

Además, se observó un incremento significativo en los niveles de los ligandos del receptor DNAM-1 (PVR y Nectina-2) en la línea celular HCT-116 (Figura IV.5). De forma similar, la expresión de PVR se indujo también en células K-562 (Figura IV.5). La expresión del ligando B7-H6 del receptor NKp30 se incrementó en HCT-116 y Hep-G2, únicamente en presencia de citocalasina D (Figura IV.5). Sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de la molécula HLA-I, a excepción de un ligero aumento sobre la línea K-562 (Fig.IV.S1).



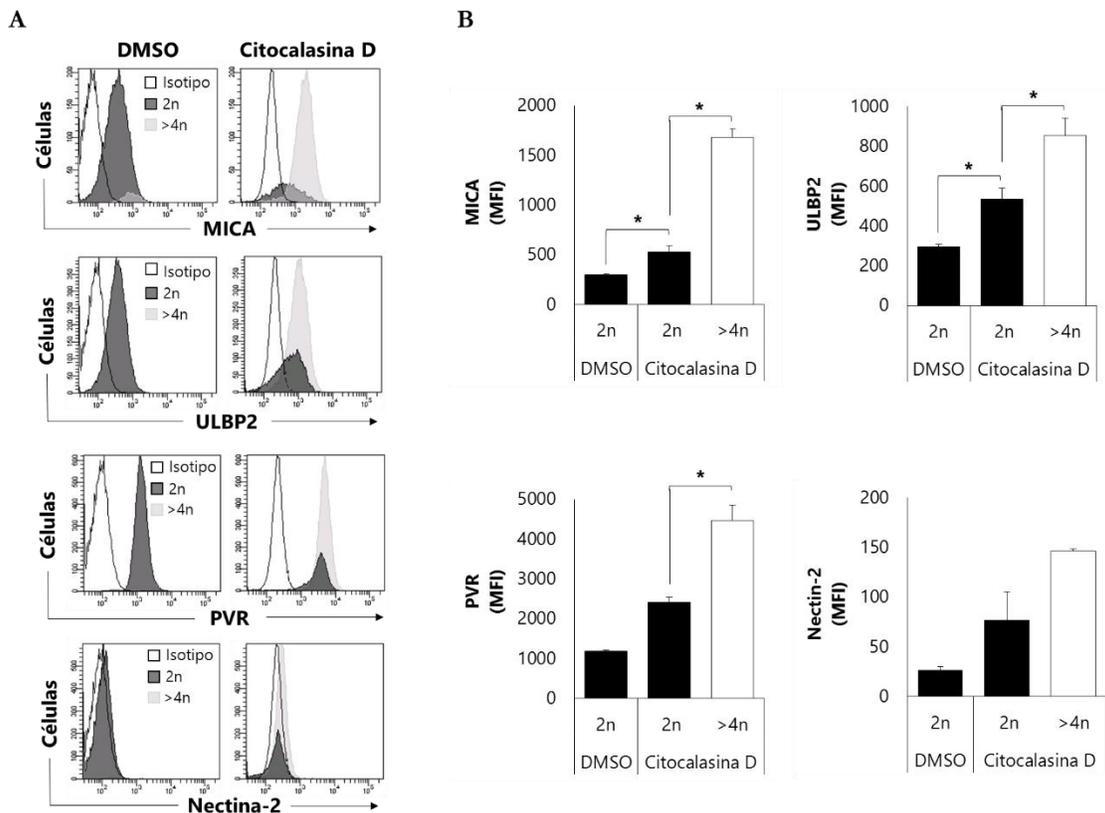
**Figura IV.5** Análisis de la expresión de los ligandos de DNAM-1 y NKp30 en líneas tumorales tratadas con fármacos inductores de hiperploidía. Las líneas tumorales K-562, HCT-116 y Hep-G2 fueron tratadas con citocalasin D, nocodazol y docetaxel durante 48 horas y posteriormente se evaluó la expresión en membrana de los ligandos de los receptores activadores DNAM-1 y NKp30. **A.** Citometría de flujo representativa de la expresión de PVR, Nectina-2 y B7-H6 en la línea HCT-116. **B-D.** Los gráficos representan las medias y las desviaciones típicas de la inducción de la MFI de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ ). Test U de Mann-Whitney.

A modo de resumen de esta primera parte del estudio, en la siguiente tabla se recogen los datos obtenidos sobre la expresión de todas las moléculas analizadas:

<i>Línea celular</i>	<i>K-562</i>			<i>HCT-116</i>			<i>Hep-G2</i>		
<i>Ligando</i>	<i>Ratio tratamiento/vehículo (MFI)</i>			<i>Ratio tratamiento/vehículo (MFI)</i>			<i>Ratio tratamiento/vehículo (MFI)</i>		
	Cit D	Noc	Dtx	Cit D	Noc	Dtx	Cit D	Noc	Dtx
<i>MICA</i>	<u>2.84</u>	<u>1.58</u>	<u>1.96</u>	<u>3.28</u>	<u>2.03</u>	<u>1.56</u>	1.12	0.74	0.77
<i>ULBP1</i>	<u>1.57</u>	<u>1.63</u>	<u>1.34</u>	<u>1.67</u>	<u>1.41</u>	<u>1.58</u>	<u>2.45</u>	<u>2.38</u>	<u>2.39</u>
<i>ULBP2</i>	<u>2.15</u>	1.21	1.12	<u>2.09</u>	<u>1.20</u>	<u>0.61</u>	<u>2.00</u>	<u>1.58</u>	<u>1.60</u>
<i>ULBP3</i>	<u>1.47</u>	<u>2.09</u>	1.15	1.38	0.89	<u>2.58</u>	<u>1.99</u>	<u>2.76</u>	<u>2.95</u>
<i>Nectin-2</i>	1.12	<u>1.07</u>	<u>0.97</u>	<u>2.22</u>	<u>1.62</u>	0.90	1.15	1.06	0.93
<i>PVR</i>	<u>1.34</u>	<u>1.34</u>	<u>1.17</u>	<u>2.10</u>	1.20	<u>0.68</u>	1.26	0.91	0.94
<i>B7-H6</i>	1.09	1.12	1.02	<u>1.92</u>	1.19	1.54	<u>1.77</u>	1.48	1.58
<i>HLA-I</i>	<u>1.69</u>	1.30	1.15	1.48	1.14	1.01	1.32	0.95	0.96
<i>CRT</i>	<u>4.96</u>	<u>1.89</u>	<u>3.50</u>	<u>3.38</u>	<u>2.24</u>	<u>1.87</u>	<u>3.22</u>	<u>1.88</u>	<u>1.61</u>

**Tabla IV.1** Expresión en la superficie de ligandos activadores de células NK, de HLA-I y de calreticulina en células hiperploides inducidas con agentes farmacológicos. Los valores indican el ratio de la intensidad de fluorescencia media del tratamiento vs. Vehículo. Los valores estadísticamente significativos ( $p < 0,05$ ; Test U de Mann-Whitney) aparecen subrayados. CitD – Citocalasina D; Noc – Nocodazol; Dtx – Docetaxel.

Para profundizar en la posible relación causa-efecto entre la adquisición de un genotipo hiperploide y la sobre-expresión de ciertos ligandos de los receptores activadores de células NK, células tumorales fueron expuestas a citocalasina D o nocodazol y se analizó la presencia de MICA, ULBP2, PVR y nectina-2 de forma simultánea a la determinación de su contenido en DNA. El estudio reveló que la expresión de los ligandos está fuertemente incrementada en aquellas células que poseen un contenido genómico  $>4n$  en comparación con sus homologas diploides (Figura IV.6 y IV.S2), sugiriendo una fuerte correlación entre ambos procesos celulares.

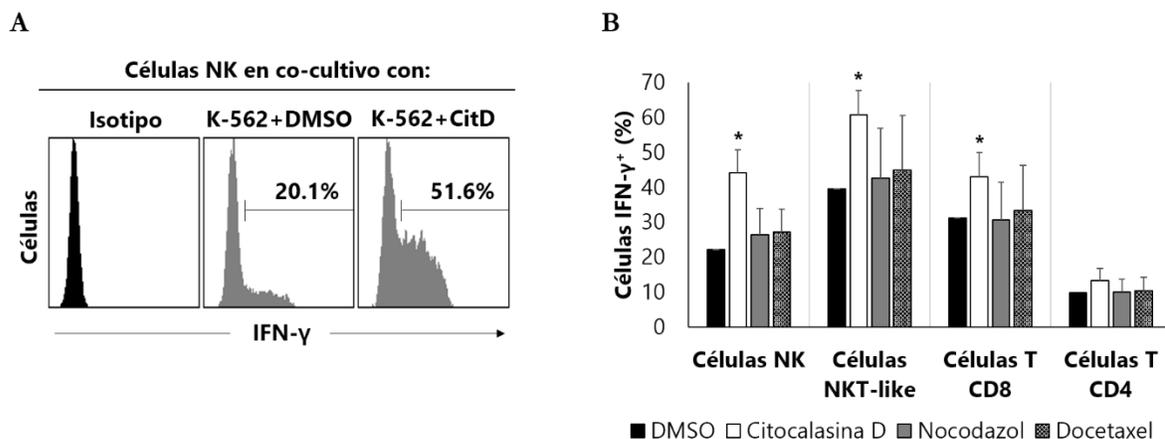


**Figura IV.6** La expresión de los ligandos activadores está aumentada en las células tumorales poliploides. El contenido de DNA y la expresión en membrana de MICA, ULBP2, PVR y Nectina-2 se analizó de forma simultánea en células de la línea tumoral HCT-116 tratadas con citocalasina D mediante citometría de flujo. **A.** Se muestran histogramas representativos de uno de los experimentos realizados. **B.** Los gráficos representan las medias y las desviaciones típicas de la MFI de dichos ligandos en células diploides (2n) *vs.* poliploides (>4n) de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test de U Mann-Whitney.

### La exposición a células tumorales hiperploides modula el fenotipo inmune e induce la actividad citotóxica de células NK

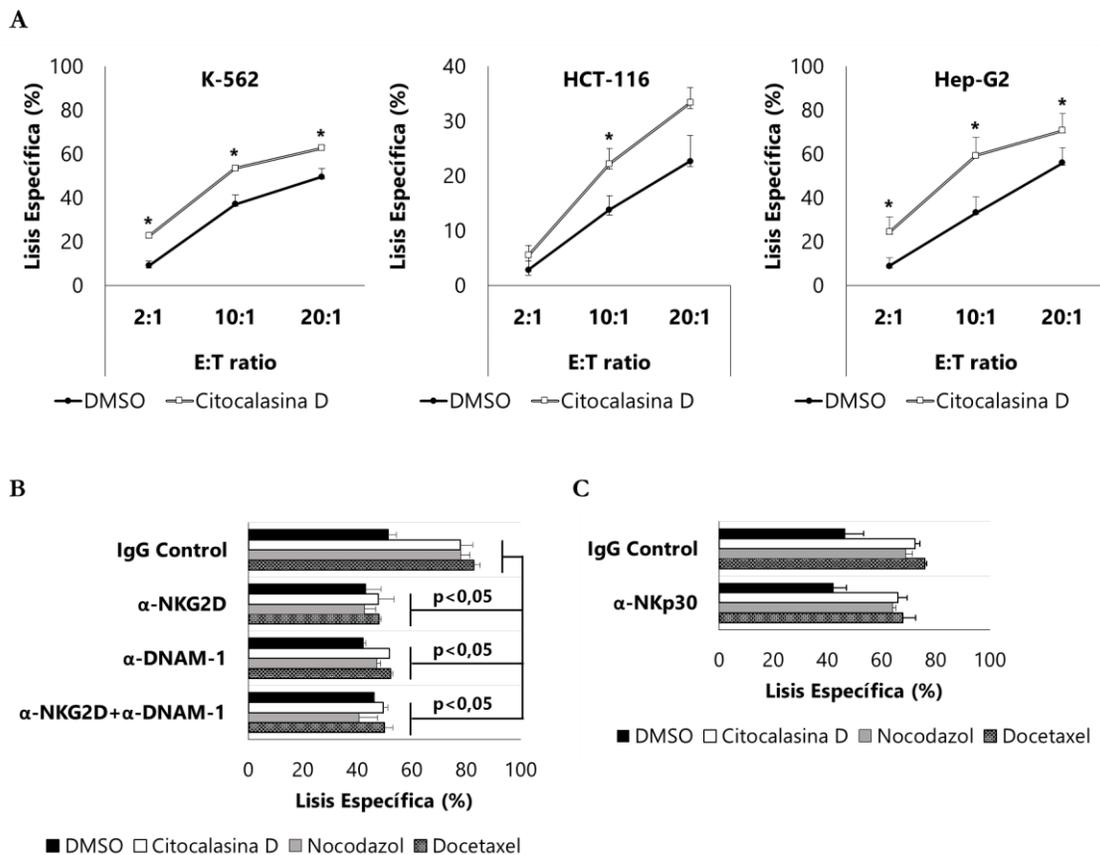
Dado el incremento observado en los niveles de los ligandos de NKG2D y DNAM-1 tras el tratamiento con los fármacos inductores de hiperploidez, nos propusimos estudiar cuál sería su efecto sobre la capacidad citotóxica y el fenotipo inmune de las células NK. Para ello, PBMCs de donantes sanos fueron co-cultivados en presencia de células tumorales pre-tratadas con las drogas antimitóticas y, posteriormente, se determinó el nivel de IFN- $\gamma$  intracelular mediante citometría de flujo. Como se muestra en la figura IV.7, la producción de IFN- $\gamma$  se incrementó en células NK,

NKT-like (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y linfocitos T CD8, únicamente en presencia de células tumorales previamente tratadas con citocalasina D.



**Figura IV.7** La exposición a células tumorales hiperploides estimula la producción de IFN-γ. **A.** PBMCs procedentes de donantes sanos (n=4) fueron co-cultivados con células K-562 tratadas con citocalasina, nocodazol o docetaxel y, posteriormente, se analizó el nivel de IFN-γ intracelular en células NK, NKT-like, linfocitos T CD8 y CD4 mediante citometría de flujo. Se muestra un histograma representativo de la producción de IFN-γ en las células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). **B.** El gráfico muestra la media y la desviación típica del porcentaje de células positivas para IFN-γ (\*p<0,05). Test U-Mann Whitney.

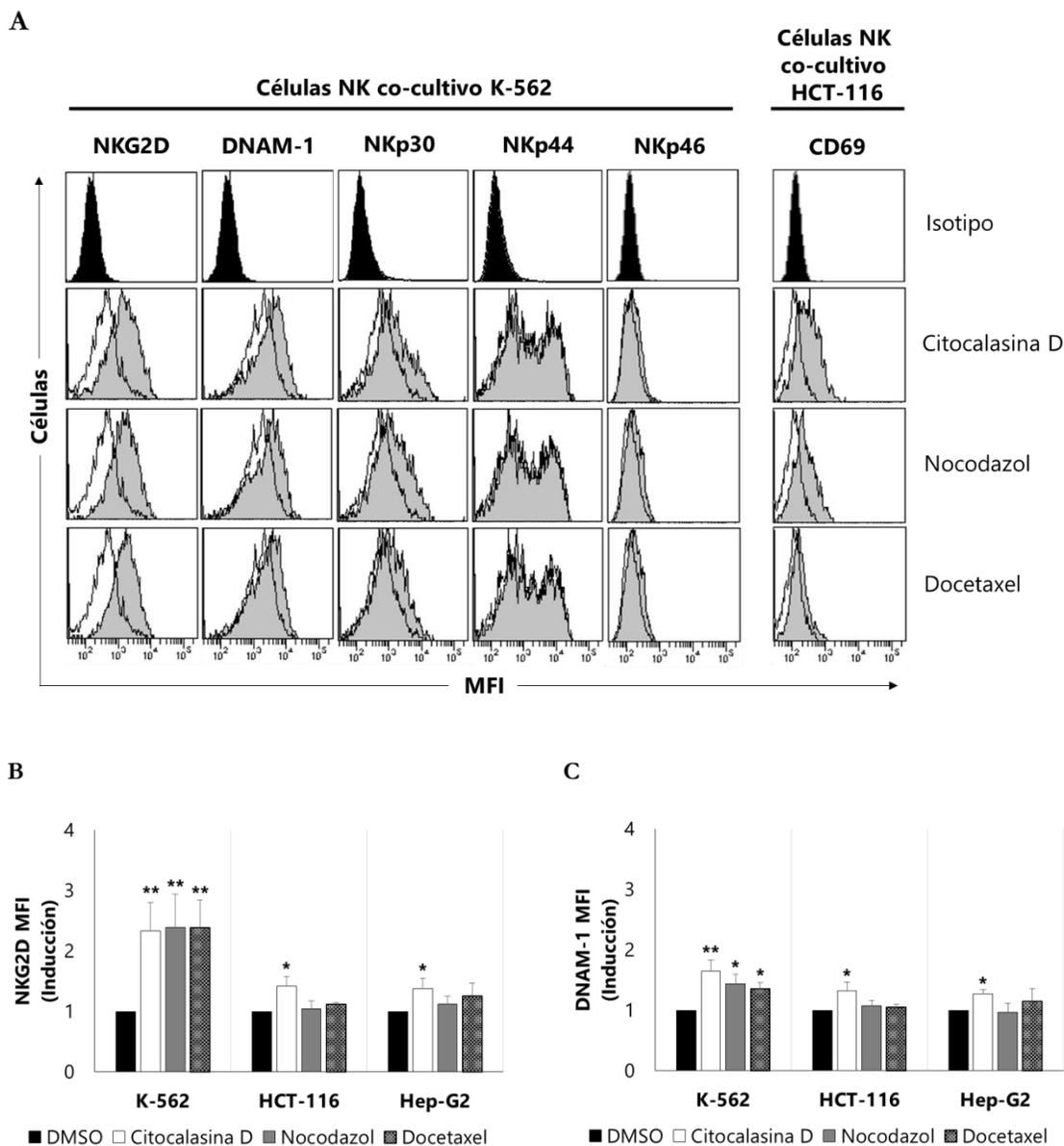
En concordancia con la producción de IFN-γ que sugiere una mayor activación de las poblaciones inmunes citotóxicas, las células tumorales hiperploides fueron más susceptibles a la lisis mediada por células NK como se demostró en ensayos de citotoxicidad *in vitro* (Fig.IV.8A). Este efecto fue más pronunciado en la línea Hep-G2, en la cual, el incremento de lisis específica fue significativo con las tres drogas antimetabólicas (Fig. IV.8A y IV.S3). Así mismo, el bloqueo de los receptores activadores NKG2D y DNAM-1 inhibió por completo la actividad citotóxica de las células NK (Fig.IV.8B), no siendo así cuando se bloqueó el receptor NKP30 (Fig.IV.8C). Estos resultados sugieren que los receptores NKG2D y DNAM-1 son esenciales en el reconocimiento y la eliminación de aquellas variantes tumorales hiperploides.

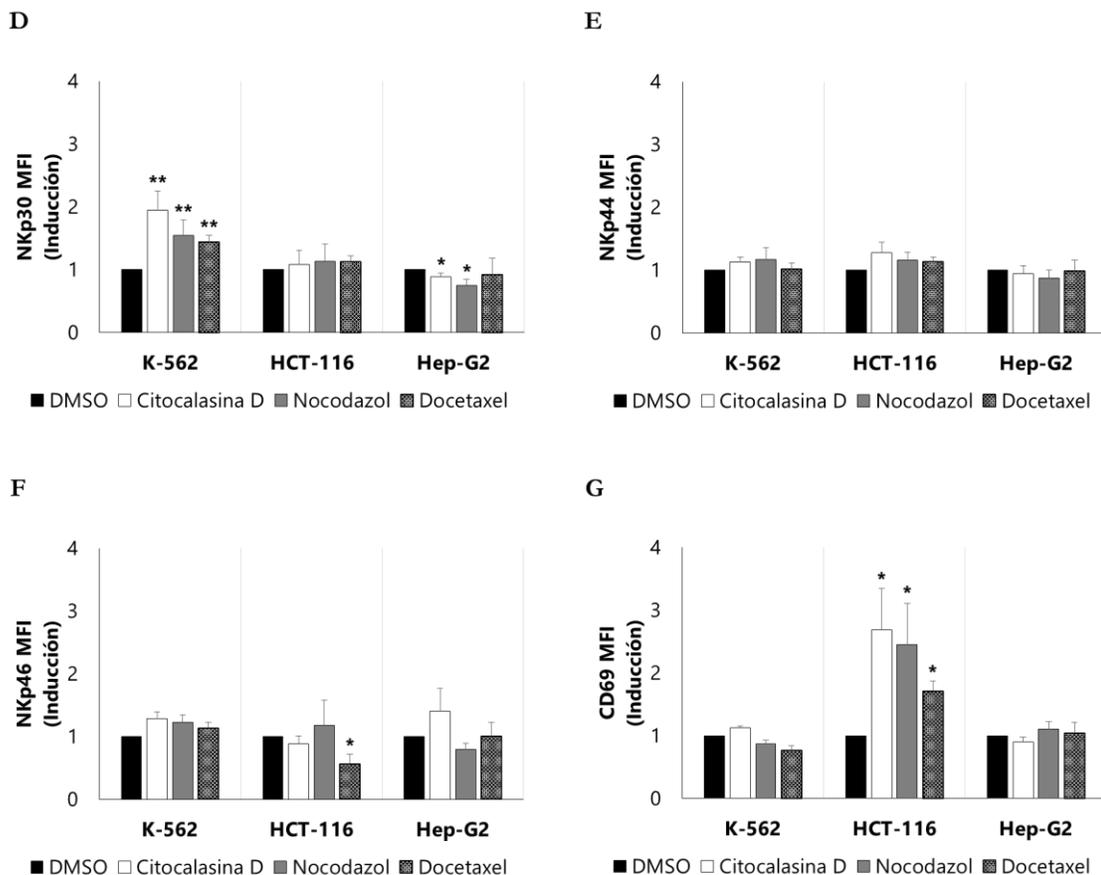


**Figura IV.8** Las células tumorales hiperploides son más susceptibles a la lisis mediada por células NK de forma dependiente de NKG2D y DNAM-1. Células tumorales hiperploides inducidas con citocalasina D y células control fueron expuestas a células de la línea NKL a diferentes ratios (A) o a células NKL pre-incubadas con anti-NKG2D y/o anti-DNAM-1 (B) o pre-incubadas con anti-NKp30 (C). Los resultados muestran la lisis específica de, al menos, 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U-Mann Whitney.

La relevancia del papel de NKG2D y DNAM-1 en la activación de las células NK en respuesta a la poliploidia tumoral se puso también de manifiesto en experimentos de co-cultivo en los que células NK policlonales se pusieron en contacto con células tumorales poliploides con el objetivo de analizar la expresión de algunos receptores activadores presentes en la superficie de las células NK. Como se puede observar en la figura IV.9, la presencia de células tumorales hiperploides en el medio de cultivo es capaz de modular el inmunofenotipo de las células NK incrementando significativamente los niveles de NKG2D, DNAM-1 y NKp30, siendo NKG2D el receptor que sufre un mayor incremento con la línea celular K-562 tratada con las 3 drogas antimetabólicas (~2,3-veces de inducción,  $p < 0,01$ ). Sin embargo, los niveles de NKp44 y NKp46 no

mostraron cambios significativos; mientras que la molécula activadora CD69 solo se incrementó en las células NK co-cultivadas con la línea HCT-116 tratada con los 3 fármacos (Fig.IV.9).





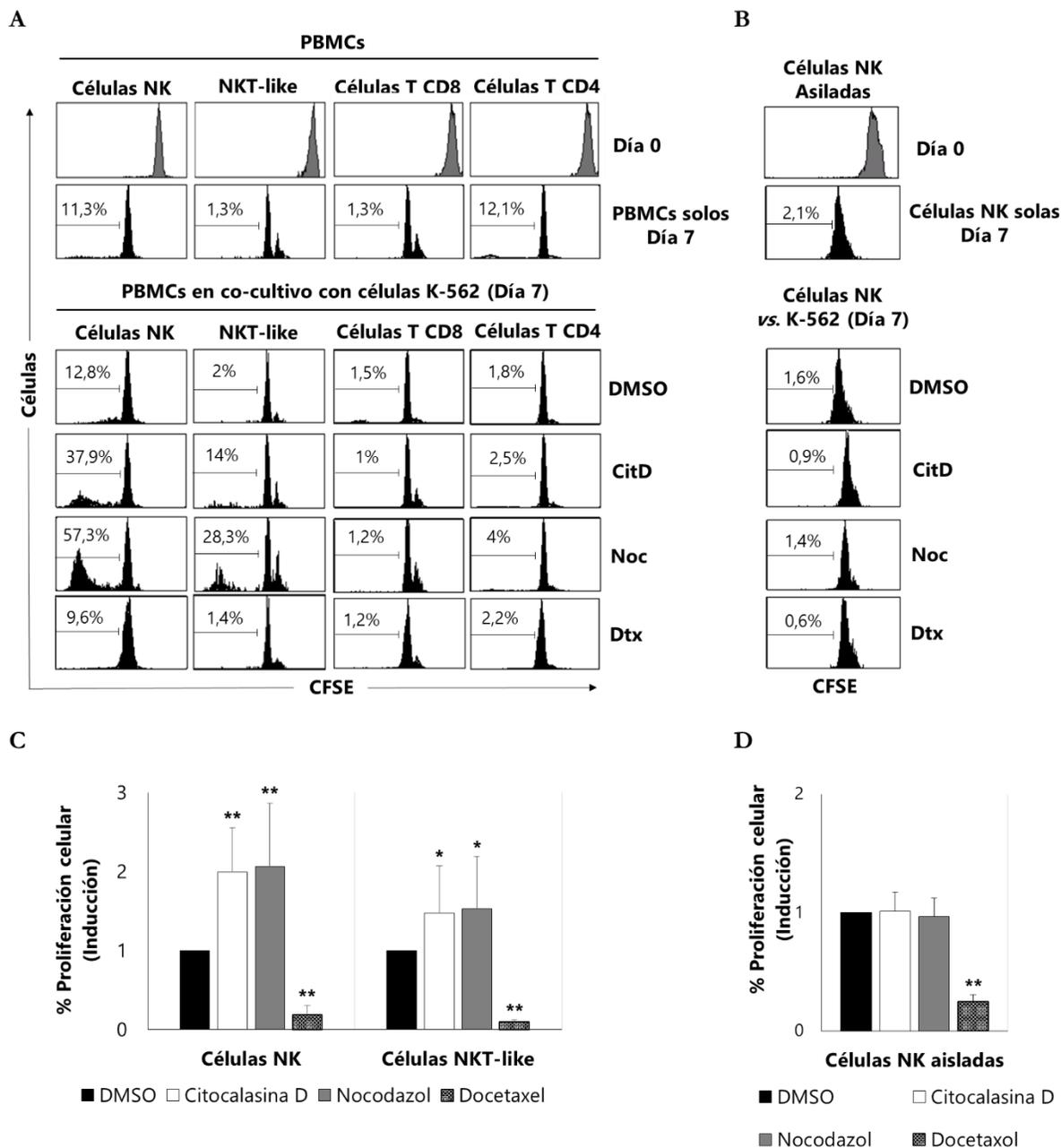
**Figura IV.9 La exposición a células poliploides modula el fenotipo de las células NK.** Células NK purificadas de a partir de PBMCs de donantes sanos (n=4) fueron cultivadas en presencia de IL-2 durante 5 días antes de ser enfrentadas 48 horas a células K-562 tratadas o no con citocalasina D, nocodazol o docetaxel. Posteriormente se evaluó la expresión en membrana de los receptores activadores NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp44 y NKp46, además de la molécula activadora CD69 en las células NK (CD3<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup>) mediante citometría de flujo. **A.** Histogramas representativos de la expresión de los receptores activadores en la línea K-562. **B-G.** Los gráficos de barras representan la media y la desviación típica de al menos 3 experimentos independientes (\*p<0,05 y \*\*p<0,01). Test U Mann-Whitney.

### La interacción con células tumorales hiperploides estimula la proliferación de células NK a través de la activación de los linfocitos T CD4

El siguiente análisis que se llevó a cabo fue para determinar el efecto de la poliploidía tumoral sobre la proliferación de las poblaciones inmunes. Con esta finalidad, PBMCs procedentes de donantes sanos fueron marcados con CFSE y posteriormente co-cultivados con células tumorales pre-tratadas con las drogas antimitóticas o DMSO. Tras 7 días de cultivo, se determinó la proliferación analizando la fluorescencia del CFSE en las subpoblaciones inmunes de interés.

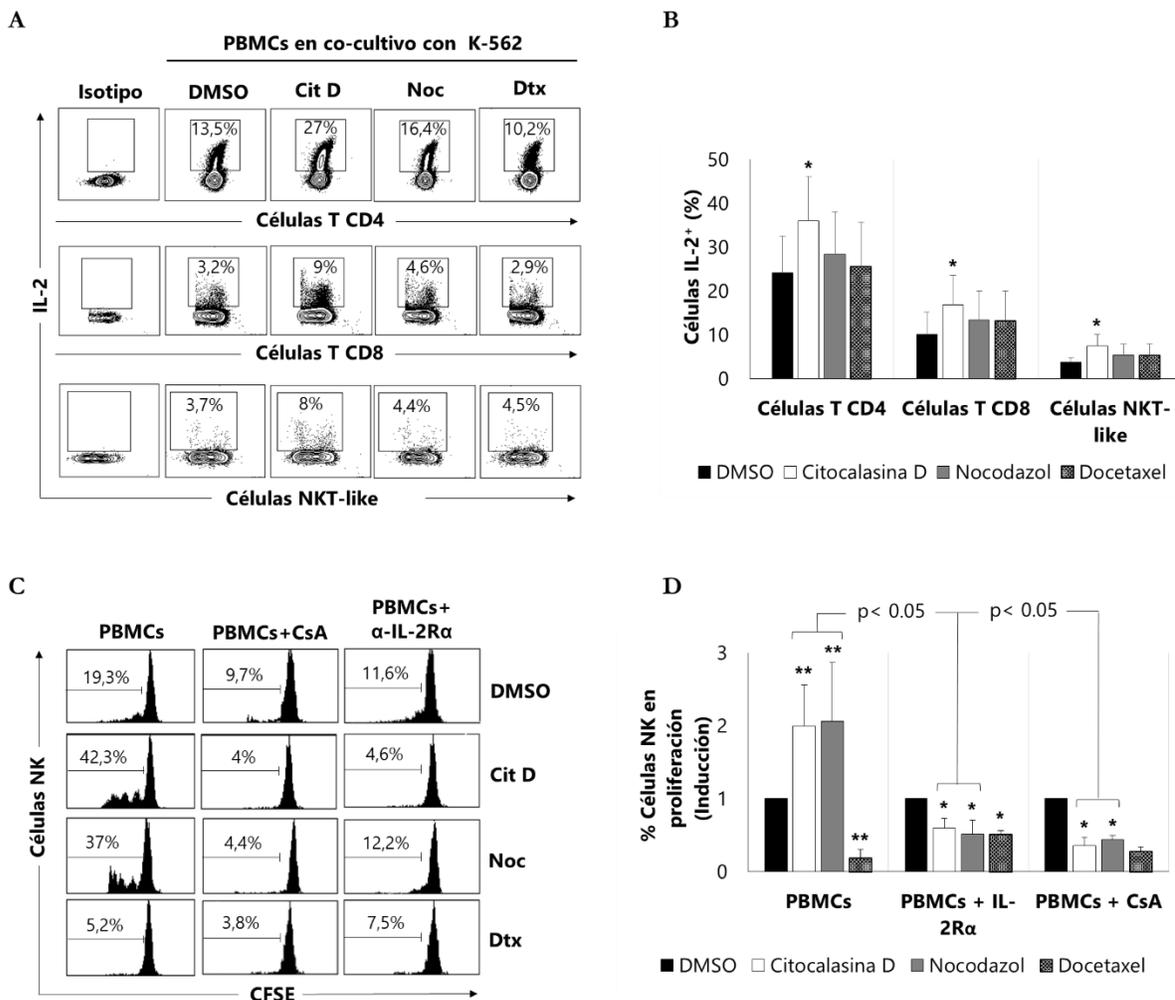
El co-cultivo con células K-562 expuestas a citocalasina D o nocodazol, pero no a docetaxel, incrementó de manera significativa la proliferación de células NK y células NKT-like; sin embargo no se observó ningún cambio en la proliferación de linfocitos T CD8 y CD4 (Fig.IV.10A y C).

Para determinar el mecanismo de acción implicado, se estudió si la inducción de la proliferación de las células NK era debida a un efecto directo o era secundaria a la activación de otra subpoblación de células inmunológicas. Cabe destacar que, cuando se usaron en los experimentos células NK purificadas (eliminando linfocitos T CD4, CD8 y resto de células presentes en los PBMCs mediante selección negativa) éstas no proliferaban, sugiriendo que el efecto que ejercen las células tumorales hiperploides sobre la proliferación de las células NK es indirecto y dependiente de alguna otra subpoblación inmune (Fig.IV.10B y D).



**Figura IV.10 Efecto de las células tumorales hiperploides sobre la proliferación de las subpoblaciones inmunes.** PBMCs (n=6) o células NK aisladas (n=4) de los mismos donantes fueron marcadas con CFSE y enfrentadas a células K-562 hiperploides o a la línea sin tratar durante 7 días. La cuantificación del CFSE en células NK, células NKT-like, linfocitos T CD8 y CD4 fue analizada en los días 0 y 7 mediante citometría de flujo. Citometría de flujo representativa de un experimento llevado a cabo con PBMCs (A) y células NK aisladas (B) procedentes del mismo donante. Los gráficos representan la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto al porcentaje de células NK (CD3-CD56+) y NKT-like (CD3+CD8+CD56+) en proliferación obtenidas a partir de PBMCs (C) o células NK aisladas (D). (\*p<0,05 y \*\*p<0,01). Test U Mann-Whitney.

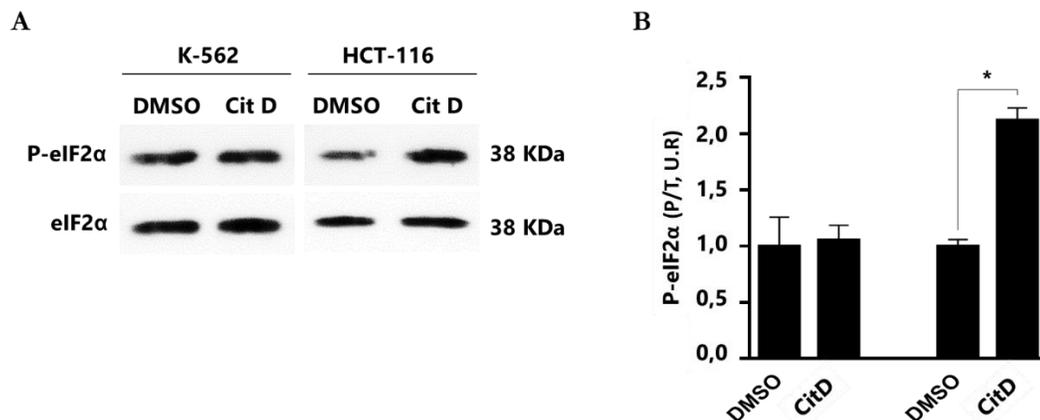
Dado que la IL-2 es una citocina clave en la proliferación y maduración de las células NK, nos propusimos analizar el efecto que ejercían las células tumorales hiperploides sobre la producción de IL-2. Observamos, que las células K-562 tratadas con citocalasina D o nocodazol eran capaces de estimular a los linfocitos T CD4 para que sintetizasen una mayor cantidad de IL-2. En menor medida, este efecto también se observó en los linfocitos T CD8 y células NKT-like, pero no en las células NK (dato no mostrado) (Fig.IV.11A y B). Además, el bloqueo del receptor de la IL-2 con un anticuerpo bloqueante o mediante el uso de ciclosporina A (una droga inmunosupresora que inhibe la producción de IL-2) redujo drásticamente la proliferación de las células NK, regresando a los niveles basales (Fig.IV.11C y D) e indicando que la secreción de IL-2, producida principalmente por los linfocitos CD4, es imprescindible para la expansión clonal de células NK.



**Figura IV.11 La inducción de poliploidía mediante agentes quimioterápicos estimula la producción de IL-2 en los linfocitos T CD4 y desencadena la proliferación de células NK.** PBMCs procedentes de donantes sanos (n=4) fueron co-cultivados con células K-562 tratadas con citocalasina D, nocodazol o docetaxel y, posteriormente, se analizó la expresión de IL-2 intracelular en las diferentes subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo. **A.** Dot-plots representativos en los que se muestra el porcentaje de linfocitos T CD4, CD8 y NKT-like productores de IL-2. **B.** El gráfico muestra la media y la desviación típica del porcentaje de células positivas para IL-2 (\*p<0,05). Test U de Mann-Whitney. **C.** PBMCs de donantes sanos (n=4) fueron marcados con CFSE y enfrentados a células hiperploides o células control de la línea K-562 en presencia o ausencia de CsA (1µM) o de un anticuerpo bloqueante contra la fracción  $\alpha$  del receptor de IL-2 (anti-IL-2R $\alpha$ , 15µg/ml) durante 7 días. La cuantificación del CFSE en células NK fue analizada en los días 0 y 7 mediante citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de uno de los experimentos. **D.** El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto al control del porcentaje de células NK (CD3-CD56+) en proliferación (\*p<0,05 y \*\*p<0,01). Test U Mann-Whitney.

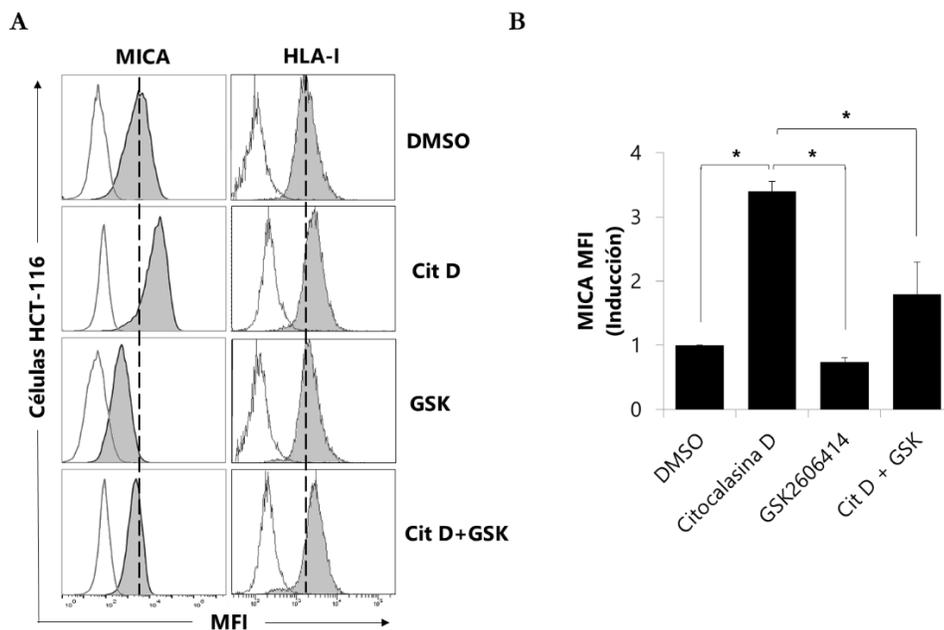
### Las vías de estrés celular están implicadas en la inducción de MICA en células tumorales poliploides

Por último, se estudiaron los mecanismos moleculares implicados en la regulación de MICA durante el proceso de poliploidización celular. Las células hiperploides se caracterizan por poseer un elevado nivel de estrés del RE (medido a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$ ) y éste ha sido implicado en la inducción de la expresión de CTR en dichas células (Senovilla, Vitale, et al., 2012). En consonancia con los datos publicados, se observó un aumento de la cantidad de eIF2 $\alpha$  fosforilado en células HCT-116 tratadas con citocalasina D respecto a las células control, sin embargo no se detectaron cambios en los niveles de fosforilación de eIF2 $\alpha$  en las células K-562 sugiriendo que, en esta línea celular, el estrés del RE no estaría implicado en la regulación de MICA (Fig.IV.12).



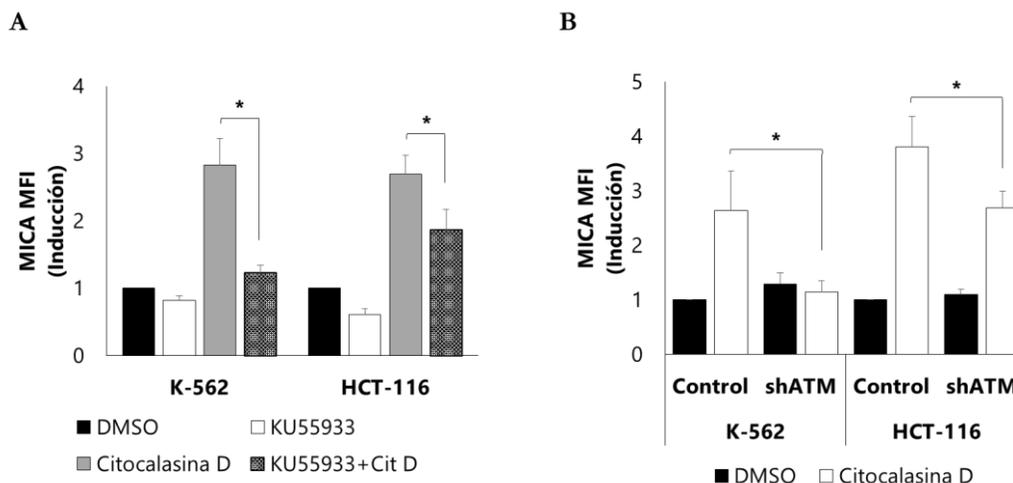
**Figura IV.12 Cuantificación de estrés del RE.** **A.** Células K-562 y HCT-116 fueron expuestas a citocalasina D (0,6  $\mu$ g/ml) durante 48 horas y posteriormente se determinaron los niveles de eIF2 $\alpha$  total y fosforilado (Ser51) mediante western-blot. **B.** El grafico de barras muestra la cuantificación de eIF2 $\alpha$  fosforilado (U. R – Unidades Relativas) realizada en 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Para profundizar en la relevancia que pudiera tener la respuesta al estrés del RE en la sobreexpresión de los ligandos activadores en células tumorales poliploides, células HCT-116 fueron tratadas con un inhibidor específico de la quinasa PERK (GSK2606414) (Axten et al., 2012) y seguidamente se evaluó la expresión de MICA mediante citometría de flujo. Lo primero que se observó fue que el tratamiento con GSK2606414 (GSK) reducía los niveles de eIF2 $\alpha$  fosforilado tras la exposición a citocalasina D (Fig.IV.S4.A y B), y como era de esperar, esto se traducía en una disminución de la expresión de MICA (Fig.IV.13). Llamativamente, los niveles de la molécula HLA-I en superficie no sufrieron cambios debidos al tratamiento, lo que apoya la especificidad del efecto observado sobre MICA tras la inhibición de PERK (Fig.IV.13A). Además, el tratamiento con salubrinal, un inhibidor de la defosforilación de eIF2 $\alpha$  y protector del estrés del RE (Boyce et al., 2005), también resulta en una disminución de la expresión de MICA en presencia de citocalasina D (Fig.IV.S4.C).



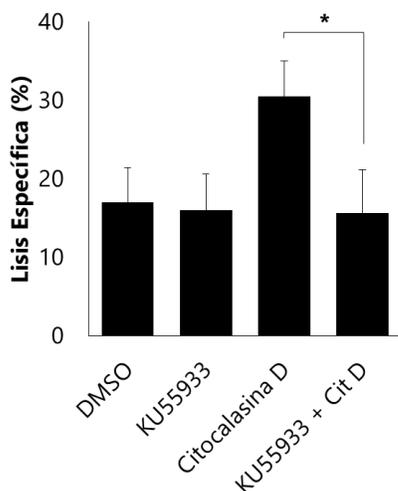
**Figura IV.13 La respuesta celular al estrés del RE está involucrada en la regulación de MICA.** Células HCT-116 fueron tratadas con un inhibidor específico de la quinasa PERK (GSK, 1 $\mu$ M) durante 2 horas antes de inducir hiperploidía con citocalasina D, tras lo cual se analizó la presencia de MICA y HLA-I en la superficie celular. **A.** Citometría de flujo representativa. **B.** Los resultados se presentan como la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto a la MFI del control de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Por otro lado, las células poliploides se caracterizan por presentar una gran inestabilidad genómica que tiene como consecuencia la activación de respuestas al daño en el DNA (*DNA damage response* – DDR). La DDR, a través de la activación de las quinasas ATM y PI3K, es uno de los mecanismos más relevantes y mejor caracterizados que participan en la regulación de los ligandos de NKG2D (Cerboni et al., 2014). El tratamiento de las células K-562 con LY-294002, un inhibidor específico de PI3K, no tuvo ningún efecto sobre la expresión de MICA (Fig.IV.S5.A). Sin embargo, la presencia de KU55933, un inhibidor de la quinasa ATM, inhibe por completo la inducción de MICA tras la exposición a citocalasina D, tanto en células K-562 como en HCT-116 (Fig.IV.14A). De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, la reducción de la expresión del gen *ATM* mediante transfección con un plásmido que expresa un shRNA específico, atenúa la inducción de MICA tras el tratamiento con citocalasina D en ambos modelos celulares (Fig.IV.14B y IV.S5.B).



**Figura IV.14 La respuesta al daño en el DNA es clave en la regulación de MICA. A.** Células K-562 y HCT-116 fueron tratadas con un inhibidor específico de ATM (KU55933, 10 $\mu$ M) durante 1 hora antes de inducir hiperploidía con citocalasina D, tras lo cual se analizó la presencia de MICA en la superficie celular. E gráfico de barras muestra la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto a la MFI del control de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney. **B.** Células K-562 y HCT-116 fueron transfectadas con un plásmido que expresa un shRNA específico para el gen *ATM* o con el plásmido control, tras lo cual se analizó la presencia de MICA en la superficie celular. Los resultados se representan como la media y la desviación típica de la inducción observada con respecto a la MFI del control de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Por último, la inhibición farmacológica de ATM en células tumorales tratadas con citocalasina D también redujo drásticamente la lisis mediada por células NK, revelando que ATM tiene un papel clave en la inducción de la inmunogenicidad observada en las células tumorales hiperploides.



**Figura IV.14.** Células K-562 fueron tratadas con KU55933, como se detalló anteriormente, y enfrentadas a células NKL (ratio NKL:K-562, 10:1) durante 4 horas. La actividad citotóxica de las células NKL fue evaluada mediante citometría de flujo. El gráfico muestra la media y la desviación típica del porcentaje de lisis específica (n=4) (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran como la DDR, y en determinados modelos celulares la respuesta al estrés del RE, están involucradas en la regulación de la expresión de MICA y, por consiguiente, en el incremento de la susceptibilidad de las células hiperploides a la lisis mediada por células NK.

## DISCUSIÓN

La poliploidía celular es un evento que ocurre frecuentemente en los primeros estadios del cáncer (Davoli & de Lange, 2011; Gordon et al., 2012). Los mecanismos de control del ciclo celular juegan un papel clave en el mantenimiento de la integridad genómica durante la mitosis, pero cuando estos mecanismo fallan se pueden producir fenómenos de poliploidización celular que finalmente darían lugar a células tumorales aneuploides, las cuales pueden adquirir una serie de ventajas adaptativas que contribuyen a la progresión del cáncer.

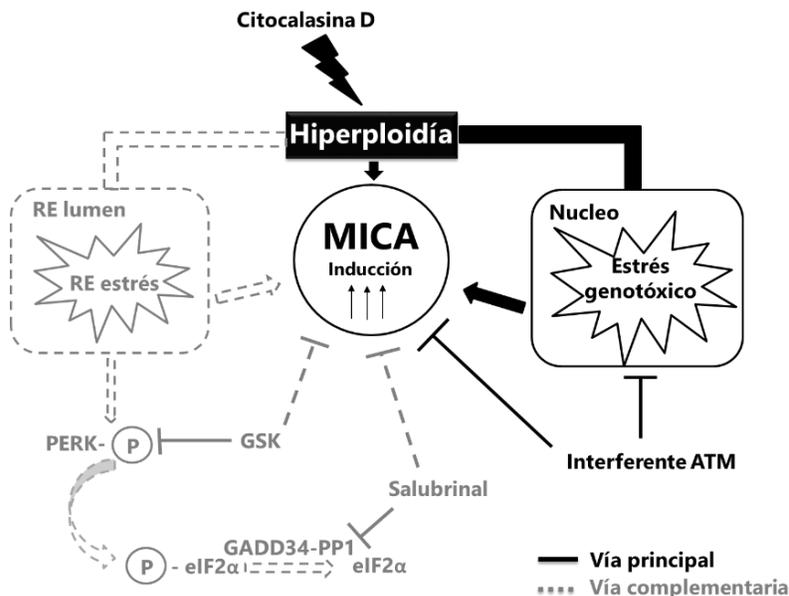
Recientemente, ha sido descrito que la ploidía celular está sujeta a un control extrínseco por parte del sistema inmunitario, el cuál eliminaría las células hiperploides a través de la activación de una respuesta antitumoral mediada por linfocitos T (Senovilla, Vitale, et al., 2012). En nuestro estudio, mostramos como la inducción de hiperploidía es, a su vez, capaz de estimular la inmunovigilancia del cáncer mediada por células NK y que existe una colaboración entre los linfocitos T y las células NK en la generación de una respuesta inmune antitumoral.

La activación de las células NK en respuesta a la inducción farmacológica de hiperploidía en células tumorales no está asociada con la perdida de ligandos de los receptores inhibitorios, como las moléculas HLA-I, lo que sugiere que los receptores inhibitorios, como los KIR, no estarían implicados en esta respuesta. Por el contrario, las células tumorales poliploides muestran un incremento significativo de la expresión de los ligandos de los receptores activadores de células NK, particularmente de NKG2D y DNAM-1. En consonancia, hemos demostrado que la expresión de MICA, ULBP2, PVR y nectina-2 se correlaciona positivamente con el contenido de DNA de la célula, proporcionando una fuerte unión entre poliploidía tumoral y las respuestas antitumorales mediadas por células NK. Merece la pena mencionar, que las células K-562 carecen de moléculas HLA-I y HLA-II en su superficie (Lisovsky, Isitman, Bruneau, & Bernard, 2015) lo cual, no haría posible que la respuesta inmune observada fuese debida a fenómenos de alorreactividad contra antígenos MHC expresados en las células tumorales.

Adicionalmente, se ha observado que el co-cultivo con células tumorales hiperploides induce la expresión de NKG2D y DNAM-1 en las propias células NK, lo que sugiere que estos receptores desempeñan un papel clave en la inmunovigilancia de estas variantes tumorales. La relevancia de estos receptores en la respuesta citotóxica mediada por las células NK contra las

células tumorales poliploides se puso de manifiesto en experimentos llevados a cabo con anticuerpos bloqueantes. En conjunto, hemos descrito que, adicionalmente a los oncogenes, la progresión tumoral y las señales proliferativas y de estrés celular (Iannello et al., 2013; Jung et al., 2012; Lopez-Soto, Huergo-Zapico, et al., 2013; Lopez-Soto, Zapico, Acebes-Huerta, Rodrigo, & Gonzalez, 2013; Spies, 2008), la expresión de los ligandos de NKG2D en cáncer también está regulada por la hiperploidía celular.

Las células hiperploides se caracterizan por presentar una gran inestabilidad genómica que tiene como consecuencia la activación de la DDR. El estrés genotóxico es uno de los principales mecanismos que regulan la expresión de los ligandos de NKG2D a través de la activación de ATM/ATR (Carboni et al., 2014; Chow & Poon, 2010; Gasser et al., 2005). Nuestros resultados muestran como la inhibición genética y farmacológica de ATM reduce drásticamente la expresión de MICA, indicando claramente que la DDR está involucrada en la regulación de este ligando de NKG2D tras la inducción farmacológica de hiperploidía en cáncer. Igualmente, describimos que la respuesta al estrés en el RE es un mecanismo complementario a DDR que se encuentra activo en determinados modelos celulares y que contribuye a que estas variantes tumorales sean más inmunogénicas y, por tanto, más fácilmente reconocibles y eliminadas por las células NK. Esta observación se suma a recientes investigaciones que muestran como el estrés del RE desencadena la exposición de CRT en la superficie celular provocando el reconocimiento de las células tumorales hiperploides por parte de las DCs que, finalmente, activan una respuesta inmunitaria contra el tumor mediada por linfocitos T citotóxicos (Kepp et al., 2013; Senovilla, Vitale, et al., 2012). Basándonos en los resultados que hemos obtenido, proponemos un modelo hipotético de regulación de MICA en las células tumorales hiperploides generadas con citocalasina D. (Fig.IV.15)



**Figura IV.15 Modelo hipotético de regulación de MICA durante la hiperploidía tumoral inducida por citocalasina D.** Las células tumorales poliploides se caracterizan por presentar un elevado nivel de inestabilidad genómica que activa la DDR (vía principal de regulación). Así mismo, en ciertos modelos celulares, la adquisición de hiperploidía está asociada con un incremento del estrés del RE (vía complementaria de regulación)

Además, nuestro estudio revela que existe un efecto cooperativo entre linfocitos T y células NK en la inmunovigilancia de la poliploidía en cáncer. El co-cultivo de células tumorales hiperploides con poblaciones del sistema inmune induce significativamente la producción de IL-2 mayoritariamente por los linfocitos T CD4, lo que finalmente se traduce en un incremento de la proliferación de células NK (Henney, Kuribayashi, Kern, & Gillis, 1981; Tsavaris, Kosmas, Vadiaka, Kanelopoulos, & Boulamatsis, 2002). En consecuencia, el bloqueo de la secreción de IL-2, inhibió por completo la proliferación de las células NK, indicando que los linfocitos T tienen un papel clave en este proceso. Nuestros resultados apoyan las observaciones clínicas que muestran como el tratamiento con taxanos incrementa la cantidad de IL-2 en el suero y activa la proliferación de células NK en pacientes de cáncer de mama en estado avanzado (Tsavaris et al., 2002). Sin embargo, el hecho de que los linfocitos T CD4 muestren un fenotipo más activo (mayor producción de IL-2) en ausencia de proliferación, pone de manifiesto la complejidad de este sistema. Se sabe que la tetraploidización incrementa la exposición de CRT en la superficie de los tumores, dicha proteína actúa como una señal “cómeme” que es reconocida por el receptor CD91 presente en la superficie de las APCs. La activación parcial de los linfocitos T CD4 podría deberse

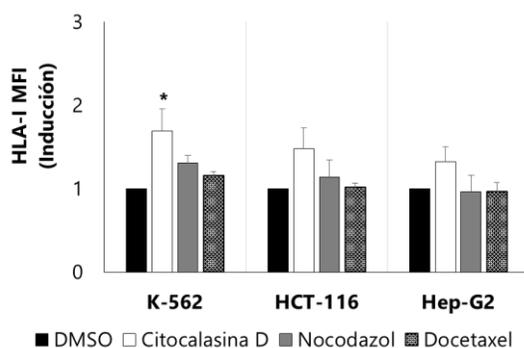
al reconocimiento de antígenos tumorales específicos presentados por DCs o macrófagos presentes en los PBMCs del cultivo.

A pesar del hecho de que el cáncer se ha considerado una entidad inmunológicamente silenciosa durante décadas, en la actualidad es indiscutible que el sistema inmune tiene un papel fundamental en la lucha contra el cáncer (Dunn et al., 2004a). Las características de las células tumorales que las hacen distinguibles de las células sanas y así, reconocibles por el sistema inmune tienen un interés cada vez más creciente en la investigación oncológica. La adquisición de un número anormal de cromosomas es una de esas características, en la cual aumenta la inmunogenicidad de los tumores poniendo en marcha una respuesta antitumoral mediada por los linfocitos T que son capaces de reconocer antígenos tumorales específicos (Chaput et al., 2007; Obeid et al., 2007; Senovilla, Galluzzi, Castedo, & Kroemer, 2013). Consecuentemente, los tumores hiperploides formados en ratones inmunocompetentes exhiben un tamaño nuclear más pequeño y un menor contenido genómico que aquellos que se desarrollan en ratones inmunodeprimidos (Senovilla, Vitale, et al., 2012).

Nuestro estudio amplía estas observaciones demostrando que las células NK también estarían implicadas en esta respuesta antitumoral, detectando moléculas de peligro o inducibles por estrés (como son, por ejemplo, los ligandos de NKG2D y DNAM-1) altamente sobre-expresadas en la superficie de las células tumorales hiperploides.

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

Figura IV. S1



**Figura IV.S1 Expresión de HLA-I en células tumorales tratadas con agentes inductores de hiperploidía celular.** Las líneas tumorales K-562, HCT-116 y Hep-G2 fueron tratadas con citocalasina D, nocodazol y docetaxel durante 48 horas y, posteriormente, se evaluó la expresión en membrana de HLA-I mediante citometría de flujo. El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción de MFI de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Figura IV. S2

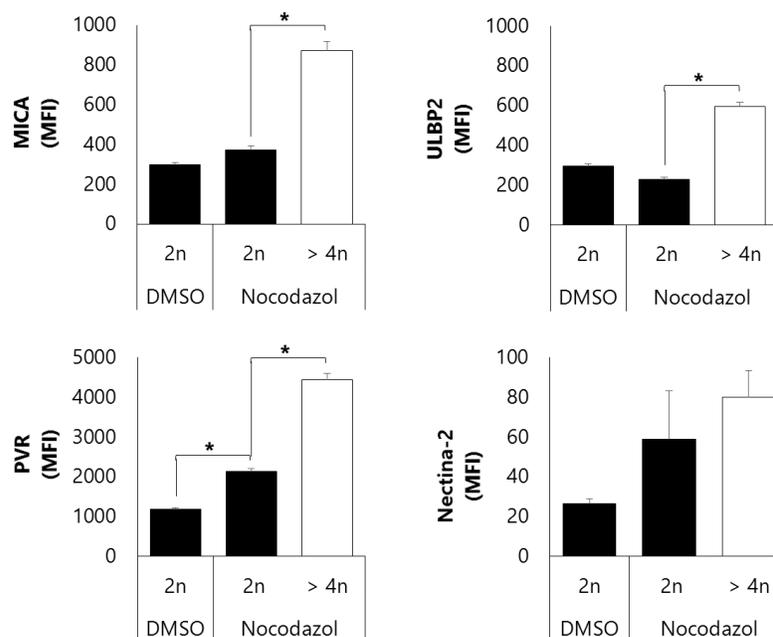


Figura IV.S2 Expresión de los ligandos activadores en relación a la ploidía celular. El contenido de DNA y la expresión en membrana de MICA, ULBP2, PVR y Nectina-2 se analizó de forma simultánea en células de la línea tumoral HCT-116 tratadas con nocodazol mediante citometría de flujo. Los gráficos representan las medias y las desviaciones típicas de la MFI de dichos ligandos en células diploides (2n) *vs.* poliploides (>4n) de al menos 3 experimentos independientes (\*p<0,05). Test U de Mann-Whitney.

Figura IV.S3

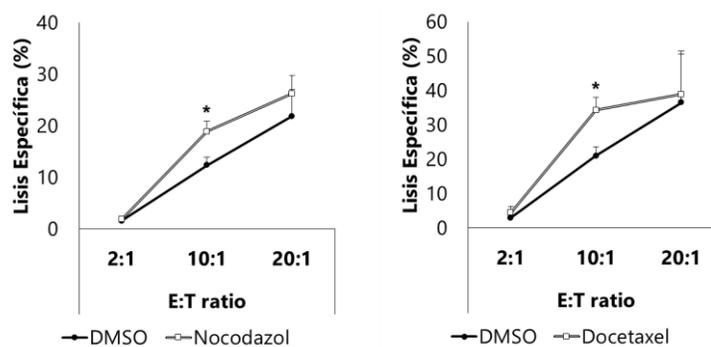
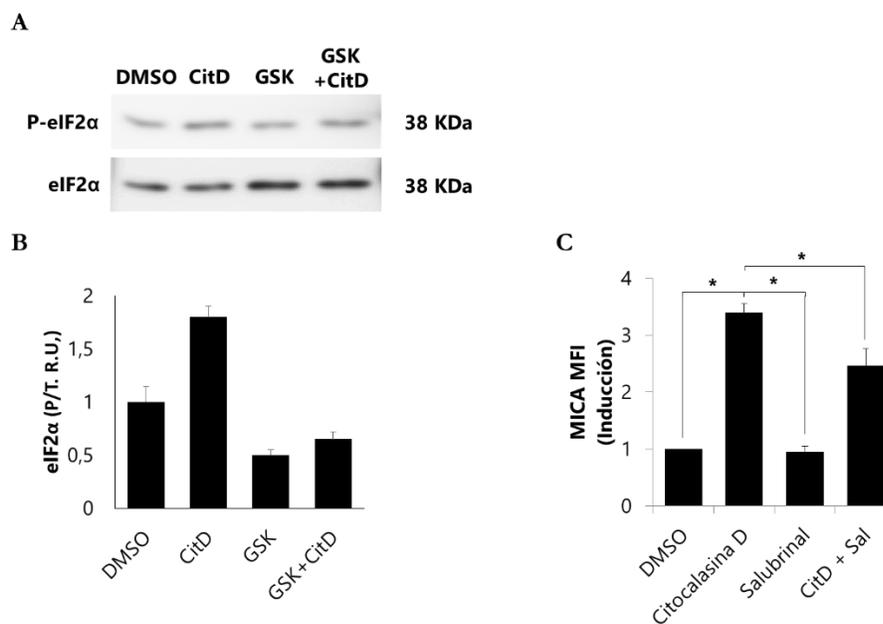


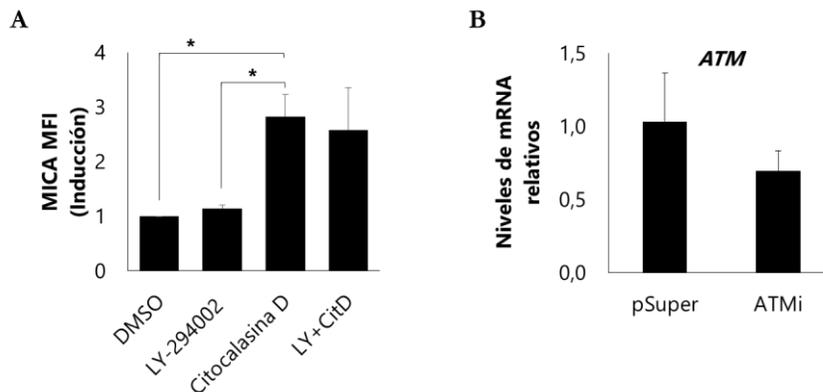
Figura IV.S3 Las células HepG2 tratadas con nocodazol o docetaxel son más susceptibles a la lisis mediada por células NK. Células tumorales Hep-G2 tratadas con nocodazol o docetaxel y células control fueron expuestas a células NK (línea NKL) a diferentes ratios. Los resultados muestran la lisis específica de, al menos, 3 experimentos independientes (\*p<0,05). Test U-Mann Whitney.

Figura IV. S4



**Figura IV.11 Cuantificación de estrés del RE.** **A.** Células HCT-116 fueron expuestas a GSK2606414 (1  $\mu$ M) en combinación con citocalasina D (0,6  $\mu$ g/ml) durante 48 horas y posteriormente se determinaron los niveles de eIF2 $\alpha$  total y fosforilado (Ser51) mediante western-blot. **B.** El gráfico de barras muestra la cuantificación de eIF2 $\alpha$  fosforilado (U. R – Unidades Relativas) realizada en 2 experimentos independientes. **C.** Células HCT-116 fueron tratadas con salubrinal dos horas antes de inducir la hiperploidía con citocalasina D y posteriormente se determinó la presencia de MICA en la superficie celular. El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción de MFI de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney.

Figura IV.S5



**Figura IV.S5. A.** Células HCT-116 fueron tratadas con LY-294002 durante 2 horas antes de inducir hiperploidía con citocalasina D y posteriormente se determinó la presencia de MICA en la superficie celular mediante citometría de flujo. El gráfico representa la media y la desviación típica de la inducción de MFI de al menos 3 experimentos independientes (\* $p < 0,05$ ). Test U de Mann-Whitney. **B.** La expresión relativa de *ATM* fue evaluada mediante qPCR en células K-562 transfectadas con el vector pSuper.*ATM* o el vector vacío. El gráfico de barras representa el nivel de mRNA de *ATM* relativo a la expresión de *GAPDH*.



# **CAPÍTULO V**

*DISCUSIÓN GENERAL*

## CONSIDERACIONES INICIALES

Durante la realización del proyecto de investigación que compone esta tesis hemos estudiado diferentes estrategias para inducir la actividad de las células NK en el contexto del cáncer. Además, hemos tratado de profundizar en los mecanismos que subyacen al papel de estos mediadores celulares en los diferentes procesos tumorales estudiados.

Los capítulos III y IV, donde se incluyen los resultados experimentales, vienen acompañados de la correspondiente discusión detallada acerca de los resultados obtenidos en cada uno de los temas. Por tanto, este capítulo será dedicado a dar una visión global de los resultados más destacados de este estudio, poniendo de manifiesto la relación existente entre los diversos temas que se tratan en esta tesis doctoral.

## DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Como ya hemos explicado en la introducción, los tumores poseen una serie de mecanismos de evasión para eludir la respuesta inmune y continuar progresando en un entorno inmunológicamente competente (Dunn et al., 2004a; Hanahan & Weinberg, 2011). Se ha hablado mucho sobre la capacidad del sistema inmune de “esculpir” el carácter inmunogénico del tumor pero, ¿cuáles son los efectos represivos que tiene el tumor sobre el sistema inmune? y ¿cómo podemos revertirlos? En pacientes con tumores sólidos o cánceres hematológicos en estadios avanzados, se observan numerosos mecanismos de evasión desarrollados por las células transformadas para contrarrestar la respuesta del sistema inmunológico. Algunos de estos mecanismos afectan a la función de las células NK y, particularmente, a la respuesta mediada por el receptor NKG2D. Conocer cuáles son estos sistemas de evasión, cómo se producen y cómo afectan a la evolución de la enfermedad es clave para seleccionar tratamientos o para diseñar terapias dirigidas a restablecer la capacidad del sistema inmune de eliminar el cáncer.

De entre los componentes del sistema inmune, los linfocitos T y las células NK quizás sean las células efectoras más importantes en la respuesta antitumoral. Los linfocitos T reconocen antígenos tumorales presentados, en el contexto de las moléculas HLA, por DCs o macrófagos

que acuden en primer lugar al foco tumoral. Sin embargo, las células NK poseen otros mecanismos de actuación, ya que son capaces de reconocer determinados cambios que sufren las células durante la transformación tumoral. Uno de estos mecanismos de acción se basa en reconocer ciertas moléculas que se expresan en situaciones de “peligro” en la superficie de las células transformadas. Dichas moléculas son capaces de activar a las células NK a través de la unión con su receptor. Uno de los receptores activadores mejor caracterizado y de mayor relevancia en la inmunovigilancia del cáncer es NKG2D (Guerra et al., 2008; Smyth, Swann, et al., 2005). Este receptor, presente no sólo en las células NK, sino también en los linfocitos T  $\alpha\beta$  CD8, en linfocitos T  $\gamma\delta$ , en células NKT-like y en algunos linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4, es capaz de reconocer dos familias de ligandos expresados en la superficie de las células tumorales. Estos ligandos, denominados MICA, MICB y ULBP1-6, se sobre-expresan habitualmente en las células transformadas, pero no en las sanas, y su unión a NKG2D activa la respuesta citotóxica (Bauer et al., 1999; Cosman et al., 2001; Das et al., 2001; Gonzalez, Lopez-Soto, Suarez-Alvarez, Lopez-Vazquez, & Lopez-Larrea, 2008; Lopez-Larrea, Suarez-Alvarez, Lopez-Soto, Lopez-Vazquez, & Gonzalez, 2008; Raulet, 2003). La ausencia de expresión de este receptor se ha asociado con un incremento en la incidencia del cáncer *in vivo*, lo que resalta su importancia en la respuesta inmunitaria antitumoral (Guerra et al., 2008).

En este contexto, existen numerosas evidencias que indican que la actividad antitumoral del sistema inmunitario tiene un papel terapéutico relevante en diversos tipos de cáncer y, en particular, en cánceres hematológicos. El objetivo de fondo que sustenta esta tesis fue estudiar los mecanismos que nos ayudan a mejorar la respuesta inmune frente al cáncer, especialmente aquellas estrategias que incrementen la activación de las células NK. Nuestro estudio ha empezado, por tanto, analizando el papel de la lenalidomida, que es un medicamento estimulador con efectos pleiotrópicos. Hemos estudiado la capacidad que tiene este medicamento de estimular la actividad antitumoral de las células NK y lo hemos analizado en el contexto de la LLC, que es una de las enfermedades en las que está aprobado su uso clínico. De todas maneras, consideramos que los principios y resultados obtenidos pueden ser extrapolados, en cierta medida, a otros tipos de cáncer.

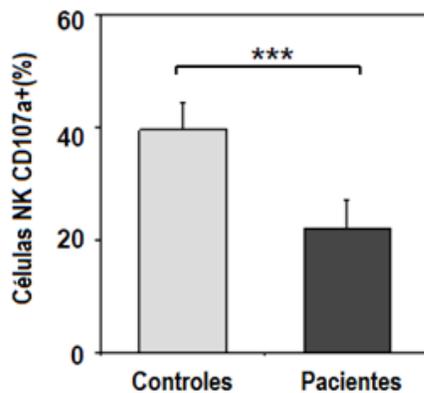
El papel del sistema inmunológico en el control de la LLC ha sido ampliamente estudiado en el pasado, pero es en los últimos años cuando la inmunoterapia ha cobrado gran protagonismo para afrontar el tratamiento. En la actualidad, el único tratamiento curativo que se conoce es el

trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos. Su efecto terapéutico se debe principalmente a la capacidad de las células inmunológicas del injerto, fundamentalmente linfocitos T y NK, de eliminar las células leucémicas gracias al llamado efecto “injerto contra leucemia” (GVHD - *Graft Versus Host Disease*-) (Sutton et al., 2011). También el uso de anticuerpos monoclonales, como el rituximab, y medicamentos inmunomoduladores, como la lenalidomida, están entre los tratamientos más prometedores en LLC y otros cánceres hematológicos, y su efectividad está basada en la estimulación de determinadas respuestas inmunológicas (Doubek & Smida, 2015; Eskelund et al., 2011; Gonzalez-Rodriguez et al., 2013).

Análisis previos realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto como los pacientes de LLC muestran un aumento en el número absoluto de linfocitos T CD8 y células NK en el diagnóstico de la enfermedad (Huergo-Zapico et al., 2014). El número absoluto de linfocitos es una variable clínica asociada al pronóstico de los pacientes en varios síndromes linfo- y mieloproliferativos. Un valor elevado de linfocitos (linfocitosis) ha sido observado en otros cánceres hematológicos, principalmente linfomas y mielomas, en los que se asocia a un aumento de la supervivencia global (De Angulo et al., 2008; Porrata et al., 2009; Ray-Coquard et al., 2009). En el caso de las células NK, a pesar de encontrarse significativamente aumentadas al diagnóstico, no se detectó ninguna correlación con la supervivencia o con otros marcadores pronósticos (Huergo-Zapico et al., 2014). Sin embargo, estudios previos en LLC asocian números absolutos elevados de esta población a un mayor tiempo libre de tratamiento (Palmer et al., 2008). Mientras que durante la progresión de la enfermedad los niveles de linfocitos T regresan a niveles normales, los niveles de células NK permanecen altos. Este fenómeno es coherente con las conclusiones de los trabajos publicados en los últimos años, en los que se hace referencia a la profunda desregulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T en LLC debido a que las células leucémicas, como consecuencia de la transformación tumoral, desarrollan una serie de mecanismos de evasión inmunológica que afectan a la función de los linfocitos T (Krackhardt et al., 2002; Ramsay et al., 2008). Recientemente, se ha descrito una serie de moléculas expresadas por las células leucémicas que, al unirse a sus receptores en los linfocitos T, producen cambios en la expresión génica de éstos. En último término, inhiben la capacidad de realizar sinapsis inmunológicas; bien sea con células leucémicas o con otras células presentadoras de antígenos. Algunas de estas moléculas son CD200, CD270, CD274, y CD276; y los cambios que inducen

afectan principalmente a la polimerización del esqueleto de actina y a la transducción de señales de TCR (Ramsay et al., 2008).

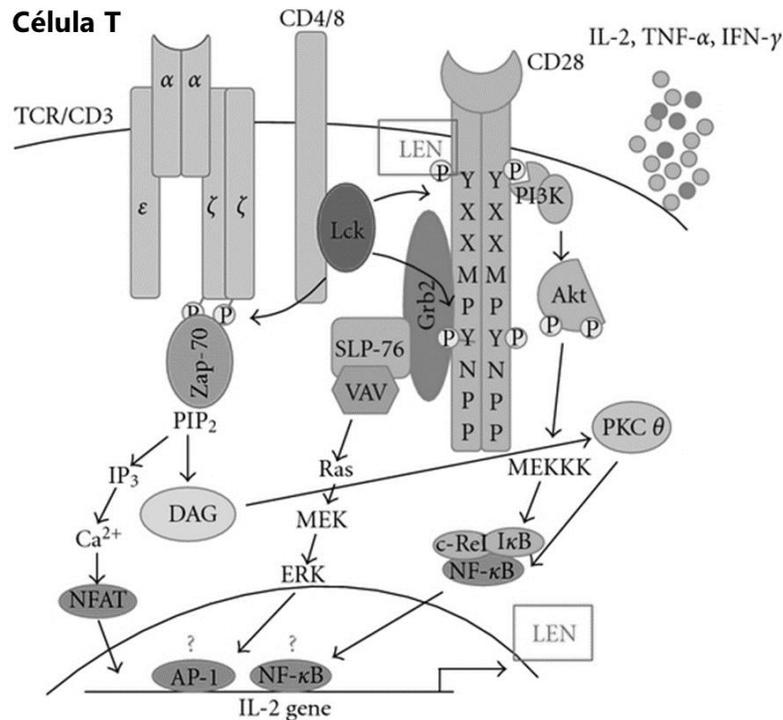
La habilidad de las células NK para responder ante el cáncer ha sido demostrada tanto *in vitro* e *in vivo* en numerosos estudios realizados en las últimas décadas (Costello, Fauriat, Sivori, Marcenaro, & Olive, 2004; Viel et al., 2013). Sin embargo, en pacientes de diversas neoplasias hematológicas se han descrito algunas alteraciones de estas células efectoras que podrían justificar el escape a la vigilancia del sistema inmune (Farnault, Sanchez, Baier, Le Treut, & Costello, 2012). NKG2D es uno de los receptores activadores con mayor importancia en la inmunovigilancia de los tumores, tanto sólidos como hematopoyéticos (Guerra et al., 2008). Cuando se analizó la expresión de este receptor en nuestro grupo de pacientes de LLC, observamos que se encontraba muy reducida con respecto a los donantes sanos y este hecho se correlacionaba con una menor actividad citotóxica de las células NK (Huergo-Zapico et al., 2014) (Figura V.1).



**Figura V.1 Actividad citotóxica de células NK de pacientes con LLC.** PBMCs de donantes sanos y pacientes fueron incubadas con células K-562 (ratio 5:1, NK:K-562) durante 4h. Tras la incubación se midió la expresión de CD107a en las células NK (CD3-CD56<sup>+</sup>) por citometría de flujo. Las barras representan la media y la desviación típica del porcentaje de células NK CD107a<sup>+</sup> (\*\*\*) p<0,001). Test U de Mann-Whitney. Extraído de *Huergo-Zapico et al., 2014*.

En línea con los resultados previos obtenidos por nuestro grupo de investigación, nos propusimos analizar si la lenalidomida podía restaurar la actividad del sistema inmunológico, en particular de las células NK, de pacientes de LLC. La lenalidomida es una droga inmunomoduladora que ha demostrado tener gran eficacia en el tratamiento de mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos (MSD), LLC y linfomas no-Hodgkin (NHL) (A. A. Chanan-Khan & Cheson, 2008). Además, este agente está siendo investigado también para el tratamiento de algunos tumores sólidos en los que se está probando su eficacia (Segler & Tsimberidou, 2012). Sin embargo, los mecanismos de acción por los que actúa aún no se conocen con exactitud. En concordancia con otros estudios, lo primero que observamos fue que la lenalidomida no ejercía

un efecto citotóxico directo sobre las células B leucémicas (A. A. Chanan-Khan et al., 2011), sino que la actividad antitumoral de la lenalidomida implicaba la activación de determinadas poblaciones inmunológicas, principalmente células NK, NKT-like y linfocitos T CD4. La lenalidomida actúa a diferentes niveles sobre el sistema inmunitario, modificando el perfil de producción de citocinas, regulando la co-estimulación de los linfocitos T y aumentando la citotoxicidad de células NK y NKT-like (A. A. Chanan-Khan et al., 2011). En nuestros estudios *ex vivo* hemos observado como la lenalidomida induce la proliferación de las células NK y NKT-like, así como de linfocitos T, siendo mayor dicho efecto en pacientes de LLC respecto a individuos sanos. Estos efectos de la lenalidomida son, principalmente, debidos al incremento de la producción de IL-2 en los linfocitos T, aunque en nuestro estudio no podemos descartar que la lenalidomida ejerza efectos directos sobre las células NK adicionales a los mediados por la IL-2. La activación de las células T requiere que haya reconocimiento de fragmentos peptídicos presentados por APCs a través de la interacción con su TCR, pero además, para generar una respuesta más efectiva contra el antígeno, son necesarias determinadas señales co-estimuladoras, como la unión de moléculas de la familia B7 presentes en las APCs con la molécula CD28 presente en la superficie de los linfocitos T. Esta interacción, promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de los linfocitos gracias a la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Harris & Ronchese, 1999). La lenalidomida es capaz de ejercer el efecto co-estimulador necesario para la activación de los linfocitos T en ausencia de APCs (Corral et al., 1999; LeBlanc et al., 2004), a través de una mayor actividad transcripcional de la proteína AP-1, uno de los factores clave en la producción de IL-2 (Schafer et al., 2003). De hecho, la lenalidomida actúa sobre los linfocitos T a través de la vía de señalización B7-CD28, induciendo directamente la fosforilación de CD28 y permitiendo de esta forma la activación de otras vías de señalización como PI3K y la translocación al núcleo del factor NFAT-2 que, en última instancia, incrementa la secreción de IL-2 en los linfocitos T (Hayashi et al., 2005; LeBlanc et al., 2004). Por otro lado, se sabe que la lenalidomida actúa también directamente sobre la vía de secreción de IL-2 a través de su unión a CRBN, el cual promueve el reclutamiento de los sustratos Ikaros (*IKZF1*) y Aiolos (*IKZF3*). ambos represores transcripcionales de la expresión de IL-2, hacia el complejo de ubiquitina ligasa E3 (compuesto por las proteínas CRBN, Rbx1, DDB1 y Cul4) permitiendo la ubiquitinación y degradación de dichos sustratos (Gandhi et al., 2014; Kronke et al., 2014) lo cual finalmente se traduce en un aumento de la producción de IL-2, en la activación de linfocitos T y células NK.



**Figura V.2 Vías de señalización de los linfocitos T controladas por la lenalidomida.** Tras la activación del TCR, la lenalidomida (LEN) incrementa la fosforilación de tirosinas en la cola intracitoplasmática de CD28 activando así, determinadas cascadas de señalización que implican la activación de PKC- $\theta$  y MAPK, permitiendo a su vez la activación de factores de transcripción clásicos de los linfocitos T como NFAT-1 y NF- $\kappa$ B que inducen la secreción de citocinas Th-1, como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Es objeto de controversia que los factores de transcripción se incrementen en última instancia bajo el tratamiento con lenalidomida, por ello, se indica en la figura con un signo de interrogación. La regulación positiva de estas vías de señalización revierten potencialmente los defectos que presentan los linfocitos T en ciertas patologías como la LLC, ayudan a romper la tolerancia y facilitan el *cross-talk* entre células T CD4, DCs, células NK y células T CD8 en la eliminación de las células tumorales. Extraído de *McDaniel, JM et al. 2012*.

Además de los efectos sobre la vía de señalización del TCR e IL-2, experimentos *in vitro* demuestran que la exposición de células leucémicas primarias a lenalidomida tiene un efecto inductor sobre las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y FASL (Aue et al., 2009; A. A. Chanan-Khan & Cheson, 2008), restaurando la sinapsis inmunológica y mejorando el reconocimiento de las células tumorales por el sistema inmunológico. Adicionalmente, las IMiDs también tienen efectos sobre la respuesta inmune innata, concretamente sobre las células NK. En lo referente a nuestro estudio, hemos observado que la lenalidomida es capaz de incrementar la

citotoxicidad frente a la línea tumoral K-562, así como contra células leucémicas primarias. Un trabajo llevado a cabo por Steinle y colaboradores pone de manifiesto que PBMCs a los que se les elimina el componente celular NK no son capaces de eliminar las células K-562. Lo mismo ocurre cuando los PBMCs son separados de las células diana por una membrana *transwell*, sugiriendo que las células NK y el contacto con las células tumorales es imprescindible para la inducción de apoptosis mediada por la lenalidomida (Zhu, Corral, Fleming, & Stein, 2008). Tanto la pomalidomida como la lenalidomida inducen la expresión del marcador de superficie CD56, el cual está relacionado normalmente con una menor capacidad citotóxica de las células NK. Sin embargo, al igual que Zhu y colaboradores, hemos observado que la lenalidomida aumenta en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> sin que el potencial citotóxico se vea disminuido (Zhu et al., 2008).

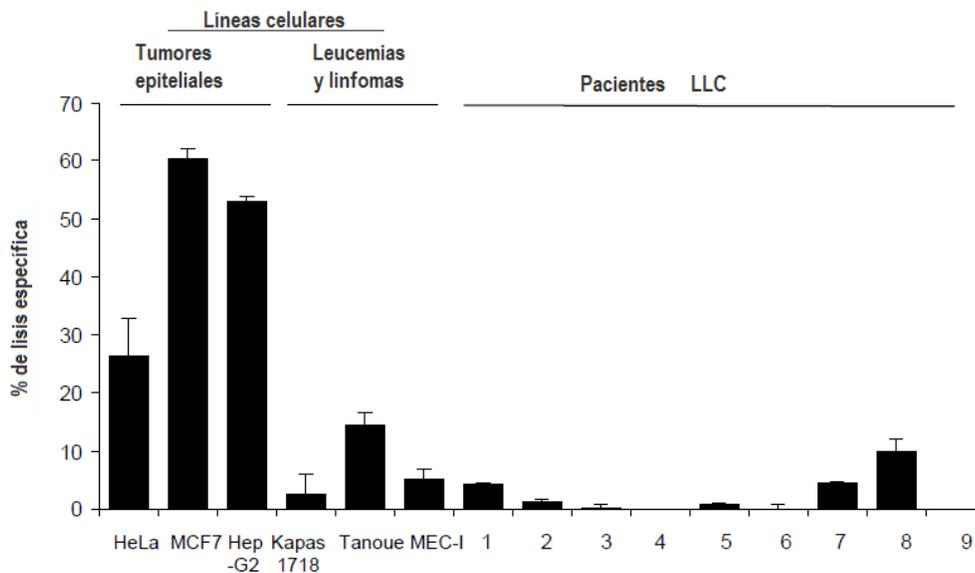
Cuando, en nuestro estudio, fenotipamos las células NK que habían sido sometidas a la estimulación con lenalidomida, encontramos que mayoritariamente éstas son CD56<sup>bright</sup>. Dicha subpoblación de células NK se considera la responsable de la secreción de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y GM-CSF. No obstante, un estudio reciente indica que la producción de citocinas por las células NK depende del conjunto de moléculas activadoras implicadas y no está restringida solamente a la subpoblación CD56<sup>bright</sup>, lo cual añade una gran complejidad al sistema (Fauriat, Long, Ljunggren, & Bryceson, 2010). Además, el análisis de la expresión de NKG2D, DNAM-1 y los NCRs revela que la lenalidomida es capaz de modular el repertorio de receptores activadores. Así pues, NKG2D y DNAM-1 se encuentran disminuidos en pacientes con LLC no siendo capaz la lenalidomida de restaurar su expresión. Por el contrario, NKp30 es el único receptor que parece estar modulado por la acción de esta droga, siendo su expresión mayor en células NK de pacientes de LLC tras el tratamiento. Un hecho llamativo es que los niveles basales de NKp46 se encuentran aumentados en las células NK de pacientes de LLC en comparación con los niveles observados en nuestro grupo control. Sin embargo, trabajos recientes han descrito que las células NK de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) tienen determinadas interacciones receptor-ligando defectuosas, posiblemente debido a una baja expresión de los receptores activadores NKp30 y NKp46, lo cual representa un mecanismo de evasión tumoral que podría ser revertido por la lenalidomida (Costello et al., 2002). Resultados más recientes muestran que la eliminación de células neoplásicas en mieloma múltiple es dependiente de DNAM-1, NKG2D y NKp46 (El-Sherbiny et al., 2007). Además, el análisis de los datos clínicos en LLC muestra una elevada

correlación entre el nivel de NCRs en la superficie celular de las NK y el pronóstico de la enfermedad, observándose un peor pronóstico cuando los niveles de estos receptores activadores son menores (Costello et al., 2012).

En conjunto, nuestros resultados y los resultados publicados hasta la fecha en pacientes de LLC indican que la lenalidomida es un fármaco con capacidad para aumentar la actividad antitumoral de las células NK en la LLC. Sin embargo, el incremento de la actividad antitumoral de las células NK en respuesta al tratamiento con lenalidomida está limitado por el hecho de que las células leucémicas de la LLC son muy poco inmunogénicas, de forma que, aunque las células NK estén muy activadas, difícilmente pueden reconocer a las células tumorales. Para incrementar la actividad antitumoral de la lenalidomida proponemos que debe combinarse con medicamentos que favorezcan el reconocimiento de la célula leucémica por el sistema inmune. Una estrategia altamente interesante puede ser combinar la lenalidomida con anticuerpos monoclonales, como el rituximab, que favorezcan el reconocimiento de las células leucémica por las células NK y su eliminación mediante ADCC. Mejorar la ADCC de las células NK es uno de los mecanismos terapéuticos más importantes de la lenalidomida en la LLC, el mieloma múltiple e incluso en tumores sólidos (Hayashi et al., 2005; L. Wu et al., 2008). La ADCC es un mecanismo en el cual los anticuerpos se unen específicamente a su ligando en la superficie de las células tumorales, los cuales son a su vez reconocidos por los receptores Fc- $\gamma$  RIII (CD16) de las células NK, desencadenando así la lisis de la célula diana a través de un mecanismo dependiente de perforina y granzima (Vivier, Tomasello, Baratin, Walzer, & Ugolini, 2008). Nuestros análisis muestran como la combinación de lenalidomida con rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, ejerce un efecto sinérgico en la eliminación de células leucémicas primarias. Nuestros resultados son apoyados por numerosos los ensayos clínicos en los que se ha demostrado la eficacia de lenalidomida en combinación con rituximab o con rituximab y fármacos como la fludarabina, permitiendo menores tiempos de tratamiento, reduciendo así la toxicidad de la terapia y alcanzándose mayores tasas de supervivencia (Brown et al., 2010; James et al., 2014; Mato et al., 2015). Así mismo, ofatumumab, otro anticuerpo monoclonal anti-CD20 que se une a un epítipo diferente del rituximab, ha mostrado tener actividad terapéutica en pacientes de LLC refractarios a fludarabina y rituximab (Wierda et al., 2011). Por otro lado, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 denominado obinutuzumab (GA-101) induce una mayor activación de la ADCC que el rituximab y ha sido efectivo en el tratamiento de modelos animales de NHL y LLC (Mossner et al., 2010;

Robak, 2009). Por ello, las combinaciones terapéuticas de lenalidomida y anticuerpos monoclonales, particularmente anti-CD20, resultan muy interesantes para incrementar la inmunogenicidad de las células leucémicas y activar así la respuesta inmune antitumoral mediada por células NK en pacientes de LLC, especialmente en aquellos que sufren recaídas o recidivas.

Hasta ahora hemos visto que las células NK de los pacientes de LLC tienen ciertas disfunciones que pueden ser revertidas, al menos parcialmente, por la lenalidomida. Sin embargo, nuestros datos sugieren que esto no es suficiente y que también deberíamos fijarnos en lo que ocurre en la otra cara de la moneda, la inmunogenicidad del tumor. Para poner en valor esta idea podemos observar la Figura V.3, en la que se analizó previamente en nuestro laboratorio la sensibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK de las células tumorales de diversos orígenes y en muestras de pacientes de LLC. Para ello, se utilizó la línea celular NKL que expresa altos niveles de receptores activadores (principalmente NKG2D y DNAM-1) y tiene una potente actividad citotóxica. Los ensayos de citotoxicidad enfrentando células NKL con células B leucémicas purificadas de pacientes de LLC mostraron que estas células son muy resistentes a la citotoxicidad mediada por células NK, presentando unos porcentajes de lisis específica cercanos al 0% (rango: 0%-10%) frente al 26%, 60% o 54% que presentaron las líneas tumorales epiteliales HeLa, MCF-7 o Hep-G2 usadas a modo de control en estos experimentos. En un punto intermedio se encuentran las líneas celulares de origen linfoide como Karpas-1718, Tanoue o MEC-I, con unos porcentajes de lisis específica del 11%, 16% y 5%, respectivamente (Figura V.3).



**Figura V.3 Porcentaje de lisis específica de diferentes líneas celulares tumorales o células B de LLC, al ser enfrentadas contra la línea NKL en ensayos de citotoxicidad fluorimétricos.** Se realizaron experimentos de citotoxicidad fluorimétricos en los que células de diferentes orígenes tumorales se enfrentaron a la línea NKL (ratio 10:1 NKL: diana). Como se observa en el gráfico, las células B procedentes de pacientes con LLC mostraron una lisis específica muy baja (rango entre 0 y 10%) frente a las células de orígenes epiteliales. Las células de líneas celulares de linaje B mostraron una lisis específica moderada, intermedia entre las células de LLC y las de los tumores epiteliales.

Cuando se analizaron los niveles de NKG2DLs en los pacientes de LLC se observó que las células B leucémicas de la LLC (CD19<sup>+</sup>/CD5<sup>+</sup>) presentaban en su superficie una expresión muy baja de NKG2DLs, especialmente de MICA, lo que concuerda perfectamente con la baja sensibilidad de estas células a la eliminación por acción de las células NK. Cabe destacar que en algunos pacientes de LLC la lenalidomida fue capaz de restaurar la expresión de los NKG2DLs (hasta 2,73-veces de inducción en el caso de MICA). Por el contrario, los niveles de dichos ligandos en otras muestras sufrieron una drástica represión (0,38-veces de inducción en el caso de ULBP3). Por tanto, la respuesta a la lenalidomida, en este caso, tiene una gran variabilidad inter-individual, con lo que es difícil obtener conclusiones. Lo que sí queda claramente definido es el reducido carácter inmunogénico que presenta la LLC. Por ello, no es suficiente con restaurar la funcionalidad de las células NK, como hace la lenalidomida, sino que también es necesario aumentar la inmunogenicidad del tumor para así favorecer el reconocimiento de las células leucémicas por parte del sistema inmune. Se han descrito diversos mecanismos por los que las células de cánceres avanzados, entre ellos la LLC, evitan su reconocimiento, disminuyendo la presencia de NKG2DLs en superficie, por ejemplo, mediante la represión epigenética de los ligandos como ocurre en la LLC (Huergo-Zapico et al., 2012) o induciendo su escisión proteolítica (Huergo-Zapico et al., 2012; Kaiser et al., 2007). Las células tumorales también son capaces de producir moléculas que modulan la expresión de NKG2D en las células NK como son, por ejemplo, TGF- $\beta$  o PGE<sub>2</sub>, con un resultado inhibitorio (Castriconi et al., 2003; Eisele et al., 2006; Friese et al., 2004). Paradójicamente, la exposición crónica del receptor a sus ligandos también inhibe la respuesta de NKG2D (Oppenheim et al., 2005).

Una segunda parte de nuestro trabajo consistió, por tanto, en buscar otras estrategias, además del rituximab, para aumentar la inmunogenicidad del tumor. Nuestro objetivo fue identificar fármacos que incrementaran la expresión de los ligandos de NKG2D, receptor que desempeña un papel clave en la respuesta inmune antitumoral de las células NK. Para llevar a cabo este objetivo, analizamos el efecto de diversos fármacos quimioterápicos sobre la expresión de los

ligandos de NKG2D. Dentro de los fármacos analizados, destacaron los fármacos antimetabólicos, que pasamos a estudiar con más detalle, y se convirtieron en el segundo objetivo de este proyecto. No pudimos estudiar estos fármacos antimetabólicos en la LLC, ya que las células leucémicas de la LLC, a diferencia de otros tipos de cáncer, tienen un ratio proliferativo muy bajo, por lo que decidimos analizar su papel en líneas celulares epiteliales.

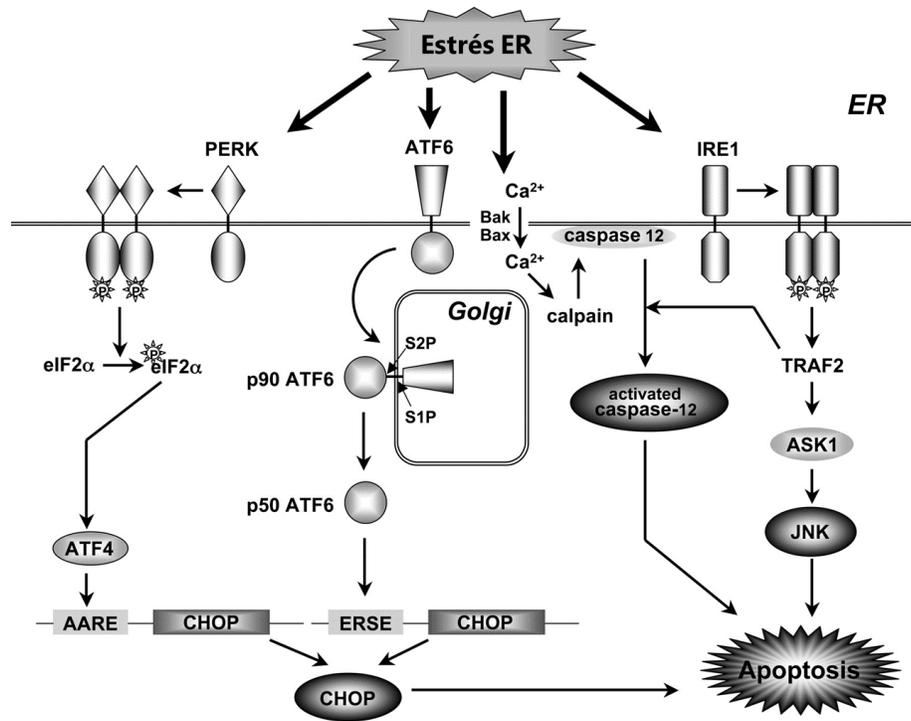
Los fármacos antimetabólicos inducen hiperploidía en las líneas celulares tratadas, y ha sido ampliamente descrito que este proceso es un paso intermedio hacia la aneuploidía celular que está demostrado que puede contribuir a la oncogénesis, la metástasis y a la resistencia a determinados quimioterápicos (Duesberg, Stindl, & Hehlmann, 2001; McClelland, Burrell, & Swanton, 2009), produciendo cambios en el número de copias de muchos genes de manera simultánea. Estudios recientes relacionan la aneuploidía con fenotipos tumorales más agresivos que propician la aparición de resistencias a los tratamientos quimioterápicos (Pavelka, Rancati, & Li, 2010; Swanton et al., 2009). Se sabe que, antes de llegar a convertirse en aneuploide, la célula pasa por un estado de tetra- o poliploidía intermedio, en el cual, podría eludir los controles celulares y proceder a una nueva división que, en la mayoría de los casos, daría lugar a aneuploidías (Storchova & Pellman, 2004).

Un estudio reciente ha demostrado que las células poliploides pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario debido a que sobre-expresan (al menos en una línea celular de colon), de manera específica, la molécula inmunoestimuladora CRT en la membrana plasmática (Boileve et al., 2013). Dicha proteína es reconocida por las DCs o los macrófagos, dirigiendo así, mediante la presentación de sus antígenos, a la destrucción de estas variantes tumorales por los linfocitos T (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Por ello, las células tetraploides, las cuales son precursores potencialmente peligrosos de células invasivas aneuploides (Illidge, Cragg, Fringes, Olive, & Erenpreisa, 2000; Vitale et al., 2011), pueden ser detectadas y controladas por el sistema inmunitario del individuo.

En base a estos antecedentes, nos propusimos estudiar si las células NK podrían estar involucradas, de algún modo, en el control de la ploidía celular a través un mecanismo complementario al desencadenado por la CRT. De este modo, la generación de células hiperploides con agentes antimetabólicos indujo la expresión de los ligandos activadores, principalmente MICA y ULBPs, en líneas tumorales de diversos orígenes celulares (mieloide,

colon y hepático). Consecuentemente, la inducción de los ligandos se tradujo en una mayor susceptibilidad a la lisis mediada por células NK. Adicionalmente, observamos un incremento de la actividad de las células NK que se reflejaba principalmente en la capacidad de secretar determinadas citocinas, como el IFN- $\gamma$ , así como en un aumento del porcentaje de células NK en proliferación. Al igual que el efecto ejercido sobre las células NK por la lenalidomida en la LLC, el aumento de la capacidad proliferativa de las células citotóxicas venía determinado por la presencia de IL-2 en el medio de cultivo, mayoritariamente secretada por los linfocitos T CD4. Estos resultados concuerdan perfectamente con estudios recientes en los que se sugiere la existencia de un mecanismo de inmunovigilancia que controla la ploidía celular, en el cual participan las DCs, los linfocitos T CD4 y CD8, así como las vías de secreción de interferones de tipo I y II (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Nuestros resultados sugieren que también las células NK están implicadas en el control inmunológico de la ploidía celular a través del reconocimiento de moléculas de estrés (NKG2DLs principalmente) y actuando de manera coordinada con otros mediadores de la inmunidad innata y adaptativa en la eliminación de las células tumorales poliploides. Pero, ¿cuáles son los mecanismos implicados en la regulación de los ligandos durante la poliploidía celular? En la última parte de nuestro estudio tratamos de arrojar luz sobre esta pregunta.

La inestabilidad cromosómica que presentan las células poliploides viene acompañada de la acumulación de proteínas mal plegadas o desplegadas en el lumen del ER, causando un elevado nivel de estrés del ER y activándose la llamada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR – *Unfolded protein response*) (Senovilla, Vitale, et al., 2012). Existen 3 transductores de señal que se localizan en la membrana del ER y que actúan como sensores del estrés: IRE1, PERK y ATF6 (Figura V.4). Bajo condiciones fisiológicas, los tres receptores del estrés se mantienen inactivos a través de su asociación con GRP78, sin embargo, en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas, GRP78 se disocia y pone en marcha la UPR (Szegezdi, Logue, Gorman, & Samali, 2006). En este contexto, la UPR tiene dos objetivos principales: en un principio, recuperar el funcionamiento normal de la célula deteniendo la traducción proteica y activando las vías de señalización que permitan incrementar la producción de chaperonas moleculares involucradas en el plegamiento de las proteínas. Entre las chaperonas se encuentran la CRT y ERp5, esta última es clave en la exportación de CRT a la membrana plasmática.



**Figura V.4 El estrés del ER induce UPR (unfolded protein response) a través de 3 principales transductores de señal.** PERK (*protein kinase-like ER kinase*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) e IRE1 (*inositol requiring ER-to-nucleus signal kinase 1*). La activación de PERK permite la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , lo cual causa el bloqueo de la síntesis proteica. En respuesta al estrés en el ER, p90ATF6 (90-kDa ATF6) es transportado al aparato de Golgi donde sufre un corte proteolítico por S1P y S2P (*site-1 o site-2 protein*) dando lugar a un factor de transcripción activo, p50ATF6 (50-kDa ATF6). De forma similar, IRE1 cataliza la eliminación de un pequeño intrón del RNA mensajero de XBP1 (*X-box binding protein 1*). Este evento de *splicing* crea un factor de transcripción activo en XBP1. p50ATF6 y XBP1 seguidamente se unen a ERSE (*ER stress response element*) y a UPRE (*UPR element*), permitiendo la expresión de genes diana codificados por chaperonas y factores ERAD (*ER associated degradation*) involucrados en la degradación de proteínas mal plegadas.

Se sabe que determinados inhibidores del proteasoma como bortezomib son capaces de inducir la muerte celular a través de la activación pre-apoptótica de estrés del ER (Nawrocki et al., 2005). Además, estos inhibidores son capaces de estimular el sistema inmune a través de la inducción de ciertos ligandos de NKG2D, como MICA o ULBP2, siendo dicha respuesta muy sensible a la dosis y al tipo celular (Vales-Gomez, Chisholm, Cassady-Cain, Roda-Navarro, & Reyburn, 2008). Nuestros resultados sugieren que, al menos en determinados casos, la respuesta al estrés del ER sí estaría implicada en la regulación de los ligandos durante la poliploidía celular. No obstante, éste sería un mecanismo complementario a la regulación llevada a cabo por los sistemas de reparación del daño al DNA que implican específicamente a las quinasas ATM y ATR.

Por tanto, nuestros resultados muestran que las células NK, junto con los linfocitos T y DCs, tienen un papel clave en el reconocimiento y eliminación de las variantes tumorales hiperploides, siendo el control de la ploidía celular por parte del sistema inmunitario un mecanismo más complejo de lo que inicialmente se sugería en los trabajos de Senovilla y colaboradores.

En conjunto, nuestros resultados sugieren una posible cooperación entre la lenalidomida y determinados fármacos antimitóticos en la detección y la eliminación de determinados tipos de cáncer. Por un lado, la lenalidomida restauraría la funcionalidad del sistema inmunológico que, como hemos visto, suele estar mermada debido a la acción del tumor y su microambiente. Por otro lado, el uso de agentes antimitóticos incrementaría la inmunogenicidad del tumor a través de mecanismos dependientes de la DDR y que, en último término, inducirían la expresión de los ligandos activadores de células NK. Actualmente, existen algunos estudios llevados a cabo en cáncer de próstata que muestran como la lenalidomida mejora la actividad antitumoral del docetaxel, aumentando el porcentaje de apoptosis de las células tumorales en comparación con el docetaxel como monoterapia (Henry et al., 2012). Por contra, un estudio realizado posteriormente muestra que la lenalidomida en combinación con docetaxel y prednisona empeora el pronóstico de los pacientes de cáncer próstata metastásico, siendo preferible la no utilización de lenalidomida en este caso (Petrylak et al., 2015). Son necesarios, por tanto, estudios adicionales para extraer conclusiones definitivas.

En resumen, los resultados de esta tesis doctoral ponen de manifiesto la gran complejidad y la especificidad de la respuesta inmune contra el cáncer. Por ello, un abordaje terapéutico que aumente la susceptibilidad de las células transformadas y restaure la capacidad antitumoral de las células NK resultaría más efectivo que ambas estrategias por separado. Además, la necesidad de conocer los mecanismos que subyacen a estos procesos es esencial para poder desarrollar estrategias inmunoterapéuticas específicas que puedan ayudar en un futuro a mejorar el tratamiento, el manejo y, finalmente, el pronóstico de los pacientes con cáncer.

## CONCLUSIONES

1. La proliferación de linfocitos B sanos es estimulada por la lenalidomida, sin embargo el clon leucémico se mantiene en un estado citoestático.
2. La lenalidomida ejerce un efecto citotóxico sobre las células leucémicas de la LLC que se correlaciona con el porcentaje de las células inmunes del paciente, en particular con el porcentaje de células NKT-like.
3. La lenalidomida induce la proliferación de las células NK y NKT-like de pacientes de LLC e individuos sanos debido a su capacidad de inducir la secreción de IL-2, principalmente en los linfocitos T CD4.
4. La lenalidomida coopera con el rituximab promoviendo la citotoxicidad dependiente de anticuerpo contra las células leucémicas de la LLC. Este efecto es mediado, al menos en parte, por la inducción de la expresión de CD20 en la superficie de las células leucémicas.
5. Los fármacos antimitóticos aumentan la inmunogenicidad de diferentes líneas tumorales a través del incremento de la expresión de calreticulina y de los ligandos de NKG2D, DNAM-1 y NKp30 en la superficie celular.
6. El grado de ploidía celular se correlaciona positivamente con el grado de inmunogenicidad del tumor, determinado por un aumento en los niveles de MICA, ULBP2, PVR y Nectina-2 en la superficie celular, lo cual se asocia con una mayor susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK.
7. El co-cultivo con células tumorales hiperploides modula el repertorio de receptores activadores aumentando la expresión de NKG2D, DNAM-I y NKp30 en la membrana de las células NK, observándose además, un incremento en la síntesis de IFN- $\gamma$ .
8. La presencia de células tumorales hiperploides generadas por el tratamiento con citocalasina D y nocodazol en co-cultivos con PBMCs estimula la proliferación de células NK y NKT-like, no siendo así cuando las células tumorales son tratadas con docetaxel.
9. La inducción de la proliferación de células NK y NKT-like en los co-cultivos con células hiperploides está determinada por un incremento en la síntesis de IL-2, principalmente producida por los linfocitos T CD4.

10. La activación de la vía de reparación del daño en el DNA y, en determinados modelos celulares, la respuesta al estrés del retículo endoplásmico son los mecanismos moleculares principales que regulan la expresión de MICA en las células tumorales hiperploides.

## CONCLUSIONS

1. The proliferation of normal B cells is stimulated by lenalidomide. Nevertheless, the leukemic clone remains cytostatic.
2. Lenalidomide exerts a cytotoxic effect on CLL cells, which is directly correlated with the percentage of immune cells, particularly with the number of NKT-like cells.
3. Lenalidomide induces the proliferation of NK- and NKT-like cells in CLL patients and healthy donors due to their capability of increasing IL-2 secretion, mainly by CD4 T cells.
4. Lenalidomide has a synergistic effect with rituximab on promoting Antibody-Dependent-Cell-Mediated-Cytotoxicity against primary leukemia cells. Such effect is mediated, at least in part, by the up-regulation of CD20 on the surface of leukemic cells.
5. Antimitotic drugs induce the overexpression of calreticulin and ligands for NKG2D, DNAM-I and NKp30 on the surface of several cancer cell lines.
6. The DNA content is directly correlated with tumor immunogenicity, through an increased level of MICA, ULBP2, PVR and Nectin-2 on the cell surface, rendering tumor cells more susceptible to NK cell-mediated lysis by activating NKG2D and DNAM-1 receptors.
7. The co-culture with drug-induced hyperploid cells modulates the repertoire of activating receptors by increasing the expression of NKG2D, DNAM-I and NKp30 on the membrane of NK cells, resulting in an induced secretion of IFN- $\gamma$ .
8. The presence of hyperploid tumor cells generated by exposure to cytochalasin D and nocodazole in the co-cultures with PBMCs, stimulated the proliferation of NK- and NKT-like cells. However, such effect is not observed in docetaxel-induced hyperploid cancer cells.
9. The induction of NK- and NKT-like proliferation is mediated by IL-2, mainly secreted by CD4 T cells in response to drug induced-hyperploid cells present in the culture.
10. The stimulation of MICA expression in hyperploid cells is mainly mediated by ATM protein kinase and, in certain cell models, by the endoplasmic reticulum stress pathway.



# **BIBLIOGRAFÍA**

- Abbasova, S. G., Vysotskii, M. M., Ovchinnikova, L. K., Obusheva, M. N., Digaeva, M. A., Britvin, T. A., . . . Davidov, M. I. (2009). Cancer and soluble FAS. *Bull Exp Biol Med*, 148(4), 638-642.
- Albertsson, P. A., Basse, P. H., Hokland, M., Goldfarb, R. H., Nagelkerke, J. F., Nannmark, U., & Kuppen, P. J. (2003). NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*, 24(11), 603-609.
- Aue, G., Njuguna, N., Tian, X., Soto, S., Hughes, T., Vire, B., . . . Wiestner, A. (2009). Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 94(9), 1266-1273. doi: 10.3324/haematol.2009.005835
- Awan, F. T., Johnson, A. J., Lapalombella, R., Hu, W., Lucas, M., Fischer, B., & Byrd, J. C. (2010). Thalidomide and lenalidomide as new therapeutics for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 51(1), 27-38. doi: 10.3109/10428190903350405
- Axten, J. M., Medina, J. R., Feng, Y., Shu, A., Romeril, S. P., Grant, S. W., . . . Gampe, R. T. (2012). Discovery of 7-methyl-5-(1-{[3-(trifluoromethyl)phenyl]acetyl}-2,3-dihydro-1H-indol-5-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-amine (GSK2606414), a potent and selective first-in-class inhibitor of protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase (PERK). *J Med Chem*, 55(16), 7193-7207. doi: 10.1021/jm300713s
- Baldwin, R. W. (1955). Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. *Br J Cancer*, 9(4), 652-657.
- Baratin, M., & Vivier, E. (2010). [B7-H6 : a novel alert signal for NK cells]. *Med Sci (Paris)*, 26(2), 119-120. doi: 10.1051/medsci/2010262119
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., & Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.
- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P., & Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*, 122(17), 2935-2942. doi: 10.1182/blood-2013-03-489054
- Behl, D., Porrata, L. F., Markovic, S. N., Letendre, L., Pruthi, R. K., Hook, C. C., . . . Litzow, M. R. (2006). Absolute lymphocyte count recovery after induction chemotherapy predicts superior survival in acute myelogenous leukemia. *Leukemia*, 20(1), 29-34. doi: 10.1038/sj.leu.2404032
- Billingham, R. E., Brent, L., & Medawar, P. B. (1954). Quantitative studies on tissue transplantation immunity. II. The origin, strength and duration of actively and adoptively acquired immunity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 143(910), 58-80.
- Binet, J. L., Auquier, A., Dighiero, G., Chastang, C., Piguët, H., Goasguen, J., . . . Gremy, F. (1981). A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 48(1), 198-206.
- Boileve, A., Senovilla, L., Vitale, I., Lissa, D., Martins, I., Metivier, D., . . . Kroemer, G. (2013). Immunosurveillance against tetraploidization-induced colon tumorigenesis. *Cell Cycle*, 12(3), 473-479. doi: 10.4161/cc.23369
- Boissel, N., Rea, D., Tieng, V., Dulphy, N., Brun, M., Cayuela, J. M., . . . Toubert, A. (2006). BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol*, 176(8), 5108-5116.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., . . . Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the

- human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, 198(4), 557-567. doi: 10.1084/jem.20030788
- Boutet, P., Aguera-Gonzalez, S., Atkinson, S., Pennington, C. J., Edwards, D. R., Murphy, G., . . . Vales-Gomez, M. (2009). Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol*, 182(1), 49-53.
- Boveri, T. (2008). Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris. *J Cell Sci*, 121 Suppl 1, 1-84. doi: 10.1242/jcs.025742
- Boyce, M., Bryant, K. F., Jousse, C., Long, K., Harding, H. P., Scheuner, D., . . . Yuan, J. (2005). A selective inhibitor of eIF2alpha dephosphorylation protects cells from ER stress. *Science*, 307(5711), 935-939. doi: 10.1126/science.1101902
- Bradley, L. M., Dalton, D. K., & Croft, M. (1996). A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development. *J Immunol*, 157(4), 1350-1358.
- Brown, J. R., Abramson, J., Hochberg, E., Mikler, E., Dalton, V., Werner, L., . . . Freedman, A. S. (2010). A phase I study of lenalidomide in combination with fludarabine and rituximab in previously untreated CLL/SLL. *Leukemia*, 24(11), 1972-1975. doi: 10.1038/leu.2010.199
- Burgess, S. J., Maasho, K., Masilamani, M., Narayanan, S., Borrego, F., & Coligan, J. E. (2008). The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol Res*, 40(1), 18-34. doi: 10.1007/s12026-007-0060-9
- Burnet, F. M. (1961). Immunological recognition of self. *Science*, 133(3449), 307-311.
- Burnet, F. M. (1967). Immunological aspects of malignant disease. *Lancet*, 1(7501), 1171-1174.
- Burnet, M. (1963). Experimental Production of Auto-Antibodies or of Auto-Immune Disease. *Br Med Bull*, 19, 245-250.
- Buschle, M., Campana, D., Carding, S. R., Richard, C., Hoffbrand, A. V., & Brenner, M. K. (1993). Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*, 177(1), 213-218.
- Caligaris-Cappio, F., & Hamblin, T. J. (1999). B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *J Clin Oncol*, 17(1), 399-408.
- Cam, H., & Dynlacht, B. D. (2003). Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell*, 3(4), 311-316.
- Campoli, M., & Ferrone, S. (2008). HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance. *Oncogene*, 27(45), 5869-5885. doi: 10.1038/onc.2008.273
- Castedo, M., Coquelle, A., Vivet, S., Vitale, I., Kauffmann, A., Dessen, P., . . . Kroemer, G. (2006). Apoptosis regulation in tetraploid cancer cells. *EMBO J*, 25(11), 2584-2595. doi: 10.1038/sj.emboj.7601127
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., . . . Moretta, A. (2003). Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 4120-4125. doi: 10.1073/pnas.0730640100
- Cerboni, C., Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Doria, M., Cippitelli, M., & Santoni, A. (2014). The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Front Immunol*, 4, 508. doi: 10.3389/fimmu.2013.00508
- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2001a). Ligands for natural killer cell receptors: redundancy or specificity. *Immunol Rev*, 181, 158-169.
- Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2001b). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol*, 1(1), 41-49. doi: 10.1038/35095564

- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., & Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11), 633-640.
- Corral, L. G., Haslett, P. A., Muller, G. W., Chen, R., Wong, L. M., Ocampo, C. J., . . . Kaplan, G. (1999). Differential cytokine modulation and T cell activation by two distinct classes of thalidomide analogues that are potent inhibitors of TNF-alpha. *J Immunol*, 163(1), 380-386.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., . . . Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 14(2), 123-133.
- Costello, R. T., Fauriat, C., Sivori, S., Marcenaro, E., & Olive, D. (2004). NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends Immunol*, 25(6), 328-333. doi: 10.1016/j.it.2004.04.005
- Costello, R. T., Knoblauch, B., Sanchez, C., Mercier, D., Le Treut, T., & Sebahoun, G. (2012). Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*, 135(2), 151-157. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03521.x
- Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M. J., Reviron, D., . . . Moretta, A. (2002). Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 99(10), 3661-3667.
- Cox, M. C., Nofroni, I., Ruco, L., Amodeo, R., Ferrari, A., La Verde, G., . . . Aloe-Spiriti, M. A. (2008). Low absolute lymphocyte count is a poor prognostic factor in diffuse-large-B-cell-lymphoma. *Leuk Lymphoma*, 49(9), 1745-1751. doi: 10.1080/10428190802226425
- Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., . . . Bowness, P. (2007). CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, 179(1), 89-94.
- Chanan-Khan, A., Miller, K. C., Musial, L., Lawrence, D., Padmanabhan, S., Takeshita, K., . . . Czuczman, M. S. (2006). Clinical efficacy of lenalidomide in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase II study. *J Clin Oncol*, 24(34), 5343-5349. doi: 10.1200/JCO.2005.05.0401
- Chanan-Khan, A. A., & Cheson, B. D. (2008). Lenalidomide for the treatment of B-cell malignancies. *J Clin Oncol*, 26(9), 1544-1552. doi: 10.1200/JCO.2007.14.5367
- Chanan-Khan, A. A., Chitta, K., Ersing, N., Paulus, A., Masood, A., Sher, T., . . . Bangia, N. (2011). Biological effects and clinical significance of lenalidomide-induced tumour flare reaction in patients with chronic lymphocytic leukaemia: in vivo evidence of immune activation and antitumour response. *Br J Haematol*, 155(4), 457-467. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08882.x
- Chaput, N., De Botton, S., Obeid, M., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Panaretakis, T., . . . Kroemer, G. (2007). Molecular determinants of immunogenic cell death: surface exposure of calreticulin makes the difference. *J Mol Med (Berl)*, 85(10), 1069-1076. doi: 10.1007/s00109-007-0214-1
- Chen, C. I., Bergsagel, P. L., Paul, H., Xu, W., Lau, A., Dave, N., . . . Trudel, S. (2011). Single-agent lenalidomide in the treatment of previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 29(9), 1175-1181. doi: 10.1200/JCO.2010.29.8133
- Chiorazzi, N., Fu, S. M., Montazeri, G., Kunkel, H. G., Rai, K., & Gee, T. (1979). T cell helper defect in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*, 122(3), 1087-1090.
- Chiorazzi, N., Rai, K. R., & Ferrarini, M. (2005). Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 352(8), 804-815. doi: 10.1056/NEJMra041720
- Chow, J., & Poon, R. Y. (2010). DNA damage and polyploidization. *Adv Exp Med Biol*, 676, 57-71.

- Daniels, M. J., Wang, Y., Lee, M., & Venkitaraman, A. R. (2004). Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science*, *306*(5697), 876-879. doi: 10.1126/science.1102574
- Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C. T., Spies, T., & Bukowski, J. F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity*, *15*(1), 83-93.
- Davies, F. E., Raje, N., Hideshima, T., Lentzsch, S., Young, G., Tai, Y. T., . . . Anderson, K. C. (2001). Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma. *Blood*, *98*(1), 210-216.
- Davoli, T., & de Lange, T. (2011). The causes and consequences of polyploidy in normal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *27*, 585-610. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154234
- De Angelo, G., Yuen, C., Palla, S. L., Anderson, P. M., & Zweidler-McKay, P. A. (2008). Absolute lymphocyte count is a novel prognostic indicator in ALL and AML: implications for risk stratification and future studies. *Cancer*, *112*(2), 407-415. doi: 10.1002/cncr.23168
- Diefenbach, A., & Raulet, D. H. (2001). Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*, *181*, 170-184.
- Digel, W., Stefanic, M., Schoniger, W., Buck, C., Raghavachar, A., Frickhofen, N., . . . Porzolt, F. (1989). Tumor necrosis factor induces proliferation of neoplastic B cells from chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *73*(5), 1242-1246.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, *1*(6), 447-456.
- Doubek, M., & Smida, M. (2015). Treatment of chronic lymphocytic leukemia with monoclonal antibodies, where are we heading? *Expert Rev Hematol*, 1-22. doi: 10.1586/17474086.2015.1079123
- Duesberg, P., Stindl, R., & Hehlmann, R. (2001). Origin of multidrug resistance in cells with and without multidrug resistance genes: chromosome reassortments catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 11283-11288. doi: 10.1073/pnas.201398998
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, *3*(11), 991-998. doi: 10.1038/ni1102-991
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, *21*(2), 137-148. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.017
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, *22*, 329-360. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803
- Dushyanthen, S., Beavis, P. A., Savas, P., Teo, Z. L., Zhou, C., Mansour, M., . . . Loi, S. (2015). Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *BMC Med*, *13*(1), 202. doi: 10.1186/s12916-015-0431-3
- Eagle, R. A., & Trowsdale, J. (2007). Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol*, *7*(9), 737-744. doi: 10.1038/nri2144
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., . . . Friese, M. A. (2006). TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain*, *129*(Pt 9), 2416-2425. doi: 10.1093/brain/awl205
- El-Sherbiny, Y. M., Meade, J. L., Holmes, T. D., McGonagle, D., Mackie, S. L., Morgan, A. W., . . . Cook, G. P. (2007). The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural

- killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res*, 67(18), 8444-8449. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4230
- Esin, S., Batoni, G., Pardini, M., Favilli, F., Bottai, D., Maisetta, G., . . . Campa, M. (2004). Functional characterization of human natural killer cells responding to Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin. *Immunology*, 112(1), 143-152. doi: 10.1111/j.1365-2567.2004.01858.x
- Eskelund, C. W., Nederby, L., Thysen, A. H., Skovbo, A., Roug, A. S., & Hokland, M. E. (2011). Interleukin-21 and rituximab enhance NK cell functionality in patients with B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res*, 35(7), 914-920. doi: 10.1016/j.leukres.2011.02.006
- Farnault, L., Sanchez, C., Baier, C., Le Treut, T., & Costello, R. T. (2012). Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol*, 2012, 421702. doi: 10.1155/2012/421702
- Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G., & Bryceson, Y. T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 115(11), 2167-2176. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469
- Fayad, L., Keating, M. J., Reuben, J. M., O'Brien, S., Lee, B. N., Lerner, S., & Kurzrock, R. (2001). Interleukin-6 and interleukin-10 levels in chronic lymphocytic leukemia: correlation with phenotypic characteristics and outcome. *Blood*, 97(1), 256-263.
- Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., & Munz, C. (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKP30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med*, 195(3), 343-351.
- Ferrajoli, A., Lee, B. N., Schlette, E. J., O'Brien, S. M., Gao, H., Wen, S., . . . Keating, M. J. (2008). Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 111(11), 5291-5297. doi: 10.1182/blood-2007-12-130120
- Foa, R., Lauria, F., Lusso, P., Giubellino, M. C., Fierro, M. T., Ferrando, M. L., . . . Matera, L. (1984). Discrepancy between phenotypic and functional features of natural killer T-lymphocytes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, 58(3), 509-516.
- Foley, E. J. (1953). Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res*, 13(12), 835-837.
- Friese, M. A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., & Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res*, 64(20), 7596-7603. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1627
- Fu, B., Tian, Z., & Wei, H. (2014). Subsets of human natural killer cells and their regulatory effects. *Immunology*, 141(4), 483-489. doi: 10.1111/imm.12224
- Fujiwara, T., Bandi, M., Nitta, M., Ivanova, E. V., Bronson, R. T., & Pellman, D. (2005). Cytokinesis failure generating tetraploids promotes tumorigenesis in p53-null cells. *Nature*, 437(7061), 1043-1047. doi: 10.1038/nature04217
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., & Carbone, D. P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood*, 92(11), 4150-4166.
- Galipeau, P. C., Cowan, D. S., Sanchez, C. A., Barrett, M. T., Emond, M. J., Levine, D. S., . . . Reid, B. J. (1996). 17p (p53) allelic losses, 4N (G2/tetraploid) populations, and progression to aneuploidy in Barrett's esophagus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(14), 7081-7084.

- Galton, D. A. (1966). The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Can Med Assoc J*, *94*(19), 1005-1010.
- Galustian, C., Meyer, B., Labarthe, M. C., Dredge, K., Klaschka, D., Henry, J., . . . Dalgleish, A. G. (2009). The anti-cancer agents lenalidomide and pomalidomide inhibit the proliferation and function of T regulatory cells. *Cancer Immunol Immunother*, *58*(7), 1033-1045. doi: 10.1007/s00262-008-0620-4
- Gandhi, A. K., Kang, J., Havens, C. G., Conklin, T., Ning, Y., Wu, L., . . . Chopra, R. (2014). Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4(CRBN.). *Br J Haematol*, *164*(6), 811-821. doi: 10.1111/bjh.12708
- Ganem, N. J., Storchova, Z., & Pellman, D. (2007). Tetraploidy, aneuploidy and cancer. *Curr Opin Genet Dev*, *17*(2), 157-162. doi: 10.1016/j.gde.2007.02.011
- Garrity, D., Call, M. E., Feng, J., & Wucherpfennig, K. W. (2005). The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(21), 7641-7646. doi: 10.1073/pnas.0502439102
- Garzetti, G. G., Ciavattini, A., Goteri, G., Tranquilli, A. L., Muzzioli, M., Fabris, N., . . . Romanini, C. (1994). Natural killer cell activity in stage I endometrial carcinoma: correlation with nuclear grading, myometrial invasion, and immunoreactivity of proliferating cell nuclear antigen. *Gynecol Oncol*, *55*(1), 111-114. doi: 10.1006/gyno.1994.1258
- Gasparri, M. L., Attar, R., Palaia, I., Perniola, G., Marchetti, C., Di Donato, V., . . . Panici, P. B. (2015). Tumor infiltrating lymphocytes in ovarian cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, *16*(9), 3635-3638.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J., & Raulet, D. H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, *436*(7054), 1186-1190. doi: 10.1038/nature03884
- Gonzalez-Rodriguez, A. P., Contesti, J., Huergo-Zapico, L., Lopez-Soto, A., Fernandez-Guizan, A., Acebes-Huerta, A., . . . Gonzalez, S. (2010). Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, *51*(10), 1829-1836. doi: 10.3109/10428194.2010.503820
- Gonzalez-Rodriguez, A. P., Payer, A. R., Acebes-Huerta, A., Huergo-Zapico, L., Villa-Alvarez, M., Gonzalez-Garcia, E., & Gonzalez, S. (2013). Lenalidomide and chronic lymphocytic leukemia. *Biomed Res Int*, *2013*, 932010. doi: 10.1155/2013/932010
- Gonzalez, S., Groh, V., & Spies, T. (2006). Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol*, *298*, 121-138.
- Gonzalez, S., Lopez-Soto, A., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., & Lopez-Larrea, C. (2008). NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol*, *29*(8), 397-403. doi: 10.1016/j.it.2008.04.007
- Gordon, D. J., Resio, B., & Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat Rev Genet*, *13*(3), 189-203. doi: 10.1038/nrg3123
- Gorgoulis, V. G., Vassiliou, L. V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., . . . Halazonetis, T. D. (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*, *434*(7035), 907-913. doi: 10.1038/nature03485
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., & Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(22), 12445-12450.

- Groh, V., Wu, J., Yee, C., & Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, *419*(6908), 734-738. doi: 10.1038/nature01112
- Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., . . . Raulet, D. H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*, *28*(4), 571-580. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.016
- Güven, H., Gilljam, M., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G., Christensson, B., Kimby, E., & Dillber, M. S. (2003). Expansion of natural killer (NK) and natural killer-like T (NKT)-cell populations derived from patients with B-chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): a potential source for cellular immunotherapy. *Leukemia*, *17*(10), 1973-1980. doi: 10.1038/sj.leu.2403083
- Ha, T. Y. (2009). The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw*, *9*(6), 209-235. doi: 10.4110/in.2009.9.6.209
- Halvorsen, E. C., Mahmoud, S. M., & Bennewith, K. L. (2014). Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, *33*(4), 1025-1041. doi: 10.1007/s10555-014-9529-x
- Hallek, M. (2013). Chronic lymphocytic leukemia: 2013 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*, *88*(9), 803-816. doi: 10.1002/ajh.23491
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, *166*(4), 557-580.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Harris, N. L., & Ronchese, F. (1999). The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunol Cell Biol*, *77*(4), 304-311. doi: 10.1046/j.1440-1711.1999.00835.x
- Hayashi, T., Hideshima, T., Akiyama, M., Podar, K., Yasui, H., Rajc, N., . . . Anderson, K. C. (2005). Molecular mechanisms whereby immunomodulatory drugs activate natural killer cells: clinical application. *Br J Haematol*, *128*(2), 192-203. doi: 10.1111/j.1365-2141.2004.05286.x
- Henney, C. S., Kuribayashi, K., Kern, D. E., & Gillis, S. (1981). Interleukin-2 augments natural killer cell activity. *Nature*, *291*(5813), 335-338.
- Henry, J. Y., Lu, L., Adams, M., Meyer, B., Bartlett, J. B., Dalglish, A. G., & Galustian, C. (2012). Lenalidomide enhances the anti-prostate cancer activity of docetaxel in vitro and in vivo. *Prostate*, *72*(8), 856-867. doi: 10.1002/pros.21488
- Herishanu, Y., Katz, B. Z., Lipsky, A., & Wiestner, A. (2013). Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am*, *27*(2), 173-206. doi: 10.1016/j.hoc.2013.01.002
- Hilpert, J., Grosse-Hovest, L., Grunebach, F., Buechele, C., Nuebling, T., Raum, T., . . . Salih, H. R. (2012). Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol*, *189*(3), 1360-1371. doi: 10.4049/jimmunol.1200796
- Hirano, A., & Kurimura, T. (1974). Virally transformed cells and cytochalasin B. I. The effect of cytochalasin B on cytokinesis, karyokinesis and DNA synthesis in cells. *Exp Cell Res*, *89*(1), 111-120.
- Hoffmann, P. R., Kench, J. A., Vondracek, A., Kruk, E., Daleke, D. L., Jordan, M., . . . Fadok, V. A. (2005). Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. *J Immunol*, *174*(3), 1393-1404.

- Hornig, T., Bezbradica, J. S., & Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol*, *8*(12), 1345-1352. doi: 10.1038/ni1524
- Horton, N. C., Mathew, S. O., & Mathew, P. A. (2013). Novel interaction between proliferating cell nuclear antigen and HLA I on the surface of tumor cells inhibits NK cell function through NKP44. *PLoS One*, *8*(3), e59552. doi: 10.1371/journal.pone.0059552
- Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Contesti, J., Gonzalez-Garcia, E., Payer, A. R., . . . Gonzalez, S. (2014). Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. *PLoS One*, *9*(10), e108326. doi: 10.1371/journal.pone.0108326
- Huergo-Zapico, L., Gonzalez-Rodriguez, A. P., Contesti, J., Gonzalez, E., Lopez-Soto, A., Fernandez-Guizan, A., . . . Gonzalez, S. (2012). Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother*, *61*(8), 1201-1210. doi: 10.1007/s00262-011-1195-z
- Iannello, A., Thompson, T. W., Ardolino, M., Lowe, S. W., & Raulet, D. H. (2013). p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J Exp Med*, *210*(10), 2057-2069. doi: 10.1084/jem.20130783
- Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev*, *13*(2), 95-109.
- Ikehara, S., Pahwa, R. N., Fernandes, G., Hansen, C. T., & Good, R. A. (1984). Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *81*(3), 886-888.
- Illidge, T. M., Cragg, M. S., Fringes, B., Olive, P., & Erenpreisa, J. A. (2000). Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell Biol Int*, *24*(9), 621-633. doi: 10.1006/cbir.2000.0557
- Ito, T., Ando, H., Suzuki, T., Ogura, T., Hotta, K., Imamura, Y., . . . Handa, H. (2010). Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*, *327*(5971), 1345-1350. doi: 10.1126/science.1177319
- Jadidi-Niaragh, F., Jeddi-Tehrani, M., Ansari-pour, B., Razavi, S. M., Sharifian, R. A., & Shokri, F. (2012). Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia. *Med Oncol*, *29*(5), 3561-3569. doi: 10.1007/s12032-012-0262-4
- Jadidi-Niaragh, F., Yousefi, M., Memarian, A., Hojjat-Farsangi, M., Khoshnoodi, J., Razavi, S. M., . . . Shokri, F. (2013). Increased frequency of CD8+ and CD4+ regulatory T cells in chronic lymphocytic leukemia: association with disease progression. *Cancer Invest*, *31*(2), 121-131. doi: 10.3109/07357907.2012.756110
- James, D. F., Werner, L., Brown, J. R., Wierda, W. G., Barrientos, J. C., Castro, J. E., . . . Kipps, T. J. (2014). Lenalidomide and rituximab for the initial treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter clinical-translational study from the chronic lymphocytic leukemia research consortium. *J Clin Oncol*, *32*(19), 2067-2073. doi: 10.1200/JCO.2013.51.5890
- Jewell, A. P., Worman, C. P., Giles, F. J., Goldstone, A. H., & Lydyard, P. M. (1992). Resistance of chronic lymphocytic leukaemia cells to interferon-alpha generated lymphokine activated killer cells. *Leuk Lymphoma*, *7*(5-6), 473-480. doi: 10.3109/10428199209049804
- Johnsen, A. C., Haux, J., Steinkjer, B., Nonstad, U., Egeberg, K., Sundan, A., . . . Espevik, T. (1999). Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*, *11*(9), 664-672. doi: 10.1006/cyto.1999.0489

- Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E., & Raulet, D. H. (2012). RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med*, 209(13), 2409-2422. doi: 10.1084/jem.20120565
- Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I. T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., . . . Spies, T. (2007). Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*, 447(7143), 482-486. doi: 10.1038/nature05768
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13), 7556-7561.
- Karre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., & Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*, 319(6055), 675-678. doi: 10.1038/319675a0
- Katrinakis, G., Kyriakou, D., Papadaki, H., Kalokyri, I., Markidou, F., & Eliopoulos, G. D. (1996). Defective natural killer cell activity in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is associated with impaired release of natural killer cytotoxic factor(s) but not of tumour necrosis factor-alpha. *Acta Haematol*, 96(1), 16-23.
- Kepp, O., Menger, L., Vacchelli, E., Locher, C., Adjemian, S., Yamazaki, T., . . . Zitvogel, L. (2013). Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. *Cytokine Growth Factor Rev*, 24(4), 311-318. doi: 10.1016/j.cytogfr.2013.05.001
- Kiaii, S., Choudhury, A., Mozaffari, F., Kimby, E., Osterborg, A., & Mellstedt, H. (2005). Signaling molecules and cytokine production in T cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL): comparison of indolent and progressive disease. *Med Oncol*, 22(3), 291-302. doi: 10.1385/MO:22:3:291
- Kipps, T. J. (1997). Signal transduction pathways and mechanisms of apoptosis in CLL B-lymphocytes: their role in CLL pathogenesis. *Hematol Cell Ther*, 39 Suppl 1, S17-27.
- Kotla, V., Goel, S., Nischal, S., Heuck, C., Vivek, K., Das, B., & Verma, A. (2009). Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, 2, 36. doi: 10.1186/1756-8722-2-36
- Krackhardt, A. M., Harig, S., Witzens, M., Broderick, R., Barrett, P., & Gribben, J. G. (2002). T-cell responses against chronic lymphocytic leukemia cells: implications for immunotherapy. *Blood*, 100(1), 167-173.
- Krizhanovsky, V., Yon, M., Dickins, R. A., Hearn, S., Simon, J., Miething, C., . . . Lowe, S. W. (2008). Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. *Cell*, 134(4), 657-667. doi: 10.1016/j.cell.2008.06.049
- Kronke, J., Hurst, S. N., & Ebert, B. L. (2014). Lenalidomide induces degradation of IKZF1 and IKZF3. *Oncoimmunology*, 3(7), e941742. doi: 10.4161/21624011.2014.941742
- Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S., & Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 92(3), 221-229. doi: 10.1038/icb.2013.98
- Lapalombella, R., Andritsos, L., Liu, Q., May, S. E., Browning, R., Pham, L. V., . . . Byrd, J. C. (2010). Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase-dependent pathway. *Blood*, 115(13), 2619-2629. doi: 10.1182/blood-2009-09-242438
- Lapalombella, R., Yu, B., Triantafyllou, G., Liu, Q., Butchar, J. P., Lozanski, G., . . . Byrd, J. C. (2008). Lenalidomide down-regulates the CD20 antigen and antagonizes direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab on primary chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 112(13), 5180-5189. doi: 10.1182/blood-2008-01-133108

- LeBlanc, R., Hideshima, T., Catley, L. P., Shringarpure, R., Burger, R., Mitsiades, N., . . . Munshi, N. C. (2004). Immunomodulatory drug costimulates T cells via the B7-CD28 pathway. *Blood*, *103*(5), 1787-1790. doi: 10.1182/blood-2003-02-0361
- Lee, B. N., Gao, H., Cohen, E. N., Badoux, X., Wierda, W. G., Estrov, Z., . . . Reuben, J. M. (2011). Treatment with lenalidomide modulates T-cell immunophenotype and cytokine production in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, *117*(17), 3999-4008. doi: 10.1002/cncr.25983
- Li, H., Lakshmikanth, T., Garofalo, C., Enge, M., Spinnler, C., Anichini, A., . . . Selivanova, G. (2011). Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle*, *10*(19), 3346-3358. doi: 10.4161/cc.10.19.17630
- Lisovsky, I., Isitman, G., Bruneau, J., & Bernard, N. F. (2015). Functional analysis of NK cell subsets activated by 721.221 and K562 HLA-null cells. *J Leukoc Biol*, *97*(4), 761-767. doi: 10.1189/jlb.4AB1014-499R
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, *25*(4), 402-408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Lopez-Larrea, C., Suarez-Alvarez, B., Lopez-Soto, A., Lopez-Vazquez, A., & Gonzalez, S. (2008). The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*, *14*(4), 179-189. doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.004
- Lopez-Soto, A., Folgueras, A. R., Seto, E., & Gonzalez, S. (2009). HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer. *Oncogene*, *28*(25), 2370-2382. doi: 10.1038/onc.2009.117
- Lopez-Soto, A., Huergo-Zapico, L., Galvan, J. A., Rodrigo, L., de Herreros, A. G., Astudillo, A., & Gonzalez, S. (2013). Epithelial-mesenchymal transition induces an antitumor immune response mediated by NKG2D receptor. *J Immunol*, *190*(8), 4408-4419. doi: 10.4049/jimmunol.1202950
- Lopez-Soto, A., Quinones-Lombrana, A., Lopez-Arbesu, R., Lopez-Larrea, C., & Gonzalez, S. (2006). Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem*, *281*(41), 30419-30430. doi: 10.1074/jbc.M604868200
- Lopez-Soto, A., Zapico, L. H., Acebes-Huerta, A., Rodrigo, L., & Gonzalez, S. (2013). Regulation of NKG2D signaling during the epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncimmunology*, *2*(9), e25820. doi: 10.4161/onci.25820
- Maasho, K., Opoku-Anane, J., Marusina, A. I., Coligan, J. E., & Borrego, F. (2005). NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol*, *174*(8), 4480-4484.
- Maccalli, C., Scaramuzza, S., & Parmiani, G. (2009). TNK cells (NKG2D+ CD8+ or CD4+ T lymphocytes) in the control of human tumors. *Cancer Immunol Immunother*, *58*(5), 801-808. doi: 10.1007/s00262-008-0635-x
- Maleckar, J. R., & Sherman, L. A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol*, *138*(11), 3873-3876.
- Mato, A. R., Foon, K. A., Feldman, T., Schuster, S. J., Svoboda, J., Chow, K. F., . . . Goy, A. (2015). Reduced-dose fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab (FCR-Lite) plus lenalidomide, followed by lenalidomide consolidation/maintenance, in previously untreated chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol*, *90*(6), 487-492. doi: 10.1002/ajh.23983
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, *12*, 991-1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015

- McCann, F. E., Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R., & Davis, D. M. (2007). The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences. *J Immunol*, *178*(6), 3418-3426.
- McClelland, S. E., Burrell, R. A., & Swanton, C. (2009). Chromosomal instability: a composite phenotype that influences sensitivity to chemotherapy. *Cell Cycle*, *8*(20), 3262-3266.
- McDaniel, J. M., Pinilla-Ibarz, J., & Epling-Burnette, P. K. (2012). Molecular action of lenalidomide in lymphocytes and hematologic malignancies. *Adv Hematol*, *2012*, 513702. doi: 10.1155/2012/513702
- Merlo, L. M., Wang, L. S., Pepper, J. W., Rabinovitch, P. S., & Maley, C. C. (2010). Polyploidy, aneuploidy and the evolution of cancer. *Adv Exp Med Biol*, *676*, 1-13.
- Montel, A. H., Bochan, M. R., Hobbs, J. A., Lynch, D. H., & Brahmi, Z. (1995). Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells. *Cell Immunol*, *166*(2), 236-246. doi: 10.1006/cimm.1995.9974
- Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., . . . Umana, P. (2010). Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*, *115*(22), 4393-4402. doi: 10.1182/blood-2009-06-225979
- Nakamura, K., Nakayama, M., Kawano, M., Amagai, R., Ishii, T., Harigae, H., & Ogasawara, K. (2013). Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(23), 9421-9426. doi: 10.1073/pnas.1300140110
- Nausch, N., Florin, L., Hartenstein, B., Angel, P., Schorpp-Kistner, M., & Cerwenka, A. (2006). Cutting edge: the AP-1 subunit JunB determines NK cell-mediated target cell killing by regulation of the NKG2D-ligand RAE-1epsilon. *J Immunol*, *176*(1), 7-11.
- Nawrocki, S. T., Carew, J. S., Dunner, K., Jr., Boise, L. H., Chiao, P. J., Huang, P., . . . McConkey, D. J. (2005). Bortezomib inhibits PKR-like endoplasmic reticulum (ER) kinase and induces apoptosis via ER stress in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, *65*(24), 11510-11519. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2394
- Nigg, E. A. (2002). Centrosome aberrations: cause or consequence of cancer progression? *Nat Rev Cancer*, *2*(11), 815-825. doi: 10.1038/nrc924
- Nuckel, H., Switala, M., Sellmann, L., Horn, P. A., Durig, J., Duhrsen, U., . . . Rebmann, V. (2010). The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *24*(6), 1152-1159. doi: 10.1038/leu.2010.74
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., . . . Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, *13*(1), 54-61. doi: 10.1038/nm1523
- Olaharski, A. J., Sotelo, R., Solorza-Luna, G., Gonsebatt, M. E., Guzman, P., Mohar, A., & Eastmond, D. A. (2006). Tetraploidy and chromosomal instability are early events during cervical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, *27*(2), 337-343. doi: 10.1093/carcin/bgi218
- Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., . . . Hayday, A. C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*, *6*(9), 928-937. doi: 10.1038/ni1239
- Palmer, S., Hanson, C. A., Zent, C. S., Porrata, L. F., Laplant, B., Geyer, S. M., . . . Shanafelt, T. D. (2008). Prognostic importance of T and NK-cells in a consecutive series of newly diagnosed patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*, *141*(5), 607-614. doi: 10.1111/j.1365-2141.2008.07070.x
- Pavelka, N., Rancati, G., & Li, R. (2010). Dr Jekyll and Mr Hyde: role of aneuploidy in cellular adaptation and cancer. *Curr Opin Cell Biol*, *22*(6), 809-815. doi: 10.1016/j.ceb.2010.06.003

- Pellman, D. (2007). Cell biology: aneuploidy and cancer. *Nature*, *446*(7131), 38-39. doi: 10.1038/446038a
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C. C., Biassoni, R., Conte, R., . . . Moretta, A. (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res*, *62*(21), 6178-6186.
- Petrylak, D. P., Vogelzang, N. J., Budnik, N., Wiechno, P. J., Sternberg, C. N., Doner, K., . . . Fizazi, K. (2015). Docetaxel and prednisone with or without lenalidomide in chemotherapy-naïve patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (MAINSAIL): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet Oncol*, *16*(4), 417-425. doi: 10.1016/S1470-2045(15)70025-2
- Phipps, R. P., Stein, S. H., & Roper, R. L. (1991). A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunol Today*, *12*(10), 349-352. doi: 10.1016/0167-5699(91)90064-Z
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., . . . Engert, A. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKP30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, *27*(6), 965-974. doi: 10.1016/j.immuni.2007.10.010
- Poggi, A., Venturino, C., Catellani, S., Clavio, M., Miglino, M., Gobbi, M., . . . Zocchi, M. R. (2004). Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid. *Cancer Res*, *64*(24), 9172-9179. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2417
- Porrata, L. F., Ristow, K., Habermann, T. M., Witzig, T. E., Inwards, D. J., & Markovic, S. N. (2009). Absolute lymphocyte count at the time of first relapse predicts survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Am J Hematol*, *84*(2), 93-97. doi: 10.1002/ajh.21337
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G. R., Villamor, N., . . . Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, *475*(7354), 101-105. doi: 10.1038/nature10113
- Rai, K. R., Sawitsky, A., Cronkite, E. P., Chanana, A. D., Levy, R. N., & Pasternack, B. S. (1975). Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, *46*(2), 219-234.
- Rajagopalan, H., & Lengauer, C. (2004). Aneuploidy and cancer. *Nature*, *432*(7015), 338-341. doi: 10.1038/nature03099
- Ramsay, A. G., Johnson, A. J., Lee, A. M., Gorgun, G., Le Dieu, R., Blum, W., . . . Gribben, J. G. (2008). Chronic lymphocytic leukemia T cells show impaired immunological synapse formation that can be reversed with an immunomodulating drug. *J Clin Invest*, *118*(7), 2427-2437. doi: 10.1172/JCI35017
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, *3*(10), 781-790. doi: 10.1038/nri1199
- Ray-Coquard, I., Cropet, C., Van Glabbeke, M., Sebban, C., Le Cesne, A., Judson, I., . . . Bone Sarcoma, G. (2009). Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res*, *69*(13), 5383-5391. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3845
- Reiners, K. S., Topolar, D., Henke, A., Simhadri, V. R., Kessler, J., Sauer, M., . . . Pogge von Strandmann, E. (2013). Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood*, *121*(18), 3658-3665. doi: 10.1182/blood-2013-01-476606
- Robak, T. (2009). GA-101, a third-generation, humanized and glyco-engineered anti-CD20 mAb for the treatment of B-cell lymphoid malignancies. *Curr Opin Investig Drugs*, *10*(6), 588-596.

- Rodriguez-Rodero, S., Gonzalez, S., Rodrigo, L., Fernandez-Morera, J. L., Martinez-Borra, J., Lopez-Vazquez, A., & Lopez-Larrea, C. (2007). Transcriptional regulation of MICA and MICB: a novel polymorphism in MICB promoter alters transcriptional regulation by Sp1. *Eur J Immunol*, 37(7), 1938-1953. doi: 10.1002/eji.200737031
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., LeMaoult, J., & Carosella, E. D. (2014). The dual role of HLA-G in cancer. *J Immunol Res*, 2014, 359748. doi: 10.1155/2014/359748
- Rouas-Freiss, N., Moreau, P., Menier, C., & Carosella, E. D. (2003). HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. *Semin Cancer Biol*, 13(5), 325-336.
- Routes, J. M., Ryan, S., Morris, K., Takaki, R., Cerwenka, A., & Lanier, L. L. (2005). Adenovirus serotype 5 E1A sensitizes tumor cells to NKG2D-dependent NK cell lysis and tumor rejection. *J Exp Med*, 202(11), 1477-1482. doi: 10.1084/jem.20050240
- Rygaard, J., & Povlsen, C. O. (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol*, 82(1), 99-106.
- Salih, H. R., Holdenrieder, S., & Steinle, A. (2008). Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci*, 13, 3448-3456.
- Sato, T., Terai, M., Tamura, Y., Alexeev, V., Mastrangelo, M. J., & Selvan, S. R. (2011). Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*, 51(2-3), 170-182. doi: 10.1007/s12026-011-8262-6
- Schafer, P. H., Gandhi, A. K., Loveland, M. A., Chen, R. S., Man, H. W., Schnetkamp, P. P., . . . Stirling, D. I. (2003). Enhancement of cytokine production and AP-1 transcriptional activity in T cells by thalidomide-related immunomodulatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(3), 1222-1232. doi: 10.1124/jpet.102.048496
- Schatton, T., Scolyer, R. A., Thompson, J. F., & Mihm, M. C., Jr. (2014). Tumor-infiltrating lymphocytes and their significance in melanoma prognosis. *Methods Mol Biol*, 1102, 287-324. doi: 10.1007/978-1-62703-727-3\_16
- Schwinn, N., Vokhminova, D., Sucker, A., Textor, S., Striegel, S., Moll, I., . . . Paschen, A. (2009). Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer*, 124(7), 1594-1604. doi: 10.1002/ijc.24098
- Segler, A., & Tsimberidou, A. M. (2012). Lenalidomide in solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*, 69(6), 1393-1406. doi: 10.1007/s00280-012-1874-2
- Senovilla, L., Galluzzi, L., Castedo, M., & Kroemer, G. (2013). Immunological control of cell cycle aberrations for the avoidance of oncogenesis: the case of tetraploidy. *Ann N Y Acad Sci*, 1284, 57-61. doi: 10.1111/nyas.12072
- Senovilla, L., Vacchelli, E., Galon, J., Adjemian, S., Eggermont, A., Fridman, W. H., . . . Galluzzi, L. (2012). Trial watch: Prognostic and predictive value of the immune infiltrate in cancer. *Oncoimmunology*, 1(8), 1323-1343. doi: 10.4161/onci.22009
- Senovilla, L., Vitale, I., Martins, I., Tailler, M., Paillet, C., Michaud, M., . . . Kroemer, G. (2012). An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science*, 337(6102), 1678-1684. doi: 10.1126/science.1224922
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 410(6832), 1107-1111. doi: 10.1038/35074122
- Sher, T., Miller, K. C., Lawrence, D., Whitworth, A., Hernandez-Ilizaliturri, F., Czuczman, M. S., . . . Chanan-Khan, A. A. (2010). Efficacy of lenalidomide in patients with chronic lymphocytic leukemia with high-risk cytogenetics. *Leuk Lymphoma*, 51(1), 85-88. doi: 10.3109/10428190903406806

- Sherr, C. J., & McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell*, 2(2), 103-112.
- Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., . . . et al. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, 68(5), 855-867.
- Simhadri, V. R., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Topolar, D., Simhadri, V. L., Nohroudi, K., . . . Pogge von Strandmann, E. (2008). Dendritic cells release HLA-B-associated transcript-3 positive exosomes to regulate natural killer function. *PLoS One*, 3(10), e3377. doi: 10.1371/journal.pone.0003377
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., . . . Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*, 42(4), 501-510. doi: 10.1016/j.molimm.2004.07.034
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrout, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., . . . Okumura, K. (2001). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med*, 193(6), 661-670.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., & Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol*, 13(4), 459-463.
- Smyth, M. J., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*, 2(4), 293-299. doi: 10.1038/86297
- Smyth, M. J., Swann, J., Cretney, E., Zerafa, N., Yokoyama, W. M., & Hayakawa, Y. (2005). NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med*, 202(5), 583-588. doi: 10.1084/jem.20050994
- Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*, 192(5), 755-760.
- Song, E., Chen, J., Ouyang, N., Su, F., Wang, M., & Heemann, U. (2001). Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer. *Br J Cancer*, 85(7), 1047-1054. doi: 10.1038/sj.bjc.6692042
- Song, H., Hur, D. Y., Kim, K. E., Park, H., Kim, T., Kim, C. W., . . . Cho, D. H. (2006). IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Cell Immunol*, 242(1), 39-45. doi: 10.1016/j.cellimm.2006.09.002
- Spies, T. (2008). Regulation of NKG2D ligands: a purposeful but delicate affair. *Nat Immunol*, 9(9), 1013-1015. doi: 10.1038/ni0908-1013
- Storchova, Z., & Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(1), 45-54. doi: 10.1038/nrm1276
- Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T., & Whiteside, T. L. (2007). A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res*, 13(15 Pt 1), 4345-4354. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0472
- Sun, J. C., & Lanier, L. L. (2009). Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol*, 39(8), 2059-2064. doi: 10.1002/eji.200939435
- Sutton, L., Chevret, S., Tournilhac, O., Divine, M., Leblond, V., Corront, B., . . . Groupe Francais d'etude de la Leucemie Lymphoide, C. (2011). Autologous stem cell transplantation as a first-line treatment strategy for chronic lymphocytic leukemia: a multicenter, randomized,

- controlled trial from the SFGM-TC and GFLLC. *Blood*, 117(23), 6109-6119. doi: 10.1182/blood-2010-11-317073
- Swanton, C., Nicke, B., Schuett, M., Eklund, A. C., Ng, C., Li, Q., . . . Downward, J. (2009). Chromosomal instability determines taxane response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(21), 8671-8676. doi: 10.1073/pnas.0811835106
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 7(9), 880-885. doi: 10.1038/sj.embor.7400779
- Takaki, R., Hayakawa, Y., Nelson, A., Sivakumar, P. V., Hughes, S., Smyth, M. J., & Lanier, L. L. (2005). IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism. *J Immunol*, 175(4), 2167-2173.
- Tang, K. F., Ren, H., Cao, J., Zeng, G. L., Xie, J., Chen, M., . . . He, C. X. (2008). Decreased Dicer expression elicits DNA damage and up-regulation of MICA and MICB. *J Cell Biol*, 182(2), 233-239. doi: 10.1083/jcb.200801169
- Textor, S., Fiegler, N., Arnold, A., Porgador, A., Hofmann, T. G., & Cerwenka, A. (2011). Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res*, 71(18), 5998-6009. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-3211
- Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*, 55(3-4), 329-333.
- Tsavaris, N., Kosmas, C., Vadiaka, M., Kanelopoulos, P., & Boulamatsis, D. (2002). Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer*, 87(1), 21-27. doi: 10.1038/sj.bjc.6600347
- Upshaw, J. L., Arneson, L. N., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D., & Leibson, P. J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol*, 7(5), 524-532. doi: 10.1038/ni1325
- Vales-Gomez, M., Chisholm, S. E., Cassady-Cain, R. L., Roda-Navarro, P., & Reyburn, H. T. (2008). Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors. *Cancer Res*, 68(5), 1546-1554. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-2973
- Venkataraman, G. M., Suci, D., Groh, V., Boss, J. M., & Spies, T. (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol*, 178(2), 961-969.
- Viel, S., Charrier, E., Marcais, A., Rouzair, P., Bienvenu, J., Karlin, L., . . . Walzer, T. (2013). Monitoring NK cell activity in patients with hematological malignancies. *Oncoimmunology*, 2(9), e26011. doi: 10.4161/onci.26011
- Vitale, I., Galluzzi, L., Senovilla, L., Criollo, A., Jemaa, M., Castedo, M., & Kroemer, G. (2011). Illicit survival of cancer cells during polyploidization and depolyploidization. *Cell Death Differ*, 18(9), 1403-1413. doi: 10.1038/cdd.2010.145
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510. doi: 10.1038/ni1582
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Giesecke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., . . . Steinle, A. (2008). Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*, 68(15), 6368-6376. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6768
- Waldhauer, I., & Steinle, A. (2006). Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*, 66(5), 2520-2526. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2520

- Wehner, R., Dietze, K., Bachmann, M., & Schmitz, M. (2011). The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells. *J Innate Immun*, 3(3), 258-263. doi: 10.1159/000323923
- Wierda, W. G., Padmanabhan, S., Chan, G. W., Gupta, I. V., Lisby, S., Osterborg, A., & Hx, C. D. S. I. (2011). Ofatumumab is active in patients with fludarabine-refractory CLL irrespective of prior rituximab: results from the phase 2 international study. *Blood*, 118(19), 5126-5129. doi: 10.1182/blood-2011-04-348656
- Wu, L., Adams, M., Carter, T., Chen, R., Muller, G., Stirling, D., . . . Bartlett, J. B. (2008). lenalidomide enhances natural killer cell and monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity of rituximab-treated CD20+ tumor cells. *Clin Cancer Res*, 14(14), 4650-4657. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4405
- Wu, W., Song, W., Li, S., Ouyang, S., Fok, K. L., Diao, R., . . . Wang, L. (2012). Regulation of apoptosis by Bat3-enhanced YWK-II/APLP2 protein stability. *J Cell Sci*, 125(Pt 18), 4219-4229. doi: 10.1242/jcs.086553
- Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Huang, B., . . . Zhang, R. (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett*, 340(1), 124-133. doi: 10.1016/j.canlet.2013.07.038
- Xiao, C., & Rajewsky, K. (2009). MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 136(1), 26-36. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.027
- Yang, X., Yu, K., Hao, Y., Li, D. M., Stewart, R., Insogna, K. L., & Xu, T. (2004). LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat Cell Biol*, 6(7), 609-617. doi: 10.1038/ncb1140
- Zanetti, M., & Mahadevan, N. R. (2012). Cancer. Immune surveillance from chromosomal chaos? *Science*, 337(6102), 1616-1617. doi: 10.1126/science.1228464
- Zhang, C., Zhang, J., Sun, R., Feng, J., Wei, H., & Tian, Z. (2005). Opposing effect of IFN $\gamma$  and IFN $\alpha$  on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN $\gamma$  on NK cells. *Int Immunopharmacol*, 5(6), 1057-1067. doi: 10.1016/j.intimp.2005.02.003
- Zhang, L., Qian, Z., Cai, Z., Sun, L., Wang, H., Bartlett, J. B., . . . Wang, M. (2009). Synergistic antitumor effects of lenalidomide and rituximab on mantle cell lymphoma in vitro and in vivo. *Am J Hematol*, 84(9), 553-559. doi: 10.1002/ajh.21468
- Zhu, D., Corral, L. G., Fleming, Y. W., & Stein, B. (2008). Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation. *Cancer Immunol Immunother*, 57(12), 1849-1859. doi: 10.1007/s00262-008-0512-7
- Ziegler, H. W., Kay, N. E., & Zarling, J. M. (1981). Deficiency of natural killer cell activity in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Int J Cancer*, 27(3), 321-327.



**ANEXO**

## ARTÍCULOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DE ESTA TESIS

1. Drug-induced hyperploidy stimulates an anti-tumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. **Acebes-Huerta A**, Lorenzo-Herrero S, Folgueras AR, Huergo-Zapico L, Lopez-Larrea C, López-Soto A, Gonzalez S. *Oncoimmunology*. 2015 Oct. doi:10.1080/2162402X.2015.1074378.
2. Lenalidomide induces immunomodulation in chronic lymphocytic leukemia and enhances antitumor immune responses mediated by NK and CD4 T cells. **Acebes-Huerta A**, Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Fernandez-Guizan A, Payer AR, López-Soto A, Gonzalez S. *Biomed Res Int*. 2014;2014:265840. doi: 10.1155/2014/265840.

## OTROS ARTÍCULOS CIENTÍFICOS RELACIONADOS CON EL TEMA DE ESTA TESIS

1. Expansion of NK cells and reduction of NKG2D expression in chronic lymphocytic leukemia. Correlation with progressive disease. Huergo-Zapico L, **Acebes-Huerta A**, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez-García E, Payer AR, Villa-Alvarez M, Fernández-Guizán A, López-Soto A, Gonzalez S. *PLoS One*. 2014 Oct 6;9(10):e108326. doi: 10.1371/journal.pone.0108326. eCollection 2014.
2. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. Huergo-Zapico L, **Acebes-Huerta A**, López-Soto A, Villa-Álvarez M, Gonzalez-Rodriguez AP, Gonzalez S. *Front Immunol*. 2014 Mar 21;5:106. eCollection 2014.
3. NKG2D signaling in cancer immunosurveillance. López-Soto A, Huergo-Zapico L, **Acebes-Huerta A**, Villa-Alvarez M, Gonzalez S. *Int J Cancer*. 2014 Feb 8. doi: 10.1002/ijc.28775.
4. Lenalidomide and chronic lymphocytic leukemia. González-Rodríguez AP, Payer AR, **Acebes-Huerta A**, Huergo-Zapico L, Villa-Alvarez M, Gonzalez-García E, Gonzalez S. *Biomed Res Int*. 2013;2013:932010. doi: 10.1155/2013/932010.
5. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, López-Soto A, Fernandez-Guizan A, **Acebes-Huerta A**, de Los Toyos JR, Lopez-Larrea C, Groh V, Spies T, Gonzalez S. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Aug;61(8):1201-10. doi: 10.1007/s00262-011-1195-z.

6. Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, **Acebes-Huerta A**, Gonzalez-Huerta AJ, Gonzalez E, Fernandez-Alvarez C, Gonzalez S. *Leuk Lymphoma*. 2010 Oct;51(10):1829-36. doi: 10.3109/10428194.2010.503820.
  
7. Chronic Lymphocytic Leukemia (Oppezzo, P.) (InTech, 2012). Capítulo 14: Immune Response and Immunotherapy in Chronic Lymphocytic Leukemia. Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodríguez AP, Contesti J, Fernández-Guizán A, **Acebes-Huerta A**, López-Soto A, Gonzalez S. <http://www.intechopen.com/books/chronic-lymphocytic-leukemia/immune-response-and-immunotherapy-in-chronic-lymphocytic->