

Título del Proyecto

**MODELO DE INTERACCIÓN CÉLULA NK-CÉLULA TUMORAL EN LA LEUCEMIA
AGUDA EN LA INFANCIA**

2012-2015

Patrocinador.

ASOCIACIÓN PABLO UGARTE

Investigadores principales:

Dr. José Luis Fuster Soler (Unidad de Oncohematología Pediátrica)
Dr. Alfredo Minguela (Servicio de Inmunología)
Dr. Miguel Blanquer (Servicio de Hematología)
(Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca)

Equipo Investigador del Hospital U. Virgen de la Arrixaca

Unidad de Oncohematología Pediátrica

1. Juan Francisco Pascual Gázquez
2. Mar Bermúdez Cortés
3. Maria Esther Llinares Riestra
4. Ana Galera Miñarro
5. Lidia Ayllón Gavira
6. Antonio Pérez Martínez

Servicio de Inmunología

7. Dr. José Antonio Campillo Marquina
8. Dra. María Rosa Moya Quiles
9. Dra. Isabel Legaz López
10. Dra. Lourdes Gimeno
11. Dra. María Victoria Bernardo Pisa
12. María Victoria Martínez Sánchez (becaria solicitada)
13. Dra. Rocío Álvarez López (Asesora científica)

Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular (Servicio de Hematología)

14. Dr. Miguel Blanquer Blanquer
15. Andrés Sanchez Salinas
16. Jorge Moserrat Coll
17. Joaquín Gómez Epoch
18. Dra. Carmen Insausti

Servicio de Cirugía Infantil

19. Oscar Girón Vallejo

**MODELO DE INTERACCIÓN CÉLULA NK-CÉLULA TUMORAL EN LA LEUCEMIA
AGUDA EN LA INFANCIA**

Drs. Fuster JL, Minguela A, Blanquer M.

Proyecto patrocinado por la ASOCIACIÓN PABLO UGARTE

RESUMEN

En el proyecto se analizará si la interacción de las moléculas que regulan la función de las células *natural killer* (NK) tiene relación con la susceptibilidad y la evolución de la leucemia aguda de la infancia, y si determinadas combinaciones KIR/HLA-I pueden ayudar a predecir el éxito del tratamiento y la supervivencia de los pacientes. Los resultados obtenidos podrían constituir la base para definir nuevos biomarcadores de valor pronóstico. Además, el mejor conocimiento de los mecanismos que regulan la función de la respuesta anti-tumoral podría contribuir al desarrollo de nuevas terapias individualizadas que modulen la tolerancia inmunológica frente al tumor sin efectos secundarios indeseables. Para ello, en 5 objetivos se analizarán y compararán en un grupo amplio de controles sanos (n=50) y los pacientes de nuevo diagnóstico de leucemia aguda pediátrica de nuestro centro durante la vigencia de este proyecto:

1. Las características biológicas de las células leucémicas y su expresión de ligandos para la interacción de las células natural killer.
2. El perfil genético y la expresión de las moléculas que regulan la función de las células NK (receptores KIR) y la de sus ligandos HLA (HLA-A, B y C).
3. El papel de factores solubles en los pacientes (citoquinas, MICA, etc).
4. La actividad citolítica y anti-tumoral de las células NK de los pacientes frente a las células leucémicas.
5. Correlacionar el estatus del quimerismo de células NK y T *in vivo* con la supervivencia libre de leucemia o recidiva en pacientes sometidos a trasplante alogénico.

ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la primera causa de cáncer en la infancia. Actualmente la tasa de curación supera el 75% y el tratamiento de la mayoría de los pacientes se basa en el empleo de quimioterapia convencional, incluyendo una fase de inducción a la remisión, un tratamiento dirigido al sistema nervioso central, una terapia de intensificación (consolidación) y un tratamiento de continuación o mantenimiento (Pui, et col 2006; Ko, et col 2010). Por tanto la mayoría de pacientes requiere por razones aún no aclaradas un periodo de terapia prolongada de continuación consistente en la administración de quimioterapia de baja intensidad (Pui, et col 2006). Es muy probable que durante esta fase del tratamiento los fenómenos de reconstitución inmunológica contribuyan a la curación, colaborando en la erradicación de la enfermedad residual que queda tras las fases iniciales del tratamiento. La población linfocitaria de células Natural Killer (NK) es la más resistente a la quimioterapia citotóxica y la depleción de la misma inducida por la quimioterapia suele ser de corta duración (Mackall, et col, 1994; Ault, et col, 1985). Las células NK se caracterizan precisamente por su capacidad para destruir de manera espontánea líneas celulares tumorales o infectadas por virus. Por tanto parece justificada la exploración de los fenómenos de reconstitución de la población NK en diferentes etapas tras el diagnóstico y el tratamiento de la leucemia y su contribución a la curación definitiva de estos pacientes.

Por otro lado, a pesar de los excelentes resultados del tratamiento actual de la LAL en la infancia, conviene recordar que la recaída continúa siendo un obstáculo para la curación de esta enfermedad. En los países desarrollados la tasa actual de recaída se aproxima al 20%, por lo que la recidiva de la leucemia constituye un problema frecuente en oncología pediátrica. (Ko, et col, 2010). La tasa de remisión en las recidivas de LAL tras la re-inducción oscila entre 71% y 95% (Rivera, et col, 2005; Malempati, et col, 2007; Nguyen et col, 2008; Chessells, et col, 2003; Roy, et col, 2005; Lawson, et col, 2000; Ko, et al, 2010; Einsiedel, et col; 2005; Reismüller, et col; 2009) pero las posibilidades de que esta segunda remisión sea duradera son escasas con tratamientos basados en quimioterapia convencional (Gaynon, et col, 2006; Einsiedel, et col, 2005; Lawson, et col, 2000; Rivera, et col, 1996; Sadowitz, et col, 1993; Thompson, et col, 2004; Uderzo, et col, 2001). Por tanto, aunque la mayoría de pacientes alcanzan una segunda remisión, el tratamiento de la leucemia en recaída constituye un auténtico desafío ya que sólo un tercio de los pacientes que recaen sobrevivirá a largo plazo a pesar de la aplicación de estrategias intensivas de terapia de segunda línea. Las probabilidades de sufrir una nueva recidiva son elevadas y las tasas de supervivencia libre de evento a largo plazo oscilan entre 16% y 50% según diferentes series (Saarinen-Pihkala, et col, 2006; Rivera, et col, 2005; Malempati, et col, 2007; Nguyen, et col, 2008; Chessells, et col, 2003; Einsiedel, et col, 2005; Gaynon, et col, 2006; Kolb, et col, 2003).

Como consecuencia, el trasplante hematopoyético alogénico se considera indicado como tratamiento de consolidación tras alcanzar una nueva remisión en la mayoría de los casos (Bordigoni, et col, 1998; Ko, et col, 2010). Esta estrategia se asocia a una mortalidad relacionada con el procedimiento de entre el 10% y el 20% dependiendo del tipo de donante y, a pesar de que muchos pacientes superan con éxito el trasplante, el riesgo de una nueva recidiva tras el mismo sigue siendo elevado (Chessells, et col, 1998). Tras una segunda recaída las posibilidades de obtener una nueva remisión se reducen notablemente. Según una reciente revisión, con terapias de tercera, cuarta y sucesivas líneas de tratamiento, las posibilidades de alcanzar una nueva remisión se estiman en 44%, 27% y 12% respectivamente. (Ko, et col, 2010).

La incidencia de la leucemia aguda mieloblástica (LAM) es inferior a la de la LAL y constituye aproximadamente una cuarta parte de todos los casos de leucemia aguda en la infancia. (Meshinchi, Oncologist-2007) Aunque un 80% de pacientes con LAM alcanzan una primera remisión completa, casi la mitad de ellos experimentan una recidiva y actualmente la supervivencia libre de evento a los cinco años se encuentra en torno al 50%. (Pui, JCO-2011)

(Creutzig, Leukemia-2005) (Gibson, Leukemia-2005) (Liang, Leukemia 2006) (Lie, Leukemia-2005) (Ravindranath, Leukemia-2005) (Ribeiro, Leukemia-2005) (Smith, Leukemia-2005) (Gorman, *Pediatr Blood Cancer*-2010)

Los pacientes con LAM en recaída o LAL refractaria que alcanzan de nuevo la remisión completa tras una segunda tentativa de tratamiento pueden obtener una tasa de supervivencia libre de recidiva a los cinco años de 43% y las tasas de supervivencia global referidas por diferentes grupos oscilan entre 23% y 33%. (Gibson, Leukemia-2005) (Gorman, *Pediatr Blood Cancer*-2010) (Rubnitz, *Cancer*-2007) (Aladjidi, *JCO*-2003) (Wells, *JCO*-2003) En este tipo de pacientes que ya han sido tratados enérgicamente, la toxicidad relacionada con el tratamiento sigue siendo significativa a pesar de los avances en los tratamientos de soporte, (Abrahamsson, *Br J Haematol*-2007) y es poco probable que las opciones estándar de la quimioterapia convencional y el trasplante hematopoiético clásico mejoren los resultados en el futuro. Por tanto, es preciso investigar nuevas aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de la LAM cuyo pronóstico sigue siendo globalmente pobre.

Por tanto, para los pacientes con leucemia en situación muy avanzada (recidivas refractarias, segundas o sucesivas recidivas e incluso pacientes en primera recidiva asociada a factores de riesgo) es preciso desarrollar terapias alternativas. Una de estas alternativas podría basarse en explotar la actividad antitumoral innata de las células NK autólogas o alogénicas. Especialmente en el trasplante de médula ósea, se ha demostrado que determinadas combinaciones genéticas entre donante y receptor de las moléculas que regulan la función de las células NK, favorecía la lucha del injerto contra la leucemia, actividad que era conducida principalmente por células NK aloreactivas. El papel de la alorreactividad de las células NK en el tratamiento de la leucemia y tumores sólidos refractarios ha suscitado un gran interés en los últimos años (Aversa, *N Eng J Med*-1998; Koehl, *Klin Padiatr* 2005-2005; Kanold, *Bone Marrow Transplant*-2008; Pérez-Martínez, *Pediatr Blood Cancer*-2009; Klingebiel, *Blood*-2010; Dellabona, *Clin Immunol*-2011; Toporski, *Biol Blood Marrow Transplant*-2009; Huang, *J Hematol Oncol*-2008).

Las células NK constituyen una población relativamente pequeña de linfocitos circulantes que no expresa marcadores propios de los linfocitos T o B maduros, y como ya se ha mencionado, son capaces de destruir de manera espontánea células tumorales. Su capacidad citotóxica es mediada a través de las mismas moléculas empleadas por las células T citolíticas (perforina, granzima, Fas-Fas ligando e interacción TRAIL-receptor TRAIL). Pero, a diferencia de las células T que requieren una activación previa para inducir su expresión de gránulos que contienen perforina y granzima, las células NK expresan de forma natural los gránulos citolíticos y pueden por tanto destruir con celeridad células diana apropiadas. La presencia preformada de gránulos citolíticos en estas células requiere de mecanismos de autoprotección para evitar que puedan liberarse indebidamente y causar daño al propio organismo.

En general las células NK pueden ser activadas por diferentes estímulos como el contacto con células dendríticas, contacto con células que carezcan de HLA-I, la unión de inmunocomplejos IgG, la unión directa de ligandos o señales de "stress" procedentes de patógenos o de células tumorales y por citocinas como IL-1, IL-2, IL-15, IL-18, IL-12, IL-21, SCF, Flt3 e IFN-I (Zamai, *J Immunol*-2007). En la actualidad se sabe que la función de las células citolíticas no solo se regula por moléculas activadoras, como NKp46, NKp44, NKp30, o CD16 (receptores NCR), sino también por moléculas inhibitoras que regulan su función permitiéndolas reconocer lo propio y activarse ante la ausencia de lo propio, o lo que es lo mismo, la ausencia o disminución de la expresión de sus ligandos HLA clase-I (HLA-I). La actividad efectora de las NK y los linfocitos TCD8+ está regulada por el balance entre señales de activación e inhibición (Bakker, *J Immunol*-1998).

Los ligandos de NCR no se expresan en condiciones normales en células en reposo, sin embargo tras la infección viral o transformación tumoral aumenta su expresión (Moretta, *Semin Immunol*-2006). Los ligandos de NKG2D, MIC A/B y ULBP, son moléculas con un

dominio alfa similar a la proteína HLA-I pero sin la asociación a la b-2 microglobulina. La expresión de estos ligandos está determinada de manera directa por estímulos de "stress" celular como la elevada temperatura, la transformación tumoral o las infecciones virales. De hecho se expresan en tumores como carcinomas, melanomas y leucemias agudas linfoblásticas T (*Pende, Mol Immunol-2005*). Algunos tumores como el neuroblastoma y el carcinoma de próstata disminuyen la expresión de estos ligandos ocasionando resistencia a la lisis a través de estos receptores de las células NK y progresión de la enfermedad. La expresión de los ligandos de DNAM-1, CD155 y nectina-2, determinan la citotoxicidad a través de este receptor. Tumores como el neuroblastoma, melanoma y algunos carcinomas expresan estos ligandos actuando de manera sinérgica junto con los ligandos de los receptores de los NCR, amplificando la citotoxicidad mediada por las células NK.

Los receptores que regulan la función de las células NK incluyen los pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (KIR) y aquellos pertenecientes a la familia de receptores de lectina tipo-C (*Moretta, Eur J Immunol-1997*). Los genes KIR forman una familia multigénica de 16 genes (14 genes y 2 pseudogenes) que mapea en el cromosoma 19 (19q13.4) como parte del Complejo de Receptores Leucocitarios o LRC (Leukocyte Receptor Complex) (*Wende, Mamm Genome-1999*). El cluster de genes KIR presenta un alto grado de polimorfismo y diversidad alélica, por lo que sus combinaciones pueden variar de un individuo a otro tanto en número como en tipo de genes. Hasta ahora se han descrito más de 100 haplotipos KIR, cuyas frecuencias varían en las distintas poblaciones (*Shilling, J Immunol-2002*). De estos genes 14 codifican moléculas receptoras y 2 son pseudogenes y los genes 2DL4, 3DL2 y 3DL3, denominados genes "Framework", probablemente ancestrales, acumulan una mayor diversidad alélica y están presentes en toda la población.

Estructuralmente, los receptores KIR (CD158) son moléculas que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, pudiendo distinguir dos tipos según tengan dos (KIR2D) o tres (KIR3D) dominios de inmunoglobulina en la región extracelular, codificados por los exones 3, 4, 5 y, responsables de la interacción con sus ligandos específicos, las moléculas HLA-I. Además, dependiendo de la estructura de su tallo citoplasmático pueden actuar como formas inhibitoras o formas activadoras (*Parham, Nat Rev Immunol-2005*). Así, los receptores de tallo largo (2DL1, 2DL2/3, 3DL2 y 3DL3) están dotados de dominios estructurales ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) que tras fosfo-tirosinación se acoplan a proteínas adaptadoras (ej. SHP-1) desencadenando una inhibición de la función celular o, corto (2DS1/2/3/4/5; 3DS1), con una lisina en la región transmembrana, que les permite la unión al adaptador DAP12 portador de dominios ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif), y que facilita el acoplamiento a otros adaptadores (ej. Syk o ZAP70) responsables de la activación celular. La excepción es KIR2DL4 (CD158d), pues aunque porta tallo largo tiene una función principalmente activadora, relacionada con una modificación puntual en el dominio transmembrana, que propicia acoplamiento a moléculas adaptadoras con dominios ITAM.

Los receptores KIR2DL1/2/3, KIR2DS1/2 y KIR3DL1/2, interaccionan con moléculas HLA-I clásicas (HLA-A,-B y -C), mientras KIR2DL4 lo hace con la molécula no clásica HLA-G. HLA-C es el único locus donde todos los alelos son ligandos para KIR y cuya especificidad para receptores KIR viene determinada por un cambio en la secuencia de aminoácidos, asparragina (Asn) por Lysina (Lys) en la posición 80 de la hélice alpha1. Esto permite distinguir dos grupos de alelos HLA-C: grupo 1 (C1) con motivos Asn80 (HLA-C*01,03,07,08,12,14,16), ligandos para KIR2DL2/3 (CD158b1/b2) y KIR2DS2 (CD158j) y grupo 2 (C2), con motivos Lys80 (HLA-C*02,04,05,06,15,1602,17,18), ligandos para KIR2DL1 (CD158a) y KIR2DS1 (CD158h) (*Parham, Nat Rev Immunol-2005; Mandelboim J Exp Med-1996*). Los alelos HLA-A y -B que contienen el antígeno público Bw4, también muestran dimorfismo funcional en la posición 80 (Isoleucina -Ile- o Treonina -Thr-), lo que les confiere capacidad para actuar como ligandos para KIR3DL1; los alelos HLA-A3 y A-11 son ligandos para KIR3DL2. Tanto KIR3DL1 como KIR3DL2 tienen con función

inhibidora (Moreta, Curr Opin Immunol-2004). Los ligandos para KIR2DL5A/B, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DL3 son desconocidos.

Respecto a los receptores de tipo lectina, existen formas inhibidoras NKG2A y B, y formas activadoras NKG2C y E, aunque todos ellos tienen como ligando HLA-E. NKG2D se expresa en células NK, linfocitos TCD8⁺ y linfocitos Tgamma-delta y estructuralmente está compuesto por dos moléculas formando un homodímero asociado a una proteína adaptadora DAP10, que es necesaria para transmitir señales de activación cuando se une a sus ligandos específicos, "histocompatibility complex class I chain-related A" (MICA) y "UL-16-binding protein" (ULBP) (Raulet, Nature reviews immunology 2003). Los ligandos de NKG2D son fragmentos de la cadena proteica HLA clase I que se expresan en bajos niveles en células normales y aumentan cuando la célula recibe señales de transformación o stress (Cerwenka, Nat Rev Immunol-2001). Estas moléculas son MIC-A, MIC-B, y las proteínas relacionadas con HLA-I conocidos como ULBP 1-3, y se encuentran sobreexpresadas en células tumorales (Smyth, J Exp Med-2004). Los ligandos de DNAM-1 son el receptor del poliovirus (CD155) y la nectina-2 (CD112), que en ocasiones se encuentran sobreexpresados en células tumorales (Pende, et col, 2005). La molécula CD16 en la superficie de las células NK se une a la porción Fc de las inmunoglobulinas IgG mediando la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Trinchera, Adv Immunol-989). Se ha descrito que las células NK además presentan en su superficie receptores toll-like receptors (TLRs) (Pérez-Martínez, Biol Blood Marrow Transplant-011; Lauzon, Cell Immunol-2006). La activación de las células NK a través de los TLRs con sus respectivos ligandos, productos de virus y bacterias (LPS, a-CpG) aumenta la expresión de moléculas estimuladoras (CD25 y CD69) y la secreción de IFN- γ y TNF- α . La estimulación de las células NK a través de esta vía constituye una nueva línea de investigación en el papel de la respuesta innata frente a las células tumorales.

Hoy en día se sabe que las células malignas acumulan alteraciones genéticas que modulan la expresión de moléculas susceptibles de ser reconocidas como peligrosas por las células efectoras del sistema inmunitario. Entre otras anomalías, la alteración en la expresión de las moléculas de HLA representa un evento muy frecuente. En estas circunstancias la función antitumoral de las células NK cobra particular relevancia, ya que las moléculas que portan en la superficie confieren a las células NK la capacidad de sentir sutiles pérdidas en cantidad y/o calidad de las moléculas HLA que expresan las células potencialmente malignas, y con ello activarse y eliminarlas (Carrega, Plos One-2009). Las células NKs son especialmente eficaces en la eliminación de células tumorales simples, leucemias, linfomas, y consecuentemente, células metastáticas que puedan circular por la sangre o la linfa (Ruggeri, J Immunother-2005). Por esta razón, se ha sugerido que el perfil genético del paciente, y en particular de los genes HLA y KIR, puede condicionar la respuesta inmunitaria y como resultado la aparición y la progresión del tumor. En los últimos años, el grupo de inmunología de nuestro centro ha descrito que HLA-C juega un papel importante en la respuesta inmunitaria tanto en trasplante hepático como en melanoma (Moya-Quiles, Liver Transp.-2003; Campillo, Immunogenetics-2006). Y datos más recientes parecen implicar también al perfil genético de los genes KIR en la susceptibilidad a melanoma y mieloma (datos aún sin publicar). Para comprender correctamente el funcionamiento de las células NK debemos de tener en cuenta que durante su desarrollo, el reconocimiento de las moléculas propias de HLA-I promueve su maduración y su competencia funcional ("NK cell licensing"), mientras que la falta de auto-reconocimiento a través de receptores KIR o NKG2A lleva a una maduración incompleta y a células hiporrespondedoras (Kim Nature-2005; Anfossi Immunity-2006; Béziat PLoS ONE-2010), o lo que es lo mismo insensibles a la pérdida de sus ligandos HLA.

En el presente proyecto, estudiaremos si la interacción de las moléculas que regulan la función de las células NK tiene relación con la susceptibilidad y la evolución de la LAL pediátrica, y si determinadas combinaciones KIR/HLA pueden ayudar a predecir la evolución de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes. Los resultados obtenidos podrían

constituir la base para la definición de nuevos biomarcadores con valor pronóstico. Además, el mejor conocimiento de los mecanismos que regulan la función de las células de la respuesta anti-tumoral podría ser de gran importancia para plantear nuevas estrategias terapéuticas individualizadas que medien en la ruptura de la tolerancia inmunológica frente al tumor sin efectos secundarios indeseables. La multidisciplinaridad y la experiencia acreditada del grupo, avalan la consecución de los objetivos propuestos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahamsson J, Clausen N, Gustafsson G, et al. Improved outcome after relapse in children with acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2007;136(2):229-36
- Aladjidi N, Auvrignon A, Leblanc T, et al. Outcome in children with relapsed acute myeloid leukemia after initial treatment with the French Leucémie Aiguë Myéloïde Enfant (LAME) 89/91 protocol of the French Society of Pediatric Hematology and Immunology. *J Clin Oncol* 2003;21(23):4377-85
- Anfossi N, et al. Human NK Cell Education by Inhibitory Receptors for MHC Class I. *Immunity* 2006; 25:331-42.
- Ault KA, Antin JH, Ginsburg D, et al. Phenotype of recovering lymphoid cell populations after marrow transplantation. *J Exp Med* 1985;161:1483-1502.
- Aversa F, Tabilio A, Velarde A, et al. Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. *N Eng J Med* 1998;339(17):1186-93
- Bakker ABH, et al. Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells, gamma-delta T cells, and antigen-specific CTL. *J Immunol* 1998; 160:5239-45.
- Bakker AB, Wu J, Phillips JH, et al. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 2000;61(1):18-27
- Barkholt L, Bregni M. Current immunotherapy for solid tumors. *Immunotherapy* 2009;1(1):483-93
- Béziat V, et al. NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs. *PLoS ONE* 2010; 5:1-12.
- Bordignon P, Esperou H, Souillet G, et al. Total body irradiation-high-dose cytosine arabinoside and melphalan followed by allogeneic bone marrow transplantation from HLA-identical siblings in the treatment of children with acute lymphoblastic leukaemia after relapse while receiving chemotherapy: a Societe Francaise de Greffe de Moelle study. *Br J Haematol* 1998;102:656-665
- Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):795-9.
- Burshtyn DN, Lam AS, Weston M, et al. Conserved Residues Amino-Terminal of Cytoplasmic Tyrosines Contribute to the SHP-1-Mediated Inhibitory Function of Killer Cell Ig-Like Receptors. *J Immunol* 1999;162(2):897-902
- Campillo JA, et al. HLA class I and class II frequencies in patients with cutaneous malignant melanoma from southeastern Spain: the role of HLA-C in disease prognosis. *Immunogenetics* 2006; 57:926-33.
- Carbone E, Neri P, Mesuraca M, et al. HLA class I, NKG2D, and natural cytotoxicity receptors regulate multiple myeloma cell recognition by natural killer cells. *Blood* 2005;105(1):251-8
- Carrega P, et al. Susceptibility of human melanoma cells to autologous natural killer (NK) cell killing: HLA-related effector mechanisms and role of unlicensed NK cells. *Plos One* 2009;4:e8132.

- Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001;1(1):41-9
- Chessells JM. Relapsed lymphoblastic leukaemia in children: a continuing challenge. *Br J Haematol* 1998;102:423-438
- Chessells JM, Veys P, Kempinski H, et al. Long term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003;123:396-405
- Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;99(10):3661-7
- Creutzig U, Zimmermann M, Ritter J, et al. Treatment strategies and long-term results in paediatric patients treated in four consecutive AML-BFM trials. *Leukemia* 2005;19(12):2030-2042
- Dellabona P, Casorati G, de Lalla C, et al. On the use of donor-derived iNKT cells for adoptive immunotherapy to prevent leukemia recurrence in pediatric recipients of HLA haploidentical HSCT for hematological malignancies. *Clin Immunol* 2011;140(2):152-9
- Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial Acute Lymphoblastic Leukemia-Relapse Study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23(31):7942-7950
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997;18(2):89-95
- Frankel TL, Burns W, Riley J, et al. Identification and characterization of a tumor infiltrating CD56(+)/CD16(-) NK cell subset with specificity for pancreatic and prostate cancer cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 2010;59(12):1757-69
- García-Lora A, Algarra I, Garrido F. MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 2003;195(3):346-355
- Gaynon P, Harris RE, Altman AJ, et al. Chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia and an initial bone marrow relapse within 12 months of the completion of primary therapy : Children's Oncology Group Study CCG-1941. *J Clin Oncol* 2006;24(19):3150-3156
- Gibson BES, Wheatley K, Hann IM, et al. Treatment strategy and long-term results in paediatric patients treated in consecutive UK AML trials. *Leukemia* 2005;19(12):2130-2138
- Gorman MF, Lingyun J, Ko RH, et al. Outcome of children treated for relapsed or refractory acute myelogenous leukemia (rAML) : a Therapeutic Advances in Childhood Leukemia (TACL) Consortium Study. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55(3):421-429
- Huang Xj. Current status of haploidentical stem transplantation for leukaemia. *J Hematol Oncol* 2008;1:27
- Kanold J, Paillard C, Tchirkov A, et al. Allogeneic or haploidentical HSCT for refractory or relapsed solid tumors in children: toward a Neuroblastoma model. *Bone Marrow Transplant* 2008;42:S25-S30
- Kim S, et col. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 2005; 436: 709-13.
- Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003;8(3):223-46
- Klingebiel T, Cornish J, Labopin M, et al. Results and factors influencing outcome after fully haploidentical stem cell transplantation in children with very high-risk acute lymphoblastic leukemia : impact of center size : an analysis on behalf of the Acute Leukemia and Pediatric Disease Working Parties of the European Blood and Marrow Transplanta group. *Blood* 2010;115(17):3437-3446
- Ko RH, Ji L, Barnette P, et al. Outcome of patients treated for relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a therapeutic advances in childhood leukemia consortium study. *J Clin Oncol* 2010;28(4):648-654

- Koehl U, Esser R, Zimmermann S, et al. Ex vivo expansión of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klin Padiatr* 2005;217(6):345-50
- Kolb EA, Steinherz PG. A new multidrug reinduction protocol with topotecan, vinorelbine, thiopeta, dexamethasone, and gemcitabine for relapsed or refractory acute leukaemia. *Leukemia* 2003;17:1967-1972
- Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, et al. The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cell Immunol* 2006;241(2):102-12
- Lawson SE, Harrison G, Richards S, et al. The UK experience in treating childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the Medical Research Council UKALLR1 study. *Br J Haematol* 2000;108:531-543
- Leung W, Campana D, Yang J, et al. High success rate of hematopoietic cell transplantation regardless of donor source in children with very high-risk leukaemia. *Blood* 2011;118(2):223-30
- Liang DC, Chang TT, Lin KH, et al. Improved treatment results for childhood acute myeloid leukemia in Taiwan. *Leukemia* 2006;20(1):136-41
- Lie SO, Abrahamsson J, Clausen N, et al. Long-term results in children with AML : NOPHO-AML Study Group – report of three consecutive trials. *Leukemia* 2005;19(12):2090-2100
- Mackall CL, Fleisher TA, Brown MR, et al. Lymphocyte depletion during treatment with intensive chemotherapy for cancer. *Blood* 1994;84:2221-2228.
- Malempati S, Gaynon PS, Sather H, et al. Outcome after relapse among children with standard-risk acute lymphoblastic leukaemia: Children's Oncology Group Study CCG-1952. *J Clin Oncol* 2007;25(36):5800-5807
- Mandelboim O, et al. Protection from lysis by Natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility complex molecules, *J Exp Med* 1996; 184:913-22
- Meshinchi S, Arceci RJ. Prognostic factors and risk-based therapy in pediatric acute myeloid leukaemia. *Oncologist* 2007;12:341-355
- Middleton D, et al. Analysis of KIR gene frequencies in HLA class I characterised bladder, colorectal and laryngeal tumours. *Tissue Antigens*. 2007; 69:220-6.
- Moretta L, Moretta A. Killer immunoglobulin-like receptors, *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 626-33.
- Moretta, A et al. Function and specificity of human natural killer receptors. *Eur J Immunol* 1997; 24:455-68.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006;18(3):151-8
- Moya-Quiles MR, et al. Human leukocyte antigen-C in short- and long-term liver graft acceptance. *Liver Transpl* 2003; 9:218-27.
- Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukaemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008;22(21):2142-2150
- O'Connor D, Sibson K, Caswell M, et al. Early UK experience in the use of clofarabine in the treatment of relapsed and refractory paediatric lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2011
- Parham P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival, *Nat Rev Immunol* 2005; 5:201-14.
- Pende D, Bottino C, Castriconi R, et al. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol Immunol* 2005;42(4):463-9

- Perez-Martínez A, Iyengar R, Gan K, et al. Blood dendritic cells suppress NK cell function and increase the risk of leucemia relapse after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17(5):598-607
- Perez-Martínez A, Leung W, Muñoz E, et al. KIR-HLA receptor-ligand mismatch associated with a grafo-versus-tumor effect in haploidentical stem cell transplantation for pediatric metastatic solid tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(1):120-4
- Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukaemia: an update. *J Clin Oncol* 2011;29(5):551-565
- Pui CH, Evans WE, Treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *N Eng J Med* 2006;354(2):166-178
- Raetz EA, Borowitz MJ, Devidas M, et al. Reinduction platform for children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukaemia: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2008;26(24):3971-3978
- Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, et al. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 2004;6(5):558-68
- Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands, *Nature reviews immunology* 2003;3(10):781-90
- Ravindranath Y, Chang M, Steuber CP, et al. Pediatric Oncology Group (POG) studies of acute myeloid leukemia (AML): a review of four consecutive childhood AML trials conducted between 1981 and 2000. *Leukemia* 2005;19(12):2101-2116
- Reismüller B, Attarbaschi A, Peters C, et al. Long-term outcome of initially homogeneously treated and relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia in Austria – A population-based report of the Austrian Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) Study Group. *Br J Haematol* 2008;144:559-570
- Ribeiro RC, Razzouk BI, Pounds S, et al. Successive clinical trials for childhood acute myeloid leukaemia at St Jude Children's Research Hospital, from 1980 to 2000. *Leukemia* 2005;19(12):2125-2129
- Rivera GK, Hudson MM, Liu Q, et al. Effectiveness of intensified rotational combination chemotherapy for late hematologic relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996;88(3):831-837
- Rivera GK, Zhou Y, Hancock, ML, et al. Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2005;103(2):368-376
- Roy A, Cargill A, Love S, et al. Outcome after first relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia – lessons from the United Kingdom R2 trial. *Br J Haematol* 2005;130:67-75
- Rubnitz JE, Razzouk BI, Lensing S, et al. Prognostic factors and outcome of recurrence in childhood acute myeloid leukemia. *Cancer* 2007;109(1):157-63
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 2002;295(5562):2097-100
- Ruggeri L, et al. Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother* 2005; 28:175–82.
- Saarinen-Pihkala UM, Heilmann C, Winiarski J, et al. Pathways through relapses and deaths of children with acute lymphoblastic leukaemia: role of allogeneic stem-cell transplantation in Nordic data. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5750-5762
- Sadowitz PD, Smith SD, Shuster J, et al. Treatment of late bone marrow relapse in children with acute lymphoblastic leukaemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1993;81(3):602-609
- Shilling HG, et al. Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002; 168:2307-15.
- Smith FO, Alonzo TA, Gerbing RB, et al. Long-term results of children with acute myeloid leukaemia: a report of three consecutive Phase III trials by the Children's Cancer Group: CCG 251, CCG 213 and CCG 2891. *Leukemia* 2005;19(12):2054-2062

- Smyth ML, Swann J, Kelly JM, et al. NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 2004;200(10):1325-35
- Thompson B, Park JR, Felgenhauer J, et al. Toxicity and efficacy of intensive chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) after first bone marrow or extramedullary relapse. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43:571-579
- Toporski J, Garkavij, Tennvall J, et al. High-dose iodine-131-metaiodobenzylguanidine with haploidentical stem cell transplantation and posttransplant immunotherapy in children with relapsed/refractory Neuroblastoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009;15:1077-1085
- Trincheri G. Biology of natural Killer cells. *Adv Immunol* 1989;47:187-376
- Triplett BM, Horwitz EM, Iyengar R, et al. Effects of activating NK cell receptor expression and NK cell reconstitution on the outcomes of unrelated donor hematopoietic cell transplantation for hematologic malignancies. *Leukemia* 2009;23(7):1278-87
- Uderzo C, Conter V, Dini G, et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica* 2001;86(1):1-7
- Van de Berg H, de Groot-Kruseman HA, Damen-Korbijn CM et al. Outcome after first relapse in children with acute lymphoblastic leucemia: A report based on the Dutch Childhood Oncology Group (DCOG) Relapse ALL 98 Protocol. *Pediatr Blood Cancer* 2011;57:210-216
- Voskens CJ, Watanabe R, Rollins S, et al. Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 2010;29:134
- Wells RJ, Adams MT, Alonzo TA, et al. Mitoxantrone and cytarabine induction, high-dose cytarabine, and etoposide intensification for pediatric patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia: Children's Cancer Group Study 2951. *J Clin Oncol* 2003;21(15):2940-47
- Wende H, et al. Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4, *Mamm Genome*. 1999; 10:154-60
- Zamai I, Ponti C, Mirandola P, et al. NK cells and cancer. *J Immunol* 2007;178(7):4011-6

OBJETIVO DEL PROYECTO

El objetivo principal de este proyecto es **analizar el papel que la interacción de las células tumorales** de los pacientes pediátricos diagnosticados de leucemia aguda en nuestro centro **y las células NK autólogas o alogénicas tiene en la susceptibilidad, la evolución clínica y la respuesta al tratamiento de la enfermedad** y estudiar su potencialidad **para diseñar futuros ensayos clínicos de terapia celular**.

Para ello se plantean los siguientes objetivos parciales:

1. Analizar las características biológicas de las células leucémicas en cuanto a su perfil fenotípico (Inmunofenotipo) y genético (Cariotipo y FISH), ploidía y ciclo celular y de expresión de ligandos para la interacción de las células natural killer como HLA clase-I, MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112.
2. Estudiar el perfil genético de las moléculas que regulan la función de las células Natural Killer –NK- (receptores KIR) y la de sus ligandos HLA (HLA-A, B y C) en el paciente y el donante (cuando corresponda), así como la expresión protéica de los receptores KIR2D en células T y NK, y relacionarlo con las características biológicas, clínicas y evolutivas de la enfermedad.
3. Analizar el papel de factores solubles en el suero de los pacientes (citoquinas, MICA, etc) que guardan relación con la función de las células NK en diferentes fases del tratamiento: al diagnóstico, tras la inducción a la remisión, tras el tratamiento de consolidación, a mitad de la fase de mantenimiento, al finalizar y a los 6 y 12 meses tras finalizar el tratamiento.
4. Evaluar la actividad citolítica y anti-tumoral de las células NK de los pacientes frente a las células leucémicas mediante ensayo de citotoxicidad por citometría de flujo y análisis de la expresión de CD107a a los 6 y 12 meses tras finalizar el tratamiento. Para ello se enfrentarán a las células leucémicas criopreservadas al diagnóstico, células NK del paciente (autólogas) o, en aquellos casos en los que el tratamiento incluya el trasplante hematopoyético, las células NK del donante.
5. Correlacionar el estatus del quimerismo de células NK y T *in vivo* con la supervivencia libre de leucemia o recidiva en pacientes sometidos a trasplante alogénico.

METODOLOGÍA

1. DISEÑO Y TIPO DE ESTUDIO

El presente proyecto se diseña para valorar el impacto que la regulación de la respuesta de células NK y T, puede tener en la susceptibilidad, la eficacia del tratamiento, y la evolución medida como supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en pacientes con leucemia aguda de la infancia. Es un proyecto prototipo de investigación traslacional, multidisciplinar pues involucra a pediatras-oncólogos, inmunólogos y hematólogos, con un componente de investigación básica y otro de investigación clínica, que comporta un estudio prospectivo longitudinal (de pacientes de nuevo diagnóstico) y retrospectivo (de pacientes ya diagnosticados y tratados). Se estructura en 5 objetivos para valorar: 1) Las características biológicas de las células leucémicas y su expresión de ligandos para la interacción de las células natural killer; 2) El perfil genético y la expresión de las moléculas que regulan la función de las células NK (receptores KIR) y la de sus ligandos HLA (HLA-A, B y C); 3) El papel de factores solubles en los pacientes (citoquinas, MICA, etc); 4) La actividad citolítica y anti-tumoral de las células NK de los pacientes frente a las células leucémicas; y 5) La correlación entre el estatus del quimerismo de células NK y T *in vivo* y la supervivencia libre de leucemia o recidiva en pacientes sometidos a trasplante alogénico.

2. SUJETOS DE ESTUDIO Y MUESTRAS REQUERIDAS

Se obtendrá consentimiento informado de cada control sano y paciente (Anexo-I).

2.1 GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPO I - Control sano: Se analizará tanto el perfil genético de receptores KIR y HLA-I como la expresión de receptores KIR2D en células NK y T en **50 controles sanos** de edad y sexo comparable al grupo de leucemias agudas infantiles.

GRUPO II – Leucemias agudas pediátricas: Se estudiarán 50 controles y los pacientes con leucemias agudas de la infancia diagnosticados en el Servicio de Pediatría del Hospital U. Virgen de la Arrixaca, que da cobertura a toda la región de Murcia. Y que se estima en 10-15 anuales.

2.2 MUESTRAS REQUERIDAS: se obtendrán las siguientes muestras de los controles sanos, de los donantes de trasplantes alogénicos y de los pacientes:

Controles sanos:

C1- **3ml de sangre periférica (SP) sin anticoagulantes** para obtener suero y medir factores solubles.

C2- **2ml de SP anticoagulada con EDTA** (genética y expresión de receptores KIR).

C3- **5-10ml de SP anticoagulada con Heparina** en controles seleccionados en base a su perfil de genes KIR y ligandos HLA-I para estudiar la actividad citolítica y antitumoral de las células NKs.

En los niños de menor peso (menor de 15Kg??) estas extracciones se harán en dos momentos diferentes, para evitar extracciones con tanto volumen.

Donantes de células progenitoras:

D1- **3ml de SP sin anticoagulantes** para obtener suero y medir factores solubles

D2- **2ml de SP anticoagulada con EDTA** (genética y expresión de receptores KIR).

D3- **10-15ml de SP anticoagulada con Heparina** para estudiar la actividad citolítica y antitumoral de las células NKs frente a las células leucémicas del paciente receptor.

Pacientes:

Los tipos de muestras que se obtendrán de los pacientes serán:

- P1- **5-7ml de muestras de médula ósea (MO) al diagnóstico** para el fenotipado (citometría multiparamétrica), genotipado KIR/HLA-I (extracción de DNA), expresión de ligandos KIR (extracción de RNA) y criopreservación de células leucémicas a utilizar en los ensayos funcionales de células NKs posteriormente.
- P2- **3ml de muestras de MO** en los diferentes puntos del seguimiento de la enfermedad y evaluar la eficacia de los tratamientos.
- P3- **3ml de SP sin anticoagulantes** para obtener suero y medir factores solubles
- P4- **1ml de SP anticoagulada con EDTA** (genética y expresión de receptores KIR).
- P5- **5ml de SP anticoagulada con EDTA** (purificación de células NKs y T para realizar estudio de quimerismo).
- P6- **10ml de SP anticoagulada con Heparina** para estudiar la actividad citolítica y antitumoral de las células NKs frente a las células leucémicas del paciente receptor.

En cada momento del seguimiento las muestras a obtener serán:

- en el diagnóstico inicial de la enfermedad: P1, P3, P4
- tras la inducción a la remisión: P2, P3
- tras el tratamiento de consolidación: P2, P3
- a mitad de la fase de mantenimiento: P2, P3
- al finalizar el tratamiento: P2, P3
- a los 6 meses tras finalizar el tratamiento: P2, P3, P6
- a los 12 meses tras finalizar el tratamiento: P2, P3, P6

2.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN: Se incluirán pacientes que acepten el consentimiento informado con leucemia aguda de la infancia y una edad inferior a los 14 años. Para el estudio celular solo se incluirán los pacientes de nuevo diagnóstico, donantes y controles sanos, que no presenten enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias, infecciones relevantes u otros procesos tumorales que puedan afectar los parámetros analizados.

3. VARIABLES DE ESTUDIO

3.1. Variables demográficas y clínicas: Edad, sexo, y todas las recogidas en la ficha técnica de recogida de datos clínicos (Anexo-II).

3.2. Variables experimentales, las descritas en la metodología y que se resumen de forma muy breve a continuación por objetivos:

Objetivo-1: características biológicas de las células leucémicas, Inmunofenotipo, Cariotipo y FISH y de expresión de ligandos de receptores KIR (HLA clase-I, MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112).

Objetivo-2: Genotipo HLA-I (alotipos y subgrupos de ligandos KIR) y genotipo KIR (genes y haplotipos), e interacciones KIR/ligando.

Objetivo-3: Factores solubles (citoquinas, MICA, etc).

Objetivo-4: Actividad citolítica y liberación de gránulos citotóxicos de células NK (CD107a) frente a células leucémicas.

Objetivo-5: Estatus de quimerismo en células totales, células MK y células T de sangre periférica.

4. METODOLOGÍA.

Todo el trabajo experimental se llevará a cabo en el Servicio de Inmunología del Hospital U. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia, siguiendo la metodología que se describe a continuación por objetivos. A excepción del estudio de cariotipo de las células leucémicas que se remitirán a un centro de referencia.

❖ **OBJECTIVO 1. Estudiar las características biológicas de las células leucémicas, inmunofenotipo, ploidía y ciclocelular, Cariotipo y FISH y de expresión de ligandos de receptores KIR.**

Los Dres. Minguela y Campillo son expertos en el estudio de inmunofenotipo, moleculares y de FISH de las leucemias infantiles, y ayudados por la becaria realizarán todas las metodologías necesarias para completar el objetivo.

El estudio de inmunofenotipo de las células leucémicas se realiza de rutina mediante citometría multiparamétrica de 8 colores, para ensayar los marcadores CD3sup, CD3cit, CD4, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD33, CD34, CD36, CD38, CD41/42/61, CD45, CD56, CD58, CD64, CD66, CD79aCit, CD79b, CD117, IgMsup, IgMcit, DR, Tdt-Cit, Glicoforina-A y MPO.

Además, se realizará estudio de ciclo y ploidía celular lo que nos dará información sobre la presencia de Aneuploidías cromosómicas y el grado de proliferación de las células tumorales, igualmente mediante citometría de flujo, utilizando el kit Cycloscope-ALL-B (Cytognos).

Para la realización del estudio FISH, en estos casos es precisa la previa purificación de células B que se lleva a cabo mediante la incubación con *RosetteSep*® de esta estirpe celular y separación mediante gradiente de densidad (*Lymphoprep*®). Tras la obtención de los linfocitos B, la población es sometida a un choque osmótico con una solución de cloruro potásico (KCl-0'075M) y a la fijación celular lavando con reactivo de Carnoy (3:1 metanol:acético). Sobre un portaobjetos adaptado al kit de hibridación (específico para LLA-B), se depositan gotas de la suspensión celular fijada. Sobre cada cuadro del portaobjetos, se deposita una alícuota del buffer de hibridación y se coloca el cubreobjetos que incorpora las sondas FISH, para detección de las siguientes alteraciones en LLA-B: c-Myc Breakapart, p16 Deletion, E2A Breakapart, Hyperdiploidy (D10Z1, D17Z1, CHIC2 o Cromosomas 10, 17 y 4, respectivamente), TEL/AML1 Traslocation, MLL Breakapart, BCR/ABL Traslocation, IgH Breakapart. Y las siguientes para la LMA: delección 5q31, PML/RAR, rotura MLL, AML1/ETO t(8;21), DEK/NUP214 t(6;9), Cromosoma 8, inv(16)CBFB, delección 7q22 y 7q31 (Cromosoma 7), delección p53, Rotura de EVI1, rotura RARA (17q21.1). Tras desnaturalización a 80°C durante 4 minutos, se hibridan a 37°C durante 16-24 horas (overnight), se lavan y montan lo con tinción de contraste (DAPI) para su análisis al microscopio.

Además, mediante estudio molecular por nested-PCR se estudiarán un total de 28 roturas cromosómicas mediante método comercial (mDx Hemavision -Biorrad, Ref. HV0128N-) lo que nos permitiera alcanzar elevadas sensibilidades para el seguimiento post-terapia de los pacientes y detectar las recaídas de forma temprana.

La expresión de los ligandos KIR se realizará para HLA de clase-I mediante citometría de flujo con anticuerpo W632. Mientras que para los ligandos MIC-A/B, ULBP1/3, CD155 y CD112 se hará mediante PCR cuantitativa a tiempo real utilizando primers y sondas adecuadas (Citas, hablar con contacto de Fuster).

❖ **OBJECTIVO 2. Estudiar genética KIR y HLA-I (HLA-A, -B y -C) y la expresión en proteína de receptores KIR2D en células NK y linfocitos T.**

Las Dras. Legaz, Moya y Bernardo son expertas en estudios de inmunogenética y ayudados por la becaria, realizarán todas las metodologías necesarias para completar el objetivo.

El estudio del polimorfismo KIR se realizará mediante el método de PCR-SSP desarrollado por el grupo del Dr. Vilches (Vilches C, 2007), mediante primers específicos para los diferentes alelos de cada receptor existentes hasta el momento actual y registrados en la base de datos (IPD-KIR Database-Statistics for Release 1.4.0) y se confirmarán mediante PCR-SSO con el sistema Luminex (Life Match; Tepnel). Paralelamente, se realizará tipificación HLA-A, -B y -C de baja resolución mediante PCR-SSP (One Lambda) o Luminex (LabScan 100TM; One Lambda) y tipificación HLA-C por PCR-SSO y Luminex (Lifecodes HLA-C

typing Ref. 628810-50, Diagnóstica Longwood), para clasificar los alelos según el aminoácido de la posición 80 de la alfa1-hélice. Cuando sea necesario, el tipaje se realizará de alta resolución mediante PCR-SSP o PCR-SSO (Luminex, LabScan 100TM).

El Dr. Minguela es experto en los estudios de inmunofenotipo por citometría multiparamétrica, y con la ayuda de la becaria, analizará la expresión de las moléculas KIR2D mediante citometría de flujo multiparamétrica en muestras de células mononucleadas (separadas mediante gradiente de densidad en ficol) utilizando un citómetro digital de 12 detectores y 3 láseres para marcar conjuntamente los antígenos CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD158a (KIR2DL1), CD158a/h (KIR2DL1/S1), CD158b2 (KIR2DL3), CD158b1b2j (KIR2DL2/L3/S2), KIR3DL1 y NKG2D en linfocitos T y células NKs.

❖ **OBJECTIVO 3. Estudiar factores solubles en el suero que condicionen la respuesta de células NKs.**

Las Dras. Moya y Gimeno son expertas en estudios proteicos por ELISA y Luminex y ayudados por la becaria, realizarán todas las metodologías necesarias para completar el objetivo.

Las Citoquinas solubles en suero o sobrenadantes de cultivos se estudiarán mediante ensayos multiplex de sistema Luminex. Los niveles de MICA soluble se determinarán mediante la técnica de ELISA (Immatics).

❖ **OBJECTIVO 4. Evaluar la actividad citolítica y anti-tumoral de células NK frente a células leucémicas del propio paciente.**

Los Drs. Gimeno y Campillo son expertos en cultivos celulares y estudios de la respuesta de células NK in vitro y ayudada por la becaria, realizarán los ensayos.

La caracterización funcional de las diferentes subclases de células NK KIR+ de acuerdo a la expresión de los receptores KIR2DL1 y/o KIR2DS1 (Cognet C et al, Clin Immunol, 2010; 135:26_32) y KIR2DL2/S2 y KIR2DL3 se realizará mediante un ensayo de citotoxicidad con citometría de flujo en presencia de CFSE/7-AAD, utilizando como células diana células criopreservadas de la leucemia al diagnóstico y la línea K562. La capacidad citotóxica de las células NK KIR+ también se valorará mediante el ensayo de movilización de vesículas a través de la expresión de CD107a en superficie utilizando citometría de flujo (Betts MR et al. J Immunol Methods, 2003; 281:65-78). Las células NK KIR+ efectoras se utilizarán frescas y activadas con IL-2 (100U/ml) + PHA (1.5ng/ml) (Carrega P et al. PLoS ONE 2010; 4:e8132) purificadas de SP mediante EasySep® Human NK Cell Enrichment Kit (Stem cell).

❖ **OBJECTIVO 5. Correlacionar el estatus del quimerismo de células NK y T in vivo con la supervivencia libre de leucemia o recidiva en pacientes sometidos a trasplante alogénico.**

Los Dr. Campillo y Bernardo Pisa son expertos en estudios genéticos de quimerismo en trasplante y la becaria MV. Martínez en la separación de subpoblaciones linfocitarias.

Para realizar el estudio de quimerismo seguiremos técnicas habituales en nuestro laboratorio tanto sobre células totales de sangre periférica, como de linfocitos T purificados, utilizando el método de PCR/STR y secuenciador capilar (ABI Prism 3500; Applied Biosystems). En este proyecto se evaluará la utilidad de la monitorización del quimerismo NK y para ello, con el objeto de optimizar la purificación de linfocitos T y NK en el menor volumen sanguíneo posible, estas subpoblaciones se aislarán simultáneamente mediante sorting (MoFlow Sorter, Izasa) utilizando una tinción con anti-CD3 (linfocitos T) y anti-CD56 (células NK).

5. RECOGIDA Y ANÁLISIS DE DATOS.

Los resultados se recogerán en bases de datos (en Access y Excel) ya disponibles en nuestro grupo en las que se recogerán datos demográficos, clínicos y experimentales (descritos

en la metodología) y las diferencias se analizarán con el programa SPSS-15. Para la asociación entre variables se usará el test de Xi-cuadrado y el test de Fisher. La comparación de grupos se realizará mediante el test de ANOVA, T de student y los no paramétricos Mann-Whitney y Wilcoxon. La supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP) se evaluarán mediante el test Kaplan-Meier. Para ello, se considerarán puntos finales del seguimiento la presencia o ausencia, respectivamente, de 1) fallecimiento relacionado con la enfermedad y 2) recaída o progresión de la enfermedad durante el seguimiento. Las diferencias estadísticamente significativas entre las curvas de supervivencia se comprobarán mediante el “two tailed log-rank test”.

La recogida y análisis de datos se realizará con el asesoramiento del Lcdo. J.M. Bolarín, especialista en estadística y miembro del grupo de investigación del Servicio de Inmunología.

6. LIMITACIONES Y VENTAJAS DEL ESTUDIO.

La principal limitación creemos puede venir impuesta por el elevado polimorfismo de los genes a estudiar (KIR y HLA) que esperamos se solventa al incrementar la muestra en años sucesivos. En contraposición la principal ventaja del estudio es que se trata de evaluar parámetros que podrían ser de aplicación rápida en la práctica clínica. Las complicaciones técnicas podrán así mismo ser solventadas gracias a la experiencia de un equipo de profesionales expertos de los abordajes que se plantean, Oncólogos pediatras, inmunólogos y Hematólogos.

7. MEDIOS DISPONIBLES

El equipo investigador dispone en el Hospital Universitario Virgen de La Arrixaca de los medios y conocimientos técnicos necesarios para la completa consecución de los objetivos propuestos, entre ellos destacamos:

- **Unidad de Oncohematología Pediátrica** con quince años de experiencia en el manejo del cáncer pediátricos en base a la aplicación de ensayos y protocolos multicéntricos de diferentes grupos colaborativos. Hasta enero de 2012 se han tratado en nuestra unidad más de 150 casos de leucemia infantil. Para el tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica se seguirán protocolos del grupo colaborativo nacional PETHEMA. Para el tratamiento de la leucemia aguda mieloblástica y linfomas se aplicarán protocolos del grupo colaborativo nacional SHOP.
- **Unidad de Trasplante Hematopoyético y Terapia Celular** con una amplia experiencia incluyendo pacientes pediátricos (55 trasplantes pediátricos hasta enero de 2013).
- **Unidad de histocompatibilidad e inmunogenética:** termocicladores y equipos de electroforesis, secuenciadores. Sistema Luminex para el análisis de genes KIR y HLA.
- **Unidad de citometría analítica y separación celular:** 2 citómetros de multifuorescencia CANTO-II y un analizador de multifuorescencia LSR-II y un separador celular MoFlo. Sistema de CellSearch (Veridex) para la determinación de CTCs.
- **Unidad de inmunología tumoral y análisis citogenética** (por hibridación in situ fluorescente –FISH-); microscopio de fluorescencia multifiltro y software para procesamiento de estudios de FISH.
- **Unidad de biología molecular:** Extractor semiautomático de ácidos nucleicos (Qiacube). sistema de PCR a tiempo real de BIPRISM-7111, secuenciadores de DNA ABIPRISM-310 y 3500, electroporador, luminómetros, fuentes de equipos de electroforesis. Lector de imágenes Thyphoon (Amersans).
- **Unidad de cultivos celulares y criobiología:** cámaras de flujo laminar 7 estufas de cultivo, equipos de frío (+80°C / nitrógeno líquido). Unidad radioactiva (3ª categoría) completamente equipada.

- . **Equipamientos de uso común:** microscopios ópticos y de fluorescencia, equipos de electroforesis/Electroenfoque, espectrofotómetro, transiluminador, centrifugas de alta velocidad.
- . **Otras áreas del centro:** aceleradores lineales para la irradiación de células estimuladoras (servicio de Oncología Radioterápica) y un irradiador con fuente de cobalto conseguido con ayuda de infraestructura FIS.
- . **SopORTE administrativo y estadístico completo.**

8. IMPLICACIONES ÉTICAS

Este proyecto será presentado al Comité de Ética de Investigación Clínica del hospital Universitario Virgen de la Arrixaca.

9. POTENCIAL APLICABILIDAD

En España se diagnostican unos 1000 casos anuales de cáncer infantil de los que aproximadamente 300 pacientes van a fallecer por la enfermedad (recaída o progresión). La intensidad de los tratamientos convencionales (quimioterapia, cirugía, radioterapia, trasplante de progenitores hematopoyéticos) ha tocado su límite y nuevas estrategias son necesarias para mejorar los índices de supervivencia. La interacción entre el sistema inmune innato y las células tumorales constituye un campo en exploración donde sus propiedades biológicas podrían utilizarse como dianas terapéuticas y terapia celular antitumoral. En el momento actual estamos desarrollado un ensayo clínico donde exploramos el trasplante de progenitores hematopoyético de donante haploidéntico como plataforma para explotar la inmunoterapia NK (Pérez Martínez A, EC81/00457, código EudraCT 2009-010016-15), y recientemente vamos a explorar la inmunoterapia con células NK en el contexto de quimioterapia convencional “Infusión de células NK activadas y expandidas en combinación con quimioterapia en pacientes pediátricos con leucemia/linfoma T refractario” (EC11-057).

Por tanto resulta esencial este proyecto para elaborar resultados que permitan determinar la susceptibilidad de cada paciente y su tumor a la terapia NK, de manera que pueda proponerse un procedimiento a escala clínica que combine el tratamiento convencional junto con terapia NK. A modo de ejemplo, en el St Jude Children’s Research Hospital ya incorporan protocolos de quimio-inmunoterapia NK en pacientes con LMA de riesgo intermedio y alto.

Nuestro equipo investigador cuenta con experiencia en el desarrollo de terapias celulares (mesenquimales, células tumorales metastásicas, linfocitos T y células NK). La instalación de cultivos y manipulación celular GMP (tipo sala blanca) está aprobada por la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios para estandarizar procedimientos de terapia celular (NKs y células mesenquimales) a escala clínica.

10. PRESUPUESTO ANUAL

10.1 Gastos de Ejecución por año.

Los gastos se estimarán de forma anual, por lo que el total habrá que estimarlo dependiendo de los años durante los que se haga efectivo el patrocinio.

A.- Personal

Licenciado en Biología, Bioquímica, Genética, Farmacia.....	15.000 Euros/año
Médico Pediatra.....	15.000 Euros/año

B.- Bienes y Servicios

Objetivo-1.....	1.200 Euros/año
Objetivo-2.....	5.140 Euros/año

Objetivo-3.....	1.000 Euros/año
Objetivo-4.....	3.500 Euros/año
Objetivo-5.....	1.000 Euros/año

C.- Difusión de resultados

Asistencia a congresos y reuniones científicas.....	1.000 Euros/año
Corrección gramatical de manuscritos.....	500 Euros/año.

Total..... 43.340 Euros/año

10.2. Justificación presupuesto

PERSONAL

El personal técnico y facultativo que atienden estas patologías, tanto desde el punto de vista clínico como del diagnóstico de laboratorio, y en particular estos últimos sobre los que recaerá en buena medida la realización de todos los estudios especiales (fuera de protocolo) de este proyecto, no disponen del tiempo necesario para garantizar la consecución de los objetivos propuestos. La ayuda tanto en la recolección de forma protocolizada de los datos clínicos, como la realización de los ensayos experimentales, aportada por las dos personas propuesta para contratar a cargo del proyecto es, por tanto, esencial.

OBJETIVO-1

La mayoría de los estudios propuestos en este objetivo, inmunofenotipo, ciclo y ploidia celular, estudios moleculares de alteraciones cromosómicas, FISH y Cariotipo se realizan de forma rutinaria en nuestro centro para el correcto diagnóstico y estadiaje de la enfermedad, por lo que no se solicita presupuesto para este punto.

Sin embargo la expresión de ligandos de receptores KIR habrá que hacerlo por citometría de flujo (anti-HLA de clase-I unos 300 Euros/año), y por RT-PCR a tiempo real, lo que requerirá un gasto de:

- Extracción de RNA (10 Euros/muestra, 400 Euros/año)
- Reversotranscripción, dNTPs, RNAinhibidor, oligo-dTs (2 Euros muestra, 80 Euros/Año)
- Primers y sondas fluorescentes (600 Euros/Año). Este gasto será mayor el primer año, ya que una vez hecho probablemente no haya que adquirirlo en años sucesivos.
- PCR-mastermix y placas de PCR (3 Euros/muestra, 120 Euros/año)
- **Total 1200 Euros/años**

OBJETIVO-2

En este objetivo se pretende por un lado, analizar el perfil genético de los receptores KIR y el de sus ligandos HLA de clase I (HLA-A, -B y -C) en los siguientes grupos de pacientes:

- Grupo-I: 15 controles sanos/año.
- Grupo-II: 15 pacientes/año y sus donantes en caso de trasplante alogénico.

Por tanto se va a realizar estudio genético de KIR y HLA-I en 30-40 individuos. El precio por determinación de los KIT comerciales a utilizar es de 36 Euros por muestra para KIR (Kit genotipaje KIR SSO-PCR, Diagnóstica Longwood), de 30 Euros por muestra para HLA-A (Kit PCR-SSO locus-A, OneLambda, Rafer), 30 Euros por muestra para HLA-B (Kit PCR-SSO locus-B, OneLambda, Rafer) y de 30 Euros para HLA-C (Lifematch HLA-C test, Diagnóstica Longwood) lo que llevaría a un coste anual de 5.000 Euros/año. Sin embargo, en nuestra experiencia los estudios se pueden hacer con total seguridad con la mitad del reactivo propuesto por el fabricante, por lo que el presupuesto final solicitado es 2.500 Euros/año.

Además se requiere la extracción de muestras de DNA (6 Euros/muestra, 240 Euros/año)

Por otro lado, se va a realizar estudio de expresión de receptores KIR en células NK y linfocitos T mediante citometría multiparamétrica. Se van a utilizar 11 anticuerpos monoclonales diferentes, de 100 test por vial. Por tanto 11 anticuerpos por un precio medio de unos 400 Euros/vial, hace un total de 4.400 Euros cada 2 años, o 2200 Euros/año.

A este gasto, se le sumarán gastos menores para la adquisición de material y reactivos complementarios para estudios de citometría. 5 Euros/muestra, 200 Euros/año.

Total: 5.140 Euros/año.

OBJETIVO-3

La determinación de factores solubles se hará al final del proyecto cuando se hayan recolectado todas las muestras posibles que son unas 7 por paciente ($15 \times 7 = 85$) y controles (15), en total unas 100 muestras/año. La suma de la determinación de citoquinas mltiplex (10 citoquinas) por Luminex y de MICA soluble rondara las 10 Euros/muestra.

Total 1000 Euros/año.

OBJETIVO-4

Para el estudio funcional de células NK donde se evalúe su actividad citolítica un kit de purificación de NKs con un coste aproximado de 500 Euros.

Material de cultivo: medios de cultivo, antibióticos, glutamina, IL-2 e IL-15 recombinante, suero humano, placas y frascos de cultivo. Con un coste aproximado de 1000 Euros/año.

Por último se requerirán anticuerpos monoclonales para los estudios de liberación de gránulos (ensayo CD107a) en el que se realizará igualmente tinción con los mismos anticuerpos que en el estudio del objetivo-1. Esto nos llevará a consumir medio vial más de cada uno de ellos, unos 10 viales a 400 Euros, total 4.000 Euros / 2. Unos 2000 Euros/año.

- Total: 3500 Euros/año

OBJETIVO-5

Parte de los estudios propuestos en este objetivo, análisis de quimerismo en células totales y células T de sangre periférica ya se realizan de forma habitual en estos pacientes, y por tanto en este objetivo, solo se repercuten los gastos extras que puedan suponer la purificación de las células NKs y su correspondiente análisis de quimerismo. Este estudio tan solo se hará en pacientes sometidos a trasplante alogénico de médula. Dada la dificultad para estimar el número de pacientes a incluir, se estima un gasto aproximado.

- Total: 1000 Euros/año.

Por último, para la difusión de los resultados se ha estimado un presupuesto de unos 1.500 Euros/año para las correcciones de los manuscritos y asistencia a congresos y reuniones científicas.