

Potenciació de la citotoxicitat cel·lular induïda pel Rituximab en cèl·lules B de LLC.

Memòria realitzada per M. Esther Moga Naranjo per optar al grau de doctor en Medicina i Cirurgia.

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Jordi Sierra Gil i Dr. Javier Briones Mejjide en el Servei d'Hematologia Clínica de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

Tesi adscrita al Departament de Medicina de la Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Barcelona, novembre de 2008

Dr. Javier Briones Mejjide.
Director.

Dr. Jordi Sierra Gil.
Catedràtic de Medicina.
Director.

M. Esther Moga Naranjo
Departament de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Als meus pares
Als que hi són, però no els veiem

*Tan sols tenim l' instant present
aquest únic i etern instant
obrint-se i desplegant-se davant dels nostres ulls
dia i nit
Jack Kornfield*

Plasmar en paper els agraïments sempre és difícil, però en primer lloc vull agrair a tots aquells malalts que gràcies al seu consentiment fan possible i són la raó de tots aquests treballs de recerca. Gràcies

Amb la finalitat de percebre l'infinit valor de totes les coses, devem prestar a la vida una atenció plena i complerta.

Jack Kornfield

En segon lloc he de donar les gràcies als meus directors de tesi el Dr. Javier Briones i el Dr. Jordi Sierra que en el seu moment van confiar en mi, fent possible aquest treball. L'oportunitat d'haver pogut treballar en aquesta línia de recerca m'ha permès descobrir i endinsar-me en un àmbit desconegut per mi però que m'ha aportat molts coneixements. Gràcies.

*Passar de l'opinió a la percepció,
de la imaginació al fet,
de la il·lusió a la realitat,
del que no és al que és,
aquest és el camí.*

Svami Prajnanpad

Gràcies a totes aquelles persones que en el moment d'arribar al servei d'Immunologia van recolzar les meves idees.

Al Dr. José Luís Rodríguez, primer immunòleg que em va rebre al servei i em va ensenyar tot allò que la immunologia em podia oferir.

A la Dra. Carme Gelpí, al Dr. Cándido Juárez i al Dr. Oscar de la Calle equip d'Immunòlegs que m'han guiat en aquest món. A tots ells els hi vull agrair tot el que m'han ensenyat tant a nivell professional com a nivell personal. Sempre han estat quan els he necessitat. Gràcies.

No importa que el que hagi de fer sigui insignificant.

Fes-ho el millor possible.

Posa-li molta cura i gran atenció com a tot allò que et sembli el més important.

Gandhi

Paraules especials,... moltíssimes gràcies Sílvia, Bet i Elena. Confiança, professionalitat i sobretot amiatat. Han estat molts anys, molts moments i molts records. Gràcies.

La Veritat no té senda, i és on radica la seva bellesa: la Veritat és viva.

Krishnamurti

A la família d'Immunologia:

Als que han marxat: Antonia, Ana B, Ana M., Bea F, Eduard, Gemma B, Isabel F, Isabel G, Jordi, Juantxo, Juan, Luís, Maria, M^a Paz, Marta, Montse, Moisés, Natalia, Paqui, Rosa Mari, Ramón, Ruth, Toni.

Als que hi son: Bea L, Carme, Carlos, Cecília, Conchita, Diego, Eli, Gemma A, Herminia, Laura, Mariví, Marta, Manuela, Meritxell, Mila, Mónica, Nenuca, Rosa, Teresa, Yolanda.

Això si que és difícil. Aquí hi ha molts moments, molts sentiments. Vull agrair el valor personal que aquesta família ha demostrat al llarg dels anys. Tenint en compte que han existit alts i baixos, el més important és el que ha quedat, l'Amiatat. Poder fer una paella,... o un aperitiu,... o un dinar de Nadal,... tots junts. Moltes gràcies a tots .

Si la individualitat és aniquilada, desapareix la alegria creadora que cristal·litza en ella mateixa, encara que no s'hagi perdut cap matèria, encara que no s'hagi destruït cap àtom. I si es perd aquesta individualitat, es produeix en si mateixa una pèrdua pel món en conjunt.

La individualitat és preciosa sobretot perquè no és universal.

Rabindranath Tagore

A l'Eva, gran companya en aquest viatge. Pels moments, pensaments i idees compartides. Gràcies

Cada individu aporta al món

la seva contribució única

Jack Kornfield

A la meva família. Als meus pares i a la meva germana. Són poques les paraules que hi ha per agrair el que sempre hagin estat al meu costat. Fins i tot, en aquells moments on haurien d'haver estat ells els primers. Moltíssimes gràcies perquè heu estat el punt de referència per continuar el camí. Gràcies.

La força no procedeix de les capacitats físiques.

Procedeix d'una voluntat invencible.

Gandhi

A L'ÀLEX, LA CARLA I EL JOFRE. MOLTES GRÀCIES PER SER AMB MI. SOU LA LLUM DEL CAMÍ I LA FORÇA DE LA VIDA. MOLTÍSSIMES GRÀCIES

*La sensibilitat és la capacitat de sentir,
reconèixer i distingir els canvis més petits i més subtils.*

Svami Prajnanpad

Per últim, gràcies als que no veiem però hi son. Gràcies als que han marxat però els hi hagués agradat estar aquí, i continuen al meu cor. Per ells són paraules d'amor i gratitud. Gràcies.

*Tot allò visible tendeix a fer-se invisible,
allò audible a fer-se inaudible,
allò tangible a fer-se intangible,
i potser allò pensable a fer-se impensable.*

Lama Anagarika Govinda

INTRODUCCIÓ

1. MADURACIÓ LIMFOCITÀRIA	1
1.1 Característiques generals	1
1.2 Processos de selecció que configuren el repertori limfocitari	2
1.3 Maduració dels limfòcits B	2
2. PROCESSOS LIMFOPROLIFERATIUS CRÒNICS	5
2.1 LEUCÈMIA LIMFOCITÀRIA CRÒNICA	5
2.1.1 Característiques clíniques	5
2.1.2 Fisiopatologia	6
2.1.3 Criteris diagnòstics	10
2.1.4 Curs clínic, factors pronòstic i estadiatge	11
2.1.5 Tractament	12
3. ANTICOSSOS MONOCLONALS	15
3.1 ANTICOSSOS MONOCLONALS APROVATS PER LA FDA	16
3.2 RITUXIMAB	17
3.2.1 Característiques del rituximab	17
3.2.1.1 ANTIGEN CD20	18
3.2.2 Pauta de tractament del rituximab	22
3.2.3 Resistència al tractament amb rituximab	23
3.2.4 Mecanisme d'acció del rituximab	23
3.2.4.1 ADCC	24
3.2.4.2 CDC	27
3.2.4.3 APOPTOSI	29
3.2.4.4 EFECTE SINÈRGIC AMB LA QUIMIOTERÀPIA	31
3.2.5 Indicacions terapèutiques del rituximab al LNH	31
3.2.6 Efectes secundaris del rituximab	32
4 RESPOSTA IMMUNITARIA TUMORAL	33
4.1 CÈL·LULES NK	34
4.1.1 Característiques de les cèl·lules NK/NKT	35
4.1.2 Desenvolupament de les cèl·lules NK	35
4.1.3 Biologia de les cèl·lules NK	36
4.1.4 Receptors de les cèl·lules NK	37
4.1.4.1 RECEPTORS KIRs (<i>Killer immunoglobulin-like receptors</i>)	40

4.1.4.2	RECEPTORS <i>C-TYPE LECTIN LIKE</i>	41
4.1.4.3	RECEPTORS DE CITOTOXICITAT NATURAL	41
4.1.4.4	RECEPTOR NKG2D	42
4.1.4.5	RECEPTOR FcγRIIIa (CD16)	43
4.1.5	Etapes en l'activació de les cèl·lules NK	44
4.1.5.1	CONTACTE	44
4.1.5.2	ADHESIÓ	45
4.1.5.3	POLARITZACIÓ	45
4.1.5.4	DESGRANULACIÓ	46
4.1.6	Funcions efectores de les cèl·lules NK	46
5	<i>MECANISMES D'EVASIÓ TUMORAL</i>	48
5.1	ESTRATÈGIES PER POTENCIAR L'ADCC	50
5.2	POTENCIACIÓ DE LES FUNCIONS EFECTORES DE L'HOSTE	52
5.2.1	Citocines - IL-15	52
5.2.1.1	FUNCIONS DE LA IL-15	56
5.2.1.2	MECANISME D'ACCIÓ DE LA IL-15	57
5.2.2	CpG Oligodesoxinucleòtids (ODN)	59
5.2.2.1	MECANISME D'ACTIVACIÓ DELS CpG ODN	59
3.2.4.2	APLICACIONS TERAPÈUTIQUES DELS CpG ODN	61

OBJECTIUS

63

MATERIALS I MÈTODES

1.	<i>MOSTRES CEL·LULARS</i>	65
1.1	Obtenció i purificació de cèl·lules mononuclears i de LLC	65
1.2	Purificació de concentrats de cèl·lules sanguínies a partir de " <i>buffy coats</i> "	65
1.3	Congelació de cèl·lules mononuclears	66
1.4	Descongelació cel·lular	67
1.5	Comptatge i viabilitat cel·lular	68

<i>2. CULTIUS CEL·LULARS</i>	<i>68</i>
2.1 Cultiu línies cel·lulars	69
2.2 Cultiu de cèl·lules mononuclears	69
2.3 Cultiu de limfòcits B (LLC-B)	70
<i>3. PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES NK</i>	<i>70</i>
3.1 Purificació de cèl·lules NK per selecció negativa	71
3.2 Purificació de cèl·lules NK per selecció positiva	73
<i>4. MARCATGE CEL·LULAR AMB RADIONUCLIDS</i>	<i>75</i>
<i>5. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR</i>	<i>75</i>
<i>6. CITOTOXICITAT CEL·LULAR</i>	<i>76</i>
<i>7. ANÀLISI DEL POLIMORFISME FcγRIIIa (CD16)</i>	<i>80</i>
7.1 Extracció de DNA	80
7.2 Nested PCR	81
<i>8. CITOMETRIA DE FLUX</i>	<i>87</i>
8.1 Expressió de marcadors de superfície	88
8.2 Apoptosi cel·lular	90
<i>9. QUANTIFICACIÓ DE CITOCINES I QUIMIOCINES</i>	<i>91</i>
9.1 ELISA	91
9.2 Immunoassaig amb boles fluorescents (FlowCytomix)	93
<i>10. ANÀLISI ESTADÍSTIC</i>	<i>97</i>

RESULTATS

<i>1. POTENCIACIÓ DE L'ADCC DONADA PEL RITUXIMAB</i>	<i>98</i>
<i>2. LÍNIA CEL·LULAR RAJI</i>	<i>98</i>
2.1 RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES PBMCs	99
2.1.1 EXPERIMENTS PRELIMINARS DE PROLIFERACIÓ	99
2.1.2 EXPERIMENTS PRELIMINARS DE CITOTOXICITAT	99

2.1.2.1	Línia cel·lular Raji	100
2.1.2.2	Determinació de la concentració saturant de rituximab	100
2.1.2.3	Càlcul de la concentració òptima d'IL-15	101
2.1.3	CITOTOXICITAT DE PBMCs ACTIVADES AMB IL-15	103
2.1.4	CITOTOXICITAT DE PBMCs ACTIVADES AMB CpG ODN A	104
2.2	RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES CÈL·LULES NK	105
2.2.1	CITOTOXICITAT DE CÈL·LULES NK ACTIVADES AMB IL-15	105
2.2.2	CITOTOXICITAT DE CÈL·LULES NK ACTIVADES AMB CpG ODN A	108
2.3	QUANTIFICACIÓ DE LA PRODUCCIÓ D'IFN- γ	111
2.4	INFLUÈNCIA DEL POLIMORFISME DEL RECEPTOR Fc γ RIIIA	112
3.	<i>LEUCÈMIES LIMFÀTIQUES CRÒNIQUES</i>	<i>113</i>
3.1	RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES PBMCs	113
3.1.1	EXPERIMENTS PRELIMINARS DE CITOTOXICITAT	113
3.1.1.1	Determinació de la concentració saturant de rituximab	113
3.1.1.2	Càlcul de la concentració òptima d'IL-15	114
3.1.1.3	Càlcul de la concentració òptima de CpG ODN A	114
3.1.2	CITOTOXICITAT DE PBMCs ACTIVADES AMB CpG ODN A I IL-15	115
3.1.2.1	Activació amb CpG ODN A vs activació amb IL-15	115
3.1.2.2	Activació simultània de CpG ODN A i IL-15	117
3.1.2.3	Significança estadística de l'ADCC amb la IL-15	117
3.1.3	INFLUÈNCIA DE LA LLC I DE LA PBMC A L'ASSAIG CITOTÒXIC	120
3.1.3.1	Sensibilitat citotòxica de les LLC	120
3.1.3.2	Capacitat citotòxica de les PBMC	121
3.1.4	IMPLICACIÓ DEL TGF- β A L'ASSAIG CITOTÒXIC	122
3.1.4.1	Citotoxicitat en presència de TGF- β	122
3.1.4.2	ADCC en presència de TGF- β	123
3.1.4.3	Citotoxicitat en presència de TGF- β i IL-15	123
3.1.4.4	ADCC en presència de TGF- β i IL-15	124
3.1.5	IMPLICACIÓ DE L'IFN- γ A L'ASSAIG CITOTÒXIC	127
3.1.5.1	Quantificació d'IFN- γ	127
3.1.5.2	Neutralització de l'IFN- γ	128
3.1.5.2.1	Neutralització de l'IFN- γ als sobrenedants	128
3.1.5.2.2	Neutralització de l'IFN- γ a l'assaig citotòxic	129
3.1.6	ANÀLISI DE CITOCINES I QUIMIOCINES	130

3.2	RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES CÈL·LULES NK	132
3.3	EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR	133
3.3.1	POBLACIÓ CEL·LULAR "PBMCs"	133
3.3.1.1	Expressió del receptor CD69	133
3.3.1.2	Expressió del receptor NKG2D	134
3.3.2	POBLACIÓ CEL·LULAR "CÈL·LULES NK PURIFICADES"	135
3.3.2.1	Efecte de la IL-15 en l'apoptosi espontània	135
3.3.2.2	Expressió del receptor LFA-1	136
3.5	INFLUÈNCIA DEL POLIMORFISME DEL RECEPTOR FcγRIIIA	139

DISCUSSIÓ

1.	<i>IMPLICACIÓ DE LA IL-15 POTENCIANT EL MECANISME D'ACCIÓ DEL RITUXIMAB</i>	141
1.1	Capacitat citotòxica de la cèl·lula NK enfrontada a una línia cel·lular de Limfoma B	141
1.2	Paper de la cèl·lula activada enfrontada a cèl·lules leucèmiques (LLC-B)	143
1.3	Canvis en l'expressió de receptors presents a les cèl·lules NK en presència d'IL-15	144
1.4	Implicació de la presència d'una citocina immunosupressora, com és el TGF-β	146
1.5	Canvis en la síntesi de citocines i quimiocines en presència d'IL-15 i TGF-β	148
1.6	Consideracions a tenir en compte vers la IL-2	150
1.7	LLC i altres citocines	151
1.8	Paper del polimorfisme del receptor FcγRIIIa en la citotoxicitat	152
2.	<i>IMPLICACIÓ DEL CPG ODN A POTENCIANT EL MECANISME D'ACCIÓ DEL RITUXIMAB</i>	153

CONCLUSIONS

157

BIBLIOGRAFIA

159

Abreviatures

A

A	Adenina
ADCC	Citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos
ADN	Àcid desoxiribonucleic
Ag	Antigen
AICD	<i>Activation-induced cell death</i>
AICL	<i>Activation-induced C-type lectin</i>
APC	Cèl·lula presentadora d'antigen
ARNm	Àcid ribonucleic missatger

B

BCR	Receptor dels limfòcits B
BSA	Albúmina sèrica bovina

C

C	Citosina
C5	Component 5 del complement
Ca ²⁺	Calci
CD	Grup de diferenciació. <i>Cluster of differentiation</i>
CDC	Citotoxicitat dependent del complement
CDRs	Regions determinants de la complementarietat
cèl	Cèl·lules
CHOP	Ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, prednisona
Ci	Curi
CO ₂	Diòxid de carboni
cpm	Comptes per minut
Cr ⁵¹	Crom 51

CSF	Factor estimulator de colònies
CTBT	Centre de transfusió i Banc de Teixits
CTL	Limfòcit T citotòxic
CVP	Ciclofosfamida, vincristina, prednisona

D

DAF	Factor accelerador de la degradació
DAPK1	<i>Death-associated protein kinase 1</i>
DC	Cèl·lula dendrítica
DMSO	Dimetilsulfòxid
dNTP	2'Deoxiribonucleòsids-5'-trifosfat
DS	Desviació estàndard

E

EDTA	Àcid etilen-diamino-tetraacètic
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Enzimoimmunoassaig. <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>

F

F	Fenilalanina
Fc	Regió constant d'una immunoglobulina
Fc α	Regió constant d'una IgA
Fc γ	Regió constant d'una IgG
FcR	Receptor Fc
FCS	Sèrum fetal boví
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianat de Fluoresceïna
FISH	Tècniques d'hibridació <i>in situ</i> . Fluorescent In Situ Hybridization
FS	<i>Forward Scatter</i>

G

g	Grams
G-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags
Gy	Grey

H

h	Hores
Hb	Hemoglobina
HER-2	Membre de la família EGFR
HLA	Antigen leucocitari humà
H ₂ O	Aigua
H ₂ O ₂	Aigua oxigenada
HRP	Peroxidasa de rave
HSP	<i>Heat shock proteins</i>

I

IC	Immunocomplex
IFN	Interferó
IgA	Immunoglobulina A
IgE	Immunoglobulina E
IgG	Immunoglobulina G
IgM	Immunoglobulina M
IL	Interleucina
ITAM	Motiu d'activació de l'immunoreceptor per tirosina
ITIM	Motiu d'inhibició de l'immunoreceptor per tirosina

K

Kb	Quilobase
KDa	Quilodalton

L

LLC	Leucèmia limfocitària crònica
LNH	Limfoma no Hodgkin
LPS	Lipopolisacàrid
LTC	Limfòcit T citotòxic

M

mA	Mil·liampers
MAC	Complex d'atac a la membrana
MFI	Promig de la intensitat de fluorescència
MHC	Complex d'histocompatibilitat principal
min	Minuts
ml	Mil·lilitres
mm	Mil·límetre
MO	Medul·la òssia

N

nº	Nombre
NK	Cèl·lula citocida natural. <i>Natural Killer</i>
nm	Nanòmetres
N ₂	Nitrogen líquid

O

ODN	Oligodesoxinucleòtids
OPD	<i>O-Phenylenediamine dihydrochloride</i>

P

PAMPs *Pathogen-associated molecular patterns*

pb Parells de bases

PBS Solució tampó fosfat

PBMC Cèl·lula mononuclear de sang perifèrica

PCR Reacció en cadena de la polimerasa

pDC Cèl·lules dendrítiques plasmocitoides

PE Ficoeritrina

PI Iodur de propidi

PKC Proteïna cinasa c

Pre-BCR Receptor de cèl·lules pre-B

PRR *Pattern recognition receptors*

Q

q.s.p. Quantitat suficient per

R

RAG *Recombination Activating Gene*

rpm Revolucions per minut

S

SLC Síndrome limfoproliferatiu crònic

SP Sang perifèrica

SS *Side Scatter*

T

T Timina

T.A. Temperatura ambient

TBE Tris borat EDTA

TCR Receptor dels limfòcits T

TdT *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*

Th *T helper*

TLD Termoluminiscència

TLRs Receptors *Toll like*

TNF Factor de necrosi tumoral

U

U Unitats

UV Ultraviolat

V

V Valina

VEB Virus d'Epstein-Barr

VEGF *Vascular-endothelial growth factor*

VRS Virus respiratori sincitial

vs Versus

Citocines

	Nom alternatiu	Funció
IL-1		Febre; activació de limfòcits T; activació de macròfags
IL-2	Factor de creixement dels limfòcits T	Proliferació dels limfòcits T
IL-3	CSF multicolònia	Acció sinèrgica sobre l'hematopoesi inicial
IL-4	BCGF-1 (factor de creixement dels limfòcits B de tipus 1), BSF-1 (factor estimulador dels limfòcits B de tipus 1)	Activació dels limfòcits B; canvi de classe a IgE; supressió de limfòcits de la subpoblació Th1
IL-5	BCGF-2 (factor de creixement dels limfòcits B de tipus 2)	Creixement i diferenciació d'eosinòfils
IL-6	IFN- β 2 (interferó β de tipus 2), BSF-2 (factor estimulador de limfòcits B de tipus 2), BCDF (factor de diferenciació dels limfòcits B)	Creixement i diferenciació de limfòcits T i limfòcits B; producció de proteïnes de fase aguda; febre
IL-7		Creixement de limfòcits pre-B i limfòcits pre-T
IL-9		Acció potenciadora de mastòcits que estimula la subpoblació Th2
IL-10	Factor inhibidor de la síntesi de citocines	Potent supressor de les funcions dels macròfags
IL-12	Factor estimulador de les cèl·lules NK	Activació de les cèl·lules NK; inducció de la diferenciació dels limfòcits T CD4 cap a limfòcits de la subpoblació Th1
IL-18	IGIF, factor inductor d'IFN- γ	Inducció de la producció d'IFN- γ en limfòcits T i en cèl·lules NK; activador de la inducció de resposta de la subpoblació Th1 i després de la subpoblació Th2
IL-21		Estimulació o proliferació i potenciació de la funció efectora dels limfòcits T CD8; potenciació del canvi de classe i síntesi d'Ig pels limfòcits B; inducció de la diferenciació i la potenciació de la funció efectora de les cèl·lules NK
IFN- α		Acció antivírica; increment de l'expressió d'antígens d'histocompatibilitat de classe I
IFN- β		Acció antivírica; increment de l'expressió d'antígens d'histocompatibilitat de classe I

IFN- γ		Activació de macròfags; increment de l'expressió de molècules d'histocompatibilitat i de components de processament antigènic; estimulació del canvi de classe d'Ig i inhibició de la subpoblació Th2
G-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits	Estimulació del desenvolupament i la diferenciació dels neutròfils
GM-CSF	Factor estimulator de colònies de granulòcits i macròfags	Estimulació del creixement i la diferenciació de cèl·lules de llinatge mieloide monocític, especialment cèl·lules dendrítiques
TNF- α	Caquectina	Inflamació local; activació de l'endoteli
TNF- β	Limfotoxina, LT, LT- α	Citotoxicitat; activació de l'endoteli

Grups Diferenciació (CD)

	Característiques i funcions
CD2	Molècula d'adhesió que reconeix el CD58 (LFA-3); s'uneix a l'Ick intracel·lularment i activa els limfòcits T
CD3	S'associa al TCR; és necessari per a l'expressió i transducció de senyals del TCR
CD4	Coreceptor per a les molècules d'histocompatibilitat de classe I; receptor de la gp120 per al VIH-1 i VIH-2
CD5	Participa en la transducció de senyals del TCR i del BCR
CD8	Coreceptor de molècules d'histocompatibilitat de classe I
CD10	Metal·loendopeptidasa de zinc; marcador de leucèmia limfoblàstica aguda pre-B
CD11a	Reconeix el CD54 (ICAM-1), el CD102 (ICAM-2) i el CD50 (ICAM-3)
CD11b	Reconeix el CD54, el factor del complement iC3b i les proteïnes de la matriu extracel·lular
CD11c	Reconeix el fibrinògen
CD11d	Reconeix el CD50
CD18	S'associa al CD11a, CD11b, CD11c i CD11d
CD19	Forma complexos amb el CD21 (CR2) i el CD81 (TAPA-1); s'associa a tirosin-cinases citoplasmàtiques i la cinasa PI3
CD21	Actua com a receptor del factor del complement C3d i del virus d'Epstein-Barr; juntament amb el CD19 i el CD81 forma el coreceptor dels limfòcits B
CD22	Reconeix sialoconjugats
CD23	Receptor d'IgE de baixa afinitat; regula la síntesi d'IgE; lligand del coreceptor CD19, CD21 i CD81
CD25	Cadena α del receptor d'IL-2
CD29	Subunitat β 1 de les integrines, s'associa al CD49a en la integrina VLA-1
CD31	Molècula d'adhesió mediatora d'interaccions leucòcit-endoteli i endoteli-endoteli
CD32	Receptor de baixa afinitat per agregats d'immunoglobulina i complexos antigen-anticòs
CD33	Reconeix sialoconjugats; participa en l'adhesió cel·lular
CD34	Lligand de CD62L (L-selectina)
CD38	NAD-glicohidrolasa que augmenta la proliferació de limfòcits B
CD40	Reconeix el CD154 (CD40L); actua com a receptor de senyals en la coestimulació dels limfòcits B; promou el creixement, la diferenciació i el canvi de classe de les immunoglobulines en els limfòcits B; estimula la producció de citocines en macròfags i cèl·lules dendrítiques
CD44	Reconeix l'àcid hialurònic; actua com a mediador de l'adhesió leucocitària
CD45	Tirosin-fosfatasa que augmenta la senyalització a través del BCR i del TCR; té múltiples isoformes derivades de l'empalmament alternatiu
CD46	Cofactor que reconeix el C3b i el C4b i facilita que el factor del complement I els degradi
CD48	Lligand optatiu per al CD244
CD49d	α 4-integrina que s'associa al CD29; reconeix la fibronectina, la MadCAM-1 i la VCAM-1
CD50	Reconeix la integrina CD11a/CD18

CD52	Té una funció desconeguda; pot funcionar com a diana d'anticossos utilitzats terapèuticament per a eliminar les cèl·lules T de la medul·la òssia
CD54	Molècula d'adhesió intercel·lular que reconeix la integrina CD11a/CD18 (LFA-1) i la integrina CD11b/CD18 (Mac-1); actua com a receptor de rinovirus
CD55	Reconeix el C3b; intervé en el desacoblament de les C3/C5-convertases
CD56	Molècula d'adhesió; isoforma de la molècula d'adhesió cel·lular neuronal (MACN)
CD58	Molècula d'adhesió que reconeix el CD2; antigen associat a la funció leucocitària (LFA-3)
CD59	Reconeix els factors del complement C8 i C9; evita l'acoblament del complex d'atac a la membrana
CD62L	Molècula d'adhesió leucocitària que reconeix el CD34 i la GlyCAM; mediador d'interaccions amb l'endoteli
CD64	Receptor d'IgG d'alta afinitat, reconeix, de més a menys afinitat, IgG3, IgG1, IgG4 i IgG2; mediador de la fagocitosi; intervé en la captura d'antígens
CD69	Té una funció desconeguda; antigen d'activació primerenca
CD79a	Component del BCR anàleg al CD3, necessari per a l'expressió del BCR a la superfície cel·lular i per a la transducció de senyals durant la maduració dels limfòcits B
CD79b	Component del BCR anàleg al CD3, necessari per a l'expressió del BCR a la superfície cel·lular i per a la transducció de senyals durant la maduració dels limfòcits B
CD81	S'associa al CD19 i CD21 per a formar el coreceptor del BCR
CD89	Receptor d'IgA
CD94	Inhibeix les cèl·lules NK
CD102	Reconeix el CD11a/CD18 (LFA-1) però no el CD11b/CD18 (Mac-1)
CD107a	Proteïna lisosòmica de membrana translocada a la superfície cel·lular després de l'activació; té una funció desconeguda
CD117	S'uneix al lligand de c-kit (CSF)
CD122	Cadena β del receptor d'IL-2
CD132	Cadena γ del receptor d'IL-2; subunitat del receptor d'IL-4, IL-7, IL-9 i IL-15
CD154	Lligand de CD40, actua com a inductor de la proliferació i activació dels limfòcits T
CD244	Regula la funció de cèl·lules NK i limfòcits T; pot reconèixer el CD48

Índex Taules

Taula 1.	Estadis bàsics maduratiu dels limfòcits B	1
Taula 2.	Model de desenvolupament dels limfòcits B humans	4
Taula 3.	Alteracions cromosòmiques a les LLC i l'efecte pronòstic	9
Taula 4.	Estadiatge de la Leucèmia Limfocitària Crònica	12
Taula 5.	Anticòssos monoclonals aprovats per la FDA	17
Taula 6.	Expressió dels receptors Fc γ	26
Taula 7.	Subclasses de cèl·lules NK	37
Taula 8.	Receptors activadors presents a cèl·lules NK amb els seus lligands	39
Taula 9.	Receptors inhibidors presents a cèl·lules NK amb els seus lligands	39
Taula 10.	Principals característiques de citocines implicades en la immunitat innata	54
Taula 11.	Expressió de CD69 en la població CD16 ⁺ activada \pm IL-15	133
Taula 12.	Expressió de NKG2D en la població CD16 ⁺ activada \pm IL-15	134
Taula 13.	Expressió de CD16 en cèl·lules NK purificades activades \pm IL-15	137
Taula 14.	Expressió de LFA-1 en la població CD16 ⁺ activada \pm IL-15	137
Taula 15.	Expressió de LFA-1 en la població CD16 ⁻ activada \pm IL-15	138

Índex Figures

Figura 1.	Frotis de sang perifèrica d'un pacient amb LLC	10
Figura 2.	Evolució dels anticossos monoclonals	16
Figura 3.	Rituximab	17
Figura 4.	Estructura i organització de l'antigen CD20 a la bicapa lipídica	20
Figura 5.	Esquema que il·lustra alguns mecanismes d'acció del rituximab	24
Figura 6.	Regulació conjunta de les senyals dels receptors Fc activadors i inhibidors	26
Figura 7.	Activació de la via clàssica del complement	28
Figura 8.	Principals vies d'activació apoptòtiques: receptors de mort i senyals d'estrès intracel·lular	30
Figura 9.	Encreuament de la immunitat innata i l'adaptativa als tumors	34
Figura 10.	Model proposat pel desenvolupament de cèl·lules NK <i>in vivo</i>	36
Figura 11.	Esquema d'activació i inhibició de les cèl·lules NK	38
Figura 12.	Regulació de l'adhesió proporcionada per LFA-1	45
Figura 13.	Respostes bidireccionals entre cèl·lules dendrítiques i cèl·lules NK	47
Figura 14.	Estructura de la família de receptors de citocines que tenen en comú la cadena γ	55
Figura 15.	L'IL-15R α presenta la IL-15 en <i>trans</i> a cèl·lules NK i cèl·lules T CD8 ⁺ veïnes	58
Figura 16.	Senyalització cel·lular dels CpG ODN	60
Figura 17.	Centrifugació per gradient de densitats	66
Figura 18.	Purificació magnètica. Mètode de selecció negativa	72
Figura 19.	Purificació magnètica. Mètode de selecció positiva	74
Figura 20.	Citotoxicitat cel·lular per alliberació de ⁵¹ Cr	79
Figura 21.	Reacció en cadena de la polimerasa	82
Figura 22.	Resultat de la digestió enzimàtica de la Nested PCR	83
Figura 23.	ELISA	91
Figura 24.	Immunoassaig amb boles fluorescents	94
Figura 25.	Expressió de l'antigen CD20 a la línia cel·lular Raji	98
Figura 26.	Experiment de proliferació cel·lular	99
Figura 27.	Experiment d'ADCC comparant, com a cèl·lules diana, la línia cel·lular Raji amb la línia cel·lular Nalm-6	100
Figura 28.	ADCC amb la línia cel·lular Raji i diferents concentracions de rituximab	101
Figura 29.	Citotoxicitat de PBMCs estimulades amb IL-15 (1 ng/ml)	101
Figura 30.	Citotoxicitat de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml)	102
Figura 31.	Capacitat citotòxica natural de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml)	102
Figura 32.	ADCC de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml)	103
Figura 33.	Citotoxicitat natural utilitzant CpG ODN control vs CpG ODN A	104
Figura 34.	ADCC amb PBMCs activades amb CpG ODN control vs CpG ODN A	105

Figura 35.	Purificació de cèl·lules NK	106
Figura 36.	ADCC de PBMCs vs NK purificades	106
Figura 37.	ADCC de PBMCs vs NK purificades activades amb IL-15	107
Figura 38.	ADCC de PBMCs, NK purificades i PBMCs deplecionades de NK, activades amb IL-15	108
Figura 39.	ADCC de cèl·lules NK activades amb CpG ODN control vs CpG ODN A	109
Figura 40.	ADCC de PBMCs deplecionades de cèl·lules NK	110
Figura 41.	Quantificació d'IFN- γ als sobrenedants de PBMCs i cèl·lules NK cocultivades amb cèl·lules Raji preincubades amb rituximab	111
Figura 42.	Correlació del polimorfisme Fc γ R111a-158V/F amb el percentatge de lisi resultant als assajos de citotoxicitat	112
Figura 43.	Concentració saturant de rituximab	113
Figura 44.	Concentració d'IL-15 10 ng/ml vs 100 ng/ml	114
Figura 45.	Concentració de CpG ODN A (1, 2,5 i 5 μ g/ml)	115
Figura 46.	Citotoxicitat de PBMCs activades amb CpG ODN control, CpG ODN A i IL-15	116
Figura 47.	ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN control, CpG ODN A i IL-15	116
Figura 48.	ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN A + IL-15	117
Figura 49.	Citotoxicitat natural i ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN A	118
Figura 50.	Citotoxicitat natural i ADCC de PBMCs activades amb IL-15	119
Figura 51.	Citotoxicitat natural i ADCC de la mateixa PBMC enfrontada a 2 LLC diferents	120
Figura 52.	Citotoxicitat natural i ADCC de la mateixa LLC enfrontada a 2 PBMCs diferents	121
Figura 53.	Citotoxicitat de PBMCs sense estimular, cultivades en un gradient de concentració de TGF- β , enfrontades a LLC-B	122
Figura 54.	ADCC de PBMCs sense estimular, cultivades en un gradient de concentració de TGF- β , enfrontades a LLC-B	123
Figura 55.	Citotoxicitat de PBMCs, estimulades amb IL-15 i cocultivades en un gradient de concentració de TGF- β , enfrontades a LLC-B	124
Figura 56.	Citotoxicitat i ADCC de PBMCs \pm estimulades amb IL-15 i cocultivades amb TGF- β	124
Figura 57.	ADCC en presència de TGF- β de 4 LLC i 4 donants diferents	125
Figura 58.	ADCC de PBMCs \pm estimulades amb IL-15 i cocultivades amb TGF- β	126
Figura 59.	Síntesi d'IFN γ per PBMCs cultivades \pm IL-15 i cocultivades \pm TGF- β	127
Figura 60.	Síntesi d'IFN γ per PBMCs sense estimular i cocultivades en un gradient de concentració d'anti-IFN- γ	128
Figura 61.	Síntesi d'IFN γ per PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades en un gradient de concentració d'anti-IFN- γ	129

Figura 62.	Citotoxicitat i ADCC de PBMCs \pm estimulades amb IL-15 i cocultivades amb α -IFN- γ	130
Figura 63.	Síntesi TNF- α , IL-10, MIP-1 α i MIP-1 β per PBMCs cultivades \pm IL-15 i cocultivades \pm TGF- β	131
Figura 64.	ADCC de PBMCs i PBMCs deplecionades de NK activades amb IL-15	132
Figura 65.	Expressió NKG2D-PE en població CD16 ⁺	134
Figura 66.	Percentatge d'apoptosi de cèl·lules NK purificades \pm activades amb IL-15	135
Figura 67.	Percentatge d'expressió CD16/LFA-1 en cèl·lules NK purificades \pm activades amb IL-15	136
Figura 68.	Correlació del polimorfisme Fc γ R11a-158V/F amb el percentatge de lisi resultant als assajos de citotoxicitat amb LLCs	139

INTRODUCCIÓ

1. MADURACIÓ LIMFOCITÀRIA

1.1 Característiques generals

La maduració dels limfòcits, tant B com T, consta d'una sèrie d'estadis seqüencials: maduració precoç (diferenciació i proliferació), expressió dels gens dels receptors antigènics i selecció del repertori madur de receptors antigènics (Taula 1). L'existència de progenitors limfocítics es demostra per l'aparició, en animals d'experimentació i en pacients, de mutacions genètiques capaces de provocar una aturada del desenvolupament de limfòcits, però no d'altres tipus cel·lulars derivats de medul·la òssia. Els progenitors limfocítics donen lloc als limfòcits B, T, cèl·lules NK i algunes cèl·lules dendrítiques.

A l'inici de la maduració dels limfòcits B i T es caracteritza per una proliferació de progenitors que és estimulada principalment per la interleucina 7 (IL-7) i es tradueix en un increment en el nombre de cèl·lules. Aquesta proliferació assegura l'existència d'una reserva cel·lular de progenitors suficientment gran per generar un repertori molt divers de limfòcits específics per diferents antígens. La IL-7 es sintetitzada per cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia i del timus, i la seva activitat proliferativa a les fases inicials es deté abans que l'expressió dels gens del receptor antigènic hagi finalitzat. Quan els limfòcits expressen aquests receptors antigènics són aquestes molècules les responsables d'estimular la proliferació cel·lular. Per tant, l'expressió dels gens dels receptors antigènics és el fenomen central de la maduració dels limfòcits, sent necessària per la generació d'un repertori diversificat i pels processos que assegurin una supervivència selectiva dels limfòcits amb una especificitat útil [1].

CÈL·LULA PROGENITORA	Pro-B	Pre-B	B immadura	B madura	B efectora diferenciada
Maduració inicial i expansió degut a factors de creixement. Inici de la recombinació dels gens dels receptors d'antigen.		Expressió del receptor antigènic	Selecció del repertori i adquisició de competència funcional	Resposta inicial	Realització de les funcions efectores
Òrgans limfoides primaris (medul·la òssia o timus)				Òrgans limfoides perifèrics o teixits	
No dependència antigènica			Antigen propi		Antigen estrany

Taula 1. Estadis bàsics maduratius dels limfòcits B.

1.2 Processos de selecció que configuren el repertori limfocitari

Una vegada els limfòcits immadurs expressen els seus receptors antigènics, molts d'ells seran eliminats mitjançant un procés de selecció induïda per l'assemblatge d'aquests receptors, ja que aquests limfòcits seran potencialment nocius i podran reaccionar front a antigens propis. La conservació dels receptors amb especificitats útils es coneix com a selecció positiva. Els limfòcits pre-B i B immadurs poden ser seleccionats positivament mitjançant un reconeixement dèbil d'alguns antigens propis. Això assegura que tots els limfòcits B que completen la seva maduració són portadors de receptors funcionals i podran arribar a teixits limfàtics perifèrics per respondre a antigens estranys. No obstant, no es coneixen els lligands que donen lloc a les senyals donades per aquests receptors en limfòcits B en desenvolupament.

Per altre banda, la selecció negativa és el procés d'eliminació de limfòcits en desenvolupament quan els seus receptors s'uneixen fortament a antigens propis presents als òrgans limfoides primaris. Això passa en un breu període de temps després de l'expressió dels receptors antigènics. Els limfòcits B immadurs fortament reactius a antigens propis poden ser dirigits a fer reordenaments dels gens de les immunoglobulines i així evadir aquesta autoreactivitat. Als limfòcits madurs aquesta selecció negativa és un mecanisme molt important per mantenir la tolerància enfront antigens propis i s'anomena tolerància central [1].

1.3 Maduració dels limfòcits B

Els esdeveniments principals en la maduració dels limfòcits B són: el reordenament i l'expressió dels gens d'Ig en un ordre precís, la proliferació dels limfòcits immadurs i la selecció del repertori madur [1]. A l'inici de l'ontogènia, el desenvolupament de cèl·lules B té lloc a l'omemtum i al fetge fetal, i al néixer a la medul·la òssia. Recentment s'ha demostrat la presència de precursors de cèl·lules B a la sang de cordó; i cèl·lules pre-B i B madures al timus de gent jove. Per tant, aquest fet indica que després del naixement les cèl·lules B es podrien desenvolupar a altres llocs independentment de la medul·la òssia [2].

Els limfòcits es diferencien a la medul·la òssia a partir de cèl·lules mare immadures. Durant les primeres etapes es produeix un reordenament dels gens de les immunoglobulines sent una fase independent de l'antigen. En aquest moment el procés té lloc a medul·la òssia i el limfòcit és gran i prolifera ràpidament (limfoblast). La seva posterior maduració té lloc als nòduls limfàtics i als fol·licles extralimfàtics fent-se petit, quiescent i madur (limfòcit B). Quan aquests limfòcits es posen en contacte amb l'antigen, es transformen als centres germinals dels nòduls limfàtics, en cèl·lules grans amb gran capacitat proliferativa (immunoblasts o centroblasts). Hipermutacions somàtiques tenen lloc a les regions variables dels gens de les immunoglobulines (reordenament) per millorar l'especificitat antigènica. El canvi de classe d'immunoglobulina també té lloc en aquesta etapa. Els limfòcits petits sense capacitat de proliferar anomenats centròcits (última etapa madurativa al centre germinal) i les cèl·lules plasmàtiques amb capacitat de produir IgG s'acumulen a la medul·la dels nòduls limfàtics. Alguns centròcits migren a la zona marginal al voltant dels fol·licles activats i romanen com a cèl·lules B de memòria.

La diferenciació i la maduració dels limfòcits depenen de canvis genètics que tenen lloc a la cèl·lula (Taula 2) [2]. Antígens presents a la superfície cel·lular implicats en la diferenciació s'utilitzen com a diana d'anticossos específics. Aquests antígens s'utilitzen per identificar el llinatge cel·lular així com l'estadi de desenvolupament. A més juguen diferents papers en la maduració dels limfòcits, en el reconeixement i en l'adhesió a altres cèl·lules i molècules. Dintre d'aquests antígens s'inclouen: el CD19 i CD20, ambdós implicats en senyals de transducció; CD22 implicat en la senyalització; CD40, implicat en la interacció amb la cèl·lula T; CD45 (antigen leucocitari comú); CD79a, implicat en senyals de transducció. Els limfoblasts expressen a superfície el *intranuclear terminal deoxynucleotidyl transferase* i el CD34, però els hi manquen alguns dels antígens associats a les cèl·lules B madures. Contràriament, les cèl·lules plasmàtiques madures perden els antígens pan-B-cell i adquireixen el CD38 [3].

	Precursor Limfoide Comú	B precoç	Pro-B	Pre-BI	Pre-BII gran	Pre-BII petita	B immadura	B madura
CD34	+	+	+	-	-	-	-	-
CD10	+	+	+	+	+	+	+	-
IL-7R α	+	+	+	-	-	-	-	-
CD19	-	-	+	+	+	+	+	+
CD79a	-	+	+	+	+	+	+	+
TdT	-	-	+	-	-	-	-	-
RAG	-	-	+	+	-	+	+	-
Vpre-B	-	+	+	+	+	-	-	-
μ H	-	-	\pm	+	+	+	+	+
pre-BCR	-	-	-	-	+	-	-	-
IgH	GL	DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H	V _H DJ _H
κ L	GL	GL	GL	GL	GL	V _L J _L	V _L J _L	V _L J _L
Pax-5	-	-	+	+	+	+	+	+
sIgM	-	-	-	-	-	-	+	+
sIgD	-	-	-	-	-	-	-	+

Taula 2. Model de desenvolupament dels limfòcits B humans.

2. PROCESSOS LIMFOPROLIFERATIUS CRÒNICS

El terme de Síndrome Limfoproliferatiu Crònic (SLC) inclou una varietat d'entitats clínic-biològiques resultants de la proliferació clonal d'un limfòcit B o T madur i immunocompetent [4]. La caracterització i el diagnòstic precís dels diferents processos limfoides és important perquè permet elucidar els possibles mecanismes etiopatogènics responsables de la proliferació clonal limfoide o neoplàsia, al mateix temps que fa variar àmpliament el pronòstic i la conducta terapèutica a seguir. De tal manera, un diagnòstic precís requereix del conjunt de dades clíniques així com d'un exhaustiu estudi de laboratori incloent: citologia, histologia, marcadors immunològics i estudis citogenètics i moleculars.

2.1 LEUCÈMIA LIMFOCITÀRIA CRÒNICA

La leucèmia limfocitària crònica (LLC) és la leucèmia més freqüent en persones d'edat avançada en el món occidental, amb una incidència anual de 3-5 casos per 100000, representant aproximadament el 16-30% de totes les leucèmies. La freqüència és 2:1 homes vs dones, i lleugerament més freqüent en blancs. El paper que juguen els factors genètics en la seva etiologia està ben establert. S'ha observat una agregació familiar però es desconeix el tipus d'herència [5].

2.1.1 Característiques clíniques

El 90% dels casos de LLC es dona en persones >50 anys, encara que també s'han descrit casos en adults joves [6]. La malaltia és asimptomàtica en aproximadament el 50% dels pacients, sent la durada d'aquesta fase asimptomàtica extremadament variable. Molts pacients presenten com a signes primerencs una limfocitosi persistent; una lleu limfadenopatia cervical, supraclavicular i/o axil·lar; i una esplenomegàlia. Als primers estadis de la malaltia, un 50% i un 25% dels malalts presenten una lleu anèmia i trombocitopènia, respectivament. Un 5% dels pacients tenen invasió cutània que es dona en forma d'infiltracions nodulars i difuses, eritrodèrmia, dermatitis exfoliativa i infeccions secundàries. La infiltració d'òrgans que es dona al progressar la malaltia provoca adenopaties massives amb esplenomegàlia, hiperesplenisme i consegüentment citopènies perifèriques. Aquests pacients es presenten amb els símptomes B que

inclouen febre, pèrdua de pes i sudoració nocturna. Finalment hi ha una infiltració massiva de cèl·lules neoplàsiques a la medul·la òssia donant lloc a anèmies, trombocitopènies i neutropènies severes per substitució de la cel·lularitat normal [5].

Els pacients amb LLC tenen un empitjorament significatiu de l'activitat immunològica. Aproximadament el 50% dels pacients tenen una hipogammaglobulinèmia [7]. Aquesta deficiència fa que augmenti la susceptibilitat a desenvolupar infeccions. Infeccions bacterianes cutànies, del tracte respiratori i urinari, així com infeccions virals del tipus herpes simple i zòster són freqüents i contribueixen a la morbiditat i mortalitat d'aquests pacients. Un 25% dels pacients desenvolupen en algun moment de la malaltia una anèmia hemolítica autoimmunitària amb coombs positiva. També poden desenvolupar autoanticossos contra les plaquetes i els neutròfils donant lloc a una púrpura trombocitopènica autoimmunitària i una neutropènia. Es troba la paraproteïna de Bence Jones en >65% dels pacients i poden detectar-se paraproteïnes de cadenes pesades IgG i IgM [5].

2.1.2 Fisiopatologia

Malgrat la disponibilitat de cèl·lules tumorals de LLCs poques coses es coneixen de la fisiopatologia de la malaltia. Aquestes cèl·lules in vitro són marcadament inerts. La falta de models animals fins els últims anys també ha influït. El ratolí transgènic TCL1 desenvolupa una malaltia limfoproliferativa de cèl·lules B CD5+ agressiva, per la qual cosa s'utilitza com a model de formes agressives, però no serveix com a model de malaltia indolent que és el més freqüent [8].

El descobriment que l'estat mutacional dels gens de la regió variable de la cadena pesada de les immunoglobulines (IgVH) afecta de manera important el pronòstic de la LLC, ha estat un bon estimul per la comprensió de la fisiopatologia d'aquesta malaltia. De fet, els estudis es centren en 3 punts:

- 1.- Receptor de cèl·lules B.
- 2.- Alteracions genètiques.
- 3.- Equilibri entre proliferació i apoptosi.

1.- Receptor de cèl·lules B

El receptor de cèl·lules B és un complex multimèric format per la unió d'una immunoglobulina de superfície i un heterodímer $Ig\alpha/Ig\beta/CD79A/CD79B$ units no

covalentment. Una baixa expressió d'aquest receptor és el segell dels limfòcits de la LLC [9]. El mecanisme responsable d'aquesta baixa expressió es manté sense aclarir. No existeixen defectes genètics publicats [10, 11], a excepció d'una mutació en el CD79B [12]. Contràriament a aquesta baixa expressió a superfície, la transcripció i la síntesi intracel·lular dels components d'aquest receptor són normals, no obstant aquests components no es poden unir ni transportar des del reticle endoplàsmic a la superfície cel·lular per un defecte en el plegament i la glicosilació de les cadenes μ i CD79A [13]. També s'ha observat una baixa expressió de la molècula CD22 com a resultat de defectes en el plegament del CD79A [14].

Un 50-70% de LLCs tenen mutacions somàtiques dels gens IgVH. La presència o absència de mutacions somàtiques estan associades amb gens IgVH concrets. La estimulació del receptor de cèl·lules B en cèl·lules de LLC està alterada. Una baixa expressió d'aquest receptor s'ha correlacionat amb una disminució de l'activitat tirosina cinasa i defectes tant en la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular com en la fosforilació de tirosines [15]. S'ha observat que les cèl·lules leucèmiques que expressen gens IgVH no mutats tenen en molts casos una millor resposta davant l'estimulació del receptor de cèl·lules B que aquelles cèl·lules que expressen gens IgVH mutats [16].

S'han detectat grans quantitats de ZAP70 (proteïna de 70 KDa de la família tirosina cinasa que s'expressa normalment en cèl·lules T i cèl·lules NK, i juga un paper important en la senyalització de cèl·lules T) en molts pacients de LLC sense mutacions als gens IgVH [17]. Cèl·lules B de LLC que expressen ZAP70 responen més davant la unió d'una IgM, ja que augmenta la fosforilació de tirosines i el flux de Ca^{2+} , que les cèl·lules que no expressen ZAP70. Això pot ser degut a un o més d'aquests motius:

- Després de la unió del lligand al receptor de cèl·lules B, el ZAP70 es fosforila i s'associa amb una Ig de superfície i amb el CD79B [18].
- El ZAP70 promou respostes inhibidores que finalitzen les senyals [19].
- L'expressió de ZAP70 s'associa a desavantajoses respostes de supervivència degut a que potencia l'accés a centres de proliferació [20].

Tot això fa que l'expressió de ZAP70 permeti una efectiva senyalització a través de la IgM en cèl·lules B, la qual cosa podria conduir a una evolució molt més agressiva de la malaltia.

A ZAP70 també se li ha adjudicat un paper oncogènic [21]. No obstant és present en diferents estadis de maduració de les cèl·lules B i en altres neoplàsies

hematològiques. Així, s'expressa en cèl·lules pre-B i pro-B; i en leucèmies agudes que deriven d'aquestes cèl·lules. A més en aquesta malaltia hi ha una major expressió de ZAP70 en cèl·lules dels nòduls limfàtics que en cèl·lules B de perifèria [22]. A la vegada una major expressió de ZAP70 incrementa la sensibilitat a senyals migratòries per quimiocines [20]. Per tant encara no està clar si l'expressió de ZAP70 en la LLC és el resultat de freqüents visites a centres de proliferació o és degut a una facilitat en el accés a aquests centres.

Una altra molècula que s'expressa en un subgrup de cèl·lules B de LLC és el CD38. Aquesta molècula s'expressa durant el desenvolupament de les cèl·lules B quan les interaccions cèl·lula-cèl·lula són crucials. L'expressió de CD38 predomina en pacients que no tenen mutacions als gens IgVH i s'associa amb un pitjor pronòstic [23].

2.- Alteracions genètiques

Encara que el gran nombre de casos dintre de la mateixa família i la baixa freqüència d'aquesta malaltia en la població japonesa suggereix la dominància dels factors genètics vers els ambientals, la naturalesa d'aquesta predisposició encara està per definir i s'han implicat defectes en diferents gens segons les famílies. Recentment s'ha identificat una família amb un polimorfisme en un nucleòtid que provoca una regulació a la baixa de l'expressió de DAPK1. Aquest polimorfisme també s'ha observat en un cas esporàdic de LLC però no en altres famílies. Cap de les alteracions genètiques descobertes fins ara és constant a la LLC. Les més freqüents són mutacions, delecions o trisomies [24].

Les alteracions cromosòmiques en la LLC són difícils de detectar pels anàlisis citogenètics convencionals, degut al baix grau de proliferació cel·lular. Moltes cèl·lules es troben en fase G0 amb una supervivència prolongada per defectes en l'apoptosi. Degut al baix nombre de cèl·lules en divisió es requereix estimular amb mitògens les cèl·lules per obtindre un nombre adequat de cèl·lules en metafase. Les alteracions genètiques més freqüents on s'inclou alteracions cromosòmiques i reordenaments gènics estan enumerades a la taula 3. La presència de múltiples alteracions cromosòmiques a la LLC s'ha implicat com un factor de mal pronòstic.

Utilitzant els anàlisis citogenètics convencionals en les LLCs es detecten > 50% d'alteracions cromosòmiques. La més freqüent és la trisomia 12 (en el 15-20% dels casos) seguida d'alteracions estructurals als cromosomes 11, 13 i 14, que es poden

presentar soles o juntament amb delecions o traslocacions del cromosoma 13q14. Pacients amb un cariotip normal o alteracions 13q- tenen una supervivència millor que pacients amb trisomia del 12 o un cariotip complex. Amb les tècniques d'hibridació *in situ* (FISH: *Fluorescent In Situ Hybridization*) ha estat possible la detecció d'alteracions cromosòmiques en cèl·lules que no estan en divisió. Encara que és una tècnica més sensible i específica que la convencional no pot avaluar la totalitat dels cromosomes. Amb aquesta tècnica s'ha observat que aquests pacients tenen una major freqüència d'alteracions cromosòmiques amb una distribució diferent, sent les més freqüents les delecions del 13q14, seguida de delecions del 11q22.3-q23.1 i la trisomia del 12. El 17p- i el 11q- s'han associat amb una supervivència global menor [5].

Cromosoma	Alteració	Gen afectat	Pronòstic
13	del 13q14	<i>RB1, Leu-1, Leu-2, Leu-5, CLLD6- CLLD8, KPNA3, miR15, miR16</i>	Bon pronòstic
11	del 11q22-23	<i>FDX, ATM, MLL, PZLF, Mrell, RDX, NPAT, CUL5, PPP2R1B</i>	Mal pronòstic
17	del 17p13	<i>p53</i>	Mal pronòstic
12	+12	<i>CDK2, CDK4, STAT6, APAF-1, MDM-2, CCLU1</i>	Mal pronòstic
6	del 6q		Mal pronòstic
14	t(14;19)(q32;q13)	<i>bcl-3</i>	Desconegut

Taula 3. Alteracions cromosòmiques a les LLC i l'efecte pronòstic.

Molts fàrmacs citotòxics per ser efectius requereixen la via ATM/TP53 intacta. Un test de cribatge mesura l'afectació d'aquesta via [25]. Defectes en aquesta via són forts factors predictius de resistència al tractament estàndard. Malgrat que la LLC té un segell comú, les LLC més agressives sense mutacions als gens IgVH sobreexpressen els gens ZAP70, LPL, BCL7A, distrofina i AKAP12; mentre que les LLC estables amb mutacions als gens IgVH sobreexpressen WNT3, CTLA4, NRIP1, ADAM29 i TCF7 [24]. Aquests resultats indiquen que hi ha 2 variants de la mateixa malaltia.

3.- Defectes en la proliferació-apoptosi

El segell de la LLC és el cúmul de cèl·lules B madures que han escapat a la mort programada i pateixen un arrest cel·lular en fase G0/G1. Les traslocacions en el gen *bcl-2* es troben en menys de 1% dels casos tenint en compte que hi ha grans quantitats de la proteïna *bcl-2* [26]. Altres membres de la família *bcl-2* com són les proteïnes antiapoptòtiques *bcl-xL*, *BAG1*, i *MCL1*, estan sobreexpressades, mentre que proteïnes

proapoptòtiques com són BAX i BCL-XS estan menys expressades [27]. La sobreexpressió de la proteïna CDKN1B, proteïna que juga un paper important en la progressió del cicle cel·lular, suggeriria que el major nombre de cèl·lules B madures en la LLC seria degut a un cúmul cel·lular més que d'un increment en la proliferació [28].

Contràriament als resultats *in vivo*, en cultius *in vitro* aquestes cèl·lules entren en apoptosi, indicant el paper del microambient en la supervivència cel·lular. En aquest sentit tant la IL-4 com l'estimulació via CD40 prevenen aquesta apoptosi. La inhibició donada *in vivo* té lloc als pseudofol·licles dels nòduls limfàtics com a agrupacions cel·lulars de la medul·la òssia. En els pseudofol·licles hi ha grans quantitats de cèl·lules CD4⁺, en contacte amb les cèl·lules B, que expressen CD40 lligand. Aquestes cèl·lules T activades poden haver estat reclutades per les cèl·lules B tumorals ja que aquestes últimes expressen les quimiocines CCL17 i CCL22. Això recolzaria el model de que determinats clons rebrien senyals selectives de supervivències en llocs concrets [29].

Amb la utilització de marcatges isotòpics s'ha pogut observar que aquesta malaltia és un procés dinàmic on les cèl·lules proliferen i moren a nivells a vegades apreciables.

2.1.3 Criteris diagnòstics

Els criteris diagnòstics actuals de la LLC es basen en una revisió dels criteris originàriament proposats pel *National Cancer Institute Sponsored Working Group* [30]. Es requereix d'una limfocitosi a sang perifèrica ($>5 \times 10^9$ cèl/L) persistent (>1 mes) de limfòcits amb aparença madura (Figura 1) en absència d'altres causes. L'immunofenotip d'aquests limfòcits ha de ser CD20⁺(dèbil), CD19⁺(dèbil), CD5⁺, CD11c⁺, CD23⁺, CD22 (dèbil o negatiu), FMC7⁻, CD79b⁻ i una expressió dèbil d'immunoglobulines de superfície [5].

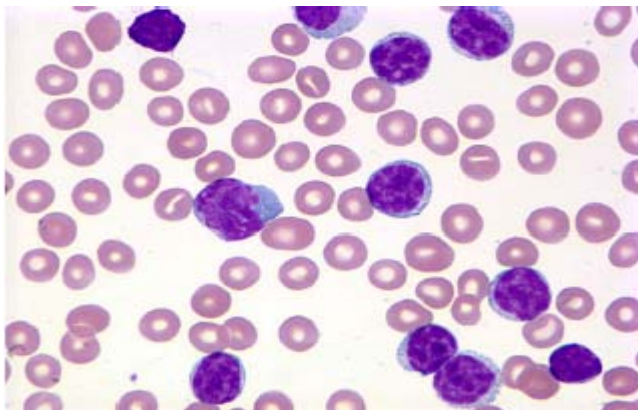


Figura 1. Frotis de sang perifèrica d'un pacient amb LLC.

Limfòcits que morfològicament s'assemblen a limfòcits madurs. El nucli ocupa virtualment tota la cèl·lula deixant únicament un fi anell de citoplasma visible. La cromatina està condensada i el nucleol normalment no es distingeix.

L'expressió de CD38 i ZAP-70 juga un paper més important en el pronòstic que en el diagnòstic de la malaltia. S'han associat amb una evolució més ràpida i agressiva de la malaltia. Altres marcadors on s'inclouen membres de la família bcl-2, antígens de les cèl·lules T, molècules d'adhesió i antígens específics de les cèl·lules mieloides i monocítiques, han estat publicats en malalts amb LLC, però el seu significat queda per aclarir.

Les cèl·lules neoplàsiques de la LLC tenen una resistència a l'apoptosi. Hi ha una sobreexpressió de bcl-2, Bax, bcl-xL i MCL-1, membres antiapoptòtics que contribueixen a que fallin les teràpies citotòxiques. En aquestes cèl·lules hi ha en general una baixa expressió de β -integrines, així s'han trobat nivells baixos de CD49d/CD29, CD11a/CD18, CD11c/CD18, CD31, CD48 i CD58 [5].

2.1.4 Curs clínic, factors pronòstic i estadiatge

El curs clínic de les LLC és extremadament variable degut a la heterogeneïtat de la malaltia, amb rangs de supervivències que van des de mesos a anys. La mitjana de supervivència dels pacients és normalment de 7,5 anys; un 50% arriben als 5 anys mentre que un 30% arriben als 10 anys [31]. Es pot presentar com una malaltia indolent, asimptomàtica amb un nombre de limfòcits a sang perifèrica estable o que augmenta lleugerament, sense necessitar tractament i progressant al cap de 10-15 anys del diagnòstic. Contràriament, aproximadament un 20% dels pacients tenen un curs clínic agressiu amb limfocitosi progressiva a sang perifèrica i a medul·la òssia, limfadenopaties, esplenomegàlia, anèmia, neutropènia, trombocitopènia, fenòmens autoimmunes, i infeccions que progressen ràpidament des del moment del diagnòstic. En aquests casos la mort es pot donar dintre del primer o segon any. No s'ha trobat una explicació contundent a la gran variabilitat observada entre els diferents pacients, però la recerca de factors clínics i biològics que puguin predir el pronòstic dels pacients amb LLC, i identificar els diferents estadiatges i grups de risc és un fet important pel maneig del pacient afecte d'una LLC [32].

Entre els factors clínics que millor poden predir el pronòstic de les LLC està el estadiatge clínic (Taula 4) [33, 34] i el temps de duplicació limfocitària. Entre els factors pronòstic biològics més extensament estudiats s'inclouen la timidina cinasa sèrica, β 2 microglobulina sèrica, CD23 soluble, més del 10% de prolimfòcits a sang

perifèrica i l'expressió de *p53*. S'han trobat altres marcadors biològics però només el nivell mutacional del gen *IgVH*, l'expressió a superfície del CD38, l'expressió citoplàsmica de ZAP-70, i la presència de certes alteracions cromosòmiques s'han associat amb un curs clínic més ràpid i una supervivència menor [31, 32]. No obstant, actualment les decisions terapèutiques basades segons paràmetres biològics només estan justificades als assajos clínics [35].

Estadiatge		Clínica	Supervi- vència (anys)
Sistema d'estadiatge Rai			
Original	Modificat		
0	Baix	Limfocitosi persistent (>1 m) en SP i MO ($\geq 5 \times 10^9$ limfòcits/L en SP). Si $< 5 \times 10^9$ limfòcits/L llavors $\geq 30\%$ limfòcits a MO.	>10
I	Intermedi	Limfocitosi i limfadenopatia	6-8
II		Limfocitosi i hepatomegàlia amb o sense limfadenopatia	
III	Alt	Limfocitosi i anèmia (Hb <11 g/dl)	
IV		Limfocitosi i trombocitopènia (plaquetes $< 100 \times 10^9$ /L)	
Sistema d'estadiatge Binet			
A		Limfocitosi amb limfadenopatia en <2 regions	
B		Limfadenopatia en >3 regions en absència d'anèmia o trombocitopènia	5
C		Anèmia (Hb <10 g/dL) i/o trombocitopènia (plaquetes $< 100 \times 10^9$ /dL) amb o sense limfadenopatia	2

Taula 4. Estadiatge de la Leucèmia Limfocitària Crònica.
SP, sang perifèrica. MO, medul·la òssia. Hb, hemoglobina.

2.1.5 Tractament

El curs clínic natural de la LLC és molt variable i la quimioteràpia normalment no està indicada en fases inicials i estables de la malaltia. En canvi, pacients simptomàtics o en progressió deuen ser tractats immediatament. Actualment les guies proposades per instaurar el tractament quimioteràpic, pel *National Cancer Institute Sponsored Working Group* (NCISWG), estan àmpliament acceptades. D'acord amb aquestes guies de treball dintre dels criteris s'inclouen símptomes relacionats amb la malaltia (febre, pèrdua de

pes i fatiga extrema), fallada de la medul·la òssia, anèmia i/o trombocitopènia autoimmune que responen malament al tractament corticosteroide, esplenomegàlia i/o limfadenopatia massiva i progressiva, limfocitosi progressiva i infeccions recurrents.

Breument es detallen a continuació les diferents possibilitats terapèutiques: [36]

✓ Agents alquilants.

Durant molts anys el clorambucil ha estat considerat el fàrmac de primera línia per excel·lència.

El bendamustin és un agent d'ús recent amb característiques alquilants i com les purines.

✓ Anàlegs nucleòsids de les purines (els més utilitzats).

Tenim la fludarabina, la cladribina i el pentostatín tots ells agents citotòxics amb estructures similars a la adenosina i la deoxiadenosina.

✓ Anticòsos monoclonals.

Rituximab, anticòs monoclonal quimèric dirigit contra l'antigen CD20 i alemtuzumab, anticòs monoclonal humanitzat dirigit contra el CD52. Amb el rituximab sembla ser que el nivell d'expressió antigènica o el nombre de receptors presents a la superfície cel·lular es correlacionaria amb el grau de resposta clínica. Per altre banda la resposta a l'alemtuzumab per pacients prèviament tractats és alta, però l'alta susceptibilitat a patir infeccions com a conseqüència directe del seu efecte biològic limita considerablement el seu ús.

✓ Quimioimmunoteràpia.

Els anticòsos monoclonals i la quimioteràpia tenen activitat sinèrgica en pacients amb LLC. Diferents estudis recents suggereixen que el rituximab associat als anàlegs nucleòsids de les purines poden augmentar la taxa global de resposta amb una toxicitat acceptable quan es comparen aquests tractaments de manera individual

✓ Agents en fase d'investigació.

Noves teràpies s'estan avaluant en estudis preclínic i en assajos clínics fase I i II. Aquestes teràpies inclouen nous anticòsos monoclonals, agents que tenen com a dianes terapèutiques proteïnes antiapoptòtiques de la família bcl-2, receptors implicats en senyals de supervivència, oligonucleòtids *antisense* i altres.

- Lumiliximab, anticòs monoclonal quimèric anti-CD23.
- Ofatumumab, anticòs monoclonal totalment humà anti-CD20.
- Oblimersen sodium (Genasense), oligonucleòtid antisense que reconeix els primers sis codons del bcl-2, formant un DNA/RNA que inhibeix la traslació de la proteïna.

- Flavopiridol, una flavona semisintètica que interacciona amb llocs d'unió adenosina trifosfat.
- ✓ Trasplantament de progenitors hematopoètics autòleg o al·logènic.

3. ANTICOSSOS MONOCLONALS

La immunoteràpia com a tractament comença a principis del 1950 amb la utilització de preparacions d'anticossos policlonals. Però, els avenços més importants van ser al 1975 quan Georges Köhler i Cesar Milstein van desenvolupar una tècnica capaç de produir poblacions homogènies d'anticossos amb especificitats antigèniques conegudes [37]. Va ser gràcies a la producció d'hibridomes i com a conseqüència van rebre el premi nobel de medicina al 1984.

Els primers anticossos monoclonals van ser murins, però desafortunadament van donar problemes sent el més important la immunogenicitat. La producció d'anticossos humans antiratolí bloqueja l'eficàcia terapèutica dels anticossos monoclonals i provoca un aclariment d'aquests molt ràpid, limitant les possibilitats d'una resposta antitumoral efectiva. Eren incapaços de reclutar i desenvolupar correctament les funcions efectores del sistema immune innat, activació del complement (CDC) i resposta immune citotòxica (ADCC); a més només algunes subclasses eren capaces de desenvolupar una correcta resposta immune. Per evitar tot això, mitjançant tècniques de biologia molecular i enginyeria genètica, es van desenvolupar híbrids humà-ratolí que van ser els anomenats anticossos quimèrics i humanitzats (Figura 2) [38]. Al 1985 es van crear els primers anticossos quimèrics amb la tecnologia de l'ADN recombinant. Es van construir fusionant les regions variables de les cadenes lleugeres i pesades d'un anticòs murí amb les corresponents regions constants humanes. Els anticossos quimèrics tenen aproximadament un 70% de l'estructura d'origen humà mentre que els humanitzats el 90% és d'origen humà i només les regions anomenades determinants de la complementarietat (CDRs) que tenen menys d'un 10% de seqüències d'aminoàcids, són d'origen murí. Per altre banda, les noves tècniques han permès també produir l'isotip IgG1 per ser la subclasse més efectiva intervenint en l'ADCC i la CDC.

Encara que la humanització dels anticossos monoclonals ha permès disminuir la immunogenicitat, allargar la vida mitja i augmentar l'habilitat de reclutar funcions efectores [39], s'han observat respostes exagerades en el 9% dels productes que s'han utilitzat [40]. Actualment, la construcció d'anticossos monoclonals recombinants mitjançant la tecnologia de biblioteques de fags amb gens que codifiquen les regions variables de les Ig humanes és una de les estratègies millor establertes i optimitzades.

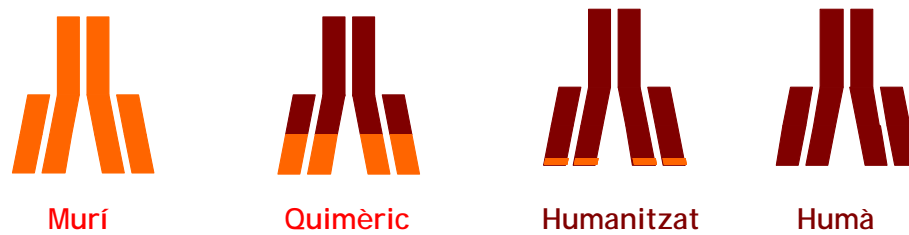


Figura 2. Evolució dels anticossos monoclonals.

L'eficàcia d'aquests anticossos està relacionada directament amb les característiques de l'antigen diana. Un antigen idoni és aquell que hauria de trobar-se únicament a les cèl·lules tumorals, ja que la seva presència a cèl·lules normals augmentaria el risc de toxicitat. Perquè l'activitat sigui òptima, l'antigen diana ha d'estar present en totes les cèl·lules que provenen del mateix clon maligne, a una densitat alta per permetre una millor unió. Ha de ser un antigen estable, és a dir que no es secreti, ja que si l'antigen és soluble l'anticòs s'enganxaria abans d'arribar a la cèl·lula diana i s'eliminaria ràpidament de l'organisme. Finalment, és important que el gen responsable d'aquest antigen no muti [41].

3.1 ANTICOSSOS MONOCLONALS APROVATS PER LA FDA

Des de l'any 1997 que es va aprovar el primer anticòs monoclonal, el nombre d'anticossos disponibles s'ha anat ampliant fins l'actualitat (Taula 5), a més el nombre d'anticossos en fases d'experimentació buscant noves dianes i noves indicacions terapèutiques augmenta contínuament.

FDA	ISOTIP	DIANA	NOM
26-11-1997	clG1κ	CD20	Rituximab (Rituxan®)
12-10-1997	hIgG1	IL-2Rα (CD25)	Daclizumab (Zenax®)
5-11-1997	cFab	GPIIb/IIIaR	Abciximab (Reopro®)
25-9-1998	hIgG1κ	HER-2	Trastuzumab (Herceptin®)
24-8-1998	clG1κ	TNF-α	Infliximab (Remicade®)
19-6-1998	hIgG1κ	Prot F (VRS)	Palivizumab (Synaxis®)
5-12-1998	clG1κ	IL-2Rα (CD25)	Basiliximab (Simulect®)
17-5-2000	HlgG4κ	CD33	Gemtuzumab (Mylotarg®)
7-5-2001	hIgG1κ	CD52	Alemtuzumab (Campath®)
19-2-2002	mlG1κ	CD20	Ibritumomab (Zevalin®)
31-12-2002	hIgG1κ	TNF-α	Adalimumab (Humira®)
27-3-2003	mlG2aL	CD20	Tositumomab (Bexxar®)
27-10-2003	hIgG1κ	CD11a	Ffalizumab (Rantiva®)
20-6-2003	hIgG1κ	IgE	Omalizumab (Xolair®)
12-2-2004	clG1κ	EGFR/HER-1	Cetuximab (Erbix®)
23-11-2004	hIgG4κ	α4-integrina	Natalizumab (Tysabri®)
26-2-2004	hIgG1κ	VEGF	Bevacizumab (Avastin®)
30-6-2006	hIgG1κ	hVEGF-A	Ranibizumab (Lucentis®)
27-9-2006	hIgG2κ	EGFR	Panitumumab (Vectibix®)
16-3-2007	hIgG ₂ κ	C5	Eculizumab (Soliris®)
22-4-2008	hFab	TNF-α	Certolizumab pegol (Cimzia®)

Taula 5. Anticossos monoclonals aprovats per la FDA

3.2 RITUXIMAB

3.2.1 Característiques del rituximab

El rituximab, anticòs monoclonal quimèric humà-ratolí, va ser el primer anticòs monoclonal aprovat per la FDA al 1997 pel tractament de malalties malignes. Va ser sintetitzat per enginyeria genètica per unir-se específicament a l'antigen CD20. Conté una cadena pesant IgG1 humana, la regió constant de la cadena lleugera kappa humana i seqüències de la regió variable murina (Figura 3) [42].

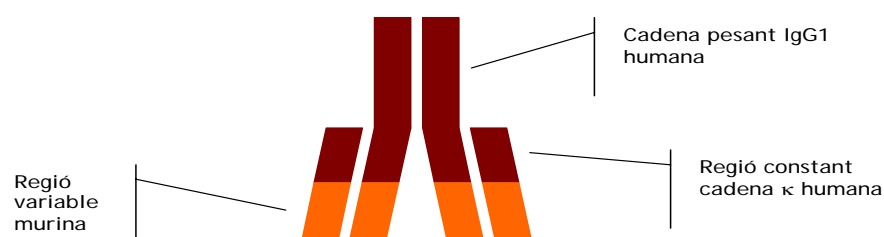


Figura 3. Rituximab.

El rituximab es va aïllar a partir d'un anticòs anti-CD20 murí (IDEC-2B8) degut a la immunització de ratolins BALB/c(H-2^d) amb la línia cel·lular SB limfoblastoide humana que expressa l'antigen CD20, i a l'expressió en cèl·lules (CHO) d'ovari de hamster xinès [43].

3.2.1.1 ANTIGEN CD20

Expressió del CD20

El receptor CD20 o MS4A1 (*membrane-spanning 4-domain, group A, member 1*) està expressat en un llinatge cel·lular específic amb un desenvolupament regulat [44, 45]. El seu gen està localitzat al cromosoma 11q12-13 molt a prop de la traslocació t(11;14)(q13;q32) que es troba en un subgrup de limfomes de cèl·lules B. Aquesta localització podria explicar les alteracions observades en l'expressió del gen CD20 després de la traslocació t(11;14) [46]. La seva expressió és a la superfície de les cèl·lules B al llarg de la seva maduració, però és absent als estadis inicials (cèl·lula pro-B) i es perd al final quan passa a ser cèl·lula plasmàtica; també es troba dèbilment expressat en un subgrup de cèl·lules T [47]. S'expressa en més del 95% de les cèl·lules B dels LNH i en altres malalties neoplàsiques de cèl·lules B, però no es troba a la cèl·lula mare limfoide B, ni a cèl·lules dendrítiques ni a cèl·lules plasmàtiques, per la qual cosa és una diana terapèutica ideal [48]. Dos grups independentment van aïllar i clonar simultàniament l'antigen CD20 [49, 50], observant que les cèl·lules B normals i les línies de cèl·lules B tenien una expressió del CD20 heterogènia. Aquestes cèl·lules tenien un ARNm predominant de 2,6 Kb i un altre de 3,3 Kb, sent probable que tots dos provinguessin d'un mecanisme de *splicing* alternatiu [50, 51]. L'anàlisi per transferència de l'ADN va revelar que l'ARNm del CD20 es transcriu des d'un gen de còpia única de 16 Kb compost per 8 exons [52]. Per tant, aquesta proteïna té dues isoformes: una de 33 KDa que representa el 75-80% i un altre de 35 KDa que representa el 20-25%.

Estructura del CD20

A nivell estructural el CD20 té 4 dominis que s'estenen a través de la membrana amb les terminacions tant carboxi com amino localitzades al citoplasma, i a nivell extracel·lular únicament té un curt segment d'aproximadament 43 residus entre la

tercera i la quarta regió transmembrana. És un 73% idèntica a la murina amb una gran similitud en la seqüència d'aminoàcids a la regió transmembrana, però al domini extracel·lular és diferent en 16 dels 43 aminoàcids, cosa que explica parcialment perquè el rituximab no s'uneix al CD20 murí [50, 53]. Aquesta configuració, profusament ancorada a la membrana, protegeix a l'antigen de la seva externalització. Per altre banda aquesta proteïna està íntimament associada a altres proteïnes, en particular a la proteïna p75/80, també anomenada *C-terminal src kinase-binding protein* (Cbp), així com al CD40 i al MHC de classe II (Figura 4) [54, 55]. Aquesta associació pot fer que a l'unir-se l'anticòs monoclonal al CD20 es vegi afectada la funcionalitat de les molècules veïnes [56].

Fins ara es pensava que la part extracel·lular de la proteïna tenia només 2 grups de determinants antigènics, un que era reconegut per la majoria dels anticossos monoclonals antiCD20 (com són B1, 2H7, rituximab) amb efectes inhibidors en la proliferació de cèl·lules B, i un altre que era reconegut per tant sols el monoclonal 1F5 amb activitat estimuladora [57]. Però, últimament s'ha demostrat una gran diversitat de determinants antigènics, cosa que explicaria la diversitat d'efectes tant bioquímics com biològics observats *in vitro* dels diferents monoclonals antiCD20 [53, 58]. Finalment s'ha de tenir en compte que a nivell extracel·lular juguen un paper molt important en la caracterització dels determinants antigènics l'alanina i la prolina a les posicions 170 i 172 respectivament, així com els residus del voltant i l'estat del complex oligomèric.

La unió de l'anticòs al CD20 provoca una ràpida traslocació de la molècula a les basses lipídiques (*lipids rafts*), que són microdominis enriquits en colesterol i esfingolípid, importants en la transducció de senyals, ja que permeten la colocalització de receptors i senyals efectores. Aquesta unió depèn d'una petita seqüència a la membrana proximal citoplasmàtica (residus 219-225) que és diferent en humans i en ratolins [55, 59]. Molts dels efectes biològics dels anticossos antiCD20 (agregació homotípica, inducció del C-myc pel 1F5) depenen de la tirosina-cinasa [60, 61]. La presència del Cbp associat al CD20 en els *lipids rafts* podria concentrar a les cinases *Src C-terminal* (Lyn, Fyn, o Lck) que fosforilen a Cbp, permetent l'autofosforilació de Csk i la inducció d'activitat cinasa [62, 63]. Dades recents, suggereixen a més la implicació de ceramides i de l'àcid esfingomielinasa en la senyalització del CD20 (Figura 4) [64].

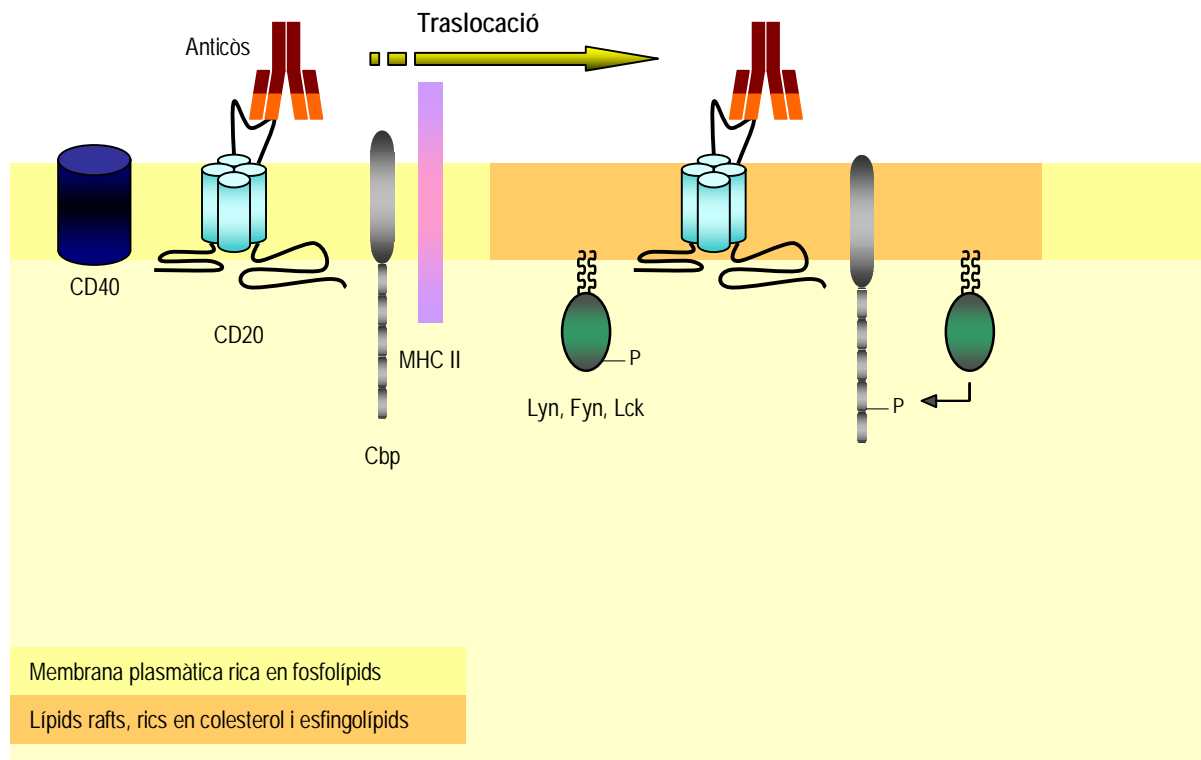


Figura 4. Estructura i organització de l'antigen CD20 a la bicapa lipídica.

Funcions del CD20

La funció exacta *in vivo* del CD20 roman en gran mesura desconeguda. Les cèl·lules B del ratolí deficient en CD20 no semblen tenir defectes evidents ni en la diferenciació ni en la funció [65]. Però per altre banda dades recents indiquen que el CD20 podria jugar un paper important en l'influx de Ca^{2+} a través de la membrana plasmàtica, mantenint la concentració de Ca^{2+} intracel·lular i permeten l'activació de les cèl·lules B [66]. Així, quan s'activa el CD20 mitjançant anticòs monoclonals agonistes, sembla ser que aquest antigen és responsable de regular el cicle cel·lular i també d'induir una ampla varietat de respostes biològiques, com: augment d'expressió de MHC de classe II o molècules d'adhesió (LFA-1, LFA-3) [61], secreció al medi del CD23 expressat per les cèl·lules B [67], regulació a la baixa del receptor de cèl·lules B [68] i inducció d'apoptosi [55] o, al contrari, rescatar de l'apoptosi [69].

Modulació de l'expressió del CD20

Diferents estudis focalitzats en la modulació de l'expressió del CD20 han demostrat que:

- ◆ La IL-4 recombinant regula a la baixa l'expressió del CD20 en cèl·lules B normals i leucèmiques, tant no estimulades com preactivades, mentre que la IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IFN- α , IFN- γ , GM-CSF, TGF- β , TNF- α i la limfotoxina no té efectes en la modulació de l'expressió del CD20. Els autors postulen que probablement la causa sigui una modificació en la conformació del CD20, més que una internalització o una inhibició en la producció [70].
- ◆ El tractament *in vitro* amb IL-4, TNF- α , i GM-CSF de cèl·lules de LLC regula a l'alça el CD20 mentre que altres citocines (eritropoetina, factor *stem cell*, TGF- β , G-CSF, IL-1, IL-2, IL-3) no modulen l'expressió del CD20 [71].
- ◆ L'IFN- α (500-1000 U/ml, 24-48h) indueix una regulació a l'alça significativa del CD20 en limfòcits de sang perifèrica de pacients amb LLC-B, sense augment significatiu en limfòcits normals [72].
- ◆ La IL-2 i els mitògens indueixen l'expressió del CD20 en cèl·lules T dels nòduls limfàtics activades [73].
- ◆ L'IFN- γ (100-1000 U/ml, 48-72h) en cèl·lules humanes de mieloma augmenta l'expressió a superfície del CD20 [74].
- ◆ Baixes dosis de radioteràpia externa (10 Gy) són capaces *in vitro* d'augmentar de manera significativa l'expressió a superfície del CD20 [75].

CD20 com a diana terapèutica

L'antigen CD20 és una diana ideal i molt efectiva degut a que, a més de la restringida expressió a cèl·lules B, es troba en general a una concentració molt elevada a la superfície cel·lular (aproximadament 250000 molècules/cèl), el que permet una gran acumulació d'anticòs monoclonal a la membrana plasmàtica. No circula a plasma com a proteïna lliure que podria bloquejar la unió de l'anticòs a les cèl·lules B de limfoma [76] i, per últim, no es secreta ni s'internalitza com a conseqüència de la unió a l'anticòs, romanent a la superfície cel·lular unit a l'anticòs durant hores fins i tot dies [48, 50, 77, 78]. Aquest últim fet, fa que s'allargui el reclutament de cèl·lules efectores

immunològiques i per tant el seu efecte. A més, el fet que no s'internalitzi reduirà el consum de l'anticòs monoclonal per les cèl·lules diana.

Com a resultat de la unió de l'anticòs a l'antigen es provoca la mort de cèl·lules B *in vitro* i la depleció de cèl·lules B de sang perifèrica *in vivo* [79, 80]. En humans la depleció de cèl·lules B a medul·la òssia, melsa i nòduls limfàtics probablement és menor que en sang perifèrica com s'ha pogut observar en micos [81].

3.2.2 Pauta de tractament del rituximab

La dosi establerta de rituximab de 375 mg/m² intravenosa setmanal durant 4 setmanes es fonamenta en els resultats de l'assaig clínic pilot realitzat amb limfomes de cèl·lules B no Hodgkin indolent [82]. Però, sembla ser que l'administració de 2 infusions de 1000 mg separades amb un interval de 2 setmanes seria el tractament estandarditzat per malalties autoimmunes [83]. Les dues pautes donen lloc a pics en sang de 400-500 µg/ml [84]. Després de completar la dosi, el rituximab es metabolitza amb una vida mitja d'aproximadament 20 dies, trobant-se quantitats de 1-10 µg/ml als 6 mesos d'haver iniciat la teràpia [85]. Una modalitat nova de tractament consisteix en l'administració de rituximab de forma freqüent (per exemple cada 2-3 mesos) durant un període prolongat de temps, el que es denomina tractament de manteniment [86].

Després d'una teràpia convencional, es produeix una ràpida depleció a sang perifèrica de cèl·lules CD20 positives (menys de 5 cèl·lules B/µL), i la recuperació de les cèl·lules B normals es dona entre 9 i 12 mesos després del tractament [87, 88]. Estudis preliminars van demostrar que el perfil farmacocinètic del rituximab variava segons el pacient fos responent o no a la teràpia [87, 89], existint una correlació entre el grau de depleció de cèl·lules B normals i els nivells circulants a sang de rituximab [90]. Malgrat això, s'han trobat pacients que mantenen aquesta depleció durant períodes llargs (en alguns casos fins 2 anys), fet que no es relaciona amb una persistència de l'anticòs a sang.

3.2.3 Resistència al tractament amb rituximab

Han hagut casos publicats de pacients que presenten una resistència innata, on no hi ha resposta malgrat la presència de l'antigen CD20 i la unió del rituximab a la superfície cel·lular [91]. També casos de resistència adquirida al rituximab, ja que s'ha observat que únicament el 40% dels que han respost inicialment a l'anticòs, responen a un tractament posterior [92]. El grau de resposta està en funció del nombre de tractaments previs que ha rebut el pacient i del tipus histològic [82, 87]. Per altre banda, tenim l'aparició d'una resposta immune per part del pacient contra el rituximab, degut a l'aparició d'anticossos humans antiqumèrics [93]. En els primers assajos amb limfomes l'aparició d'aquests anticossos únicament es va veure en menys d'un 3% dels pacients amb títols de menys de 40 ng/ml, però aquesta freqüència ha augmentat considerablement en pacients amb malalties autoimmunes [94].

3.2.4 Mecanisme d'acció del rituximab

El mecanisme d'acció concret pel que l'anticòs monoclonal fa l'efecte antitumoral o anticèl·lula B encara no està ben definit actualment, però està acceptat el paper que juga de manera important la resposta immune de l'hoste (Figura 5) [95, 96].

Entre els mecanismes d'acció implicats trobem:

1. La citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos (ADCC).
2. La citotoxicitat dependent del complement (CDC).
3. L'efecte directe d'inhibició de la proliferació o d'inducció de l'apoptosi.
4. Efecte sinèrgic amb la quimioteràpia.

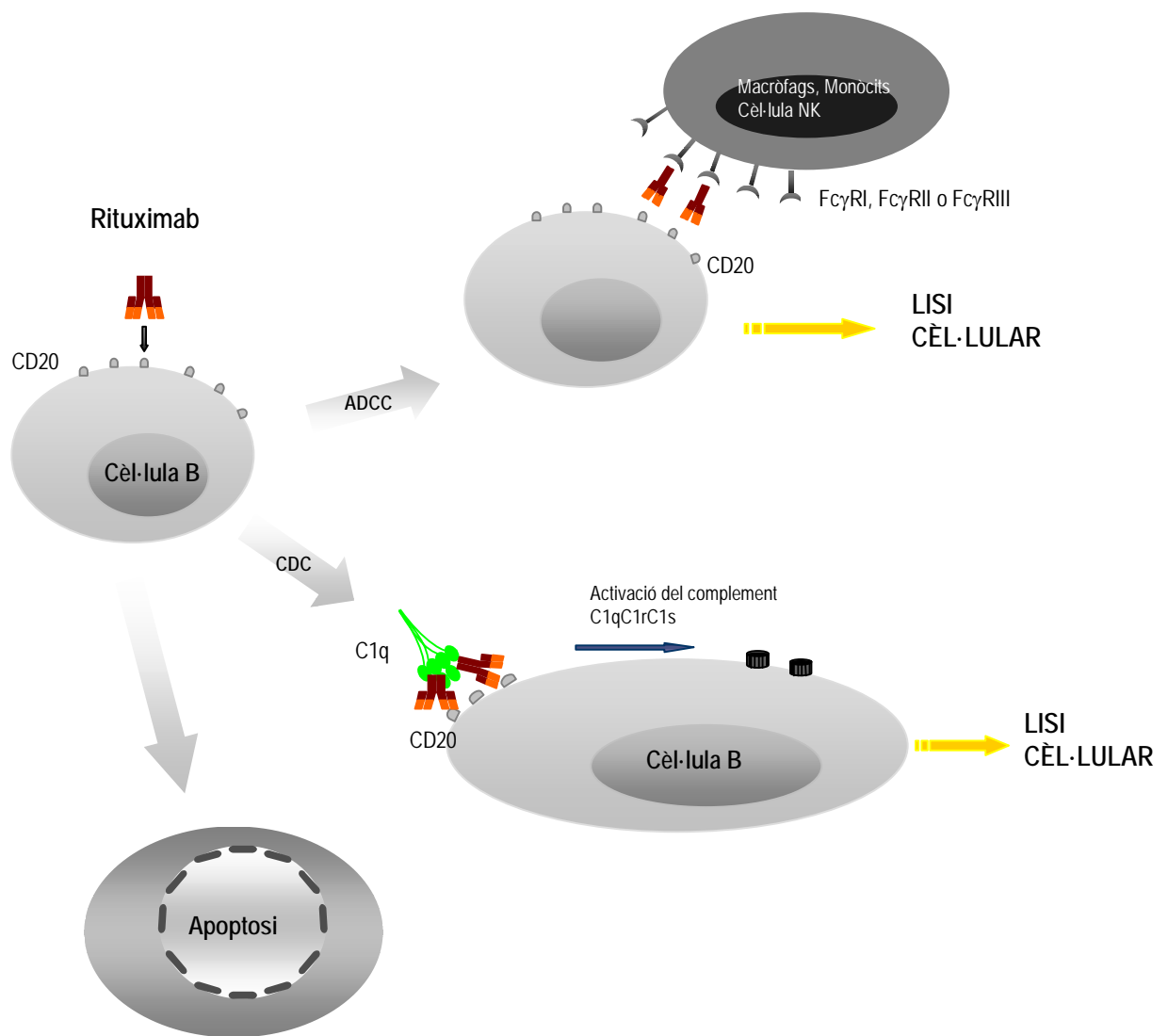


Figura 5. Esquema que il·lustra alguns mecanismes d'acció del rituximab.

3.2.4.1 ADCC

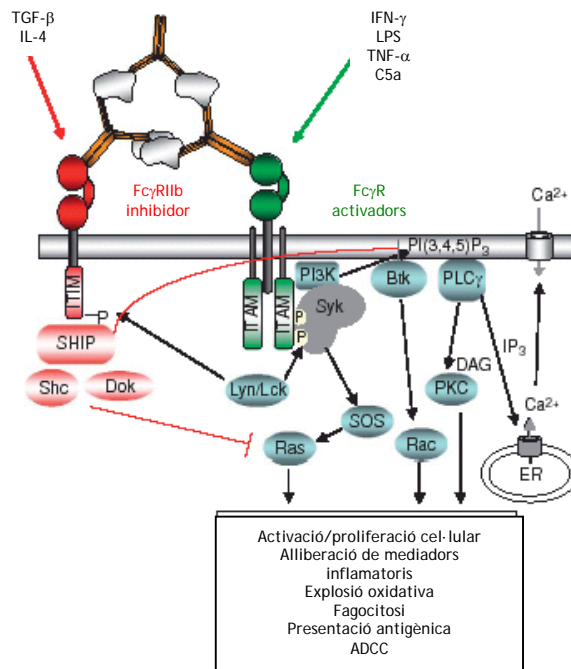
L'ADCC és un dels principals mecanismes efectors immunològics en l'eradicació de patògens intracel·lulars i cèl·lules tumorals. La unió de l'IgG als antígens de la cèl·lula diana provoca el reclutament de cèl·lules efectores que expressen receptors específics Fcγ. Les cèl·lules efectores a través d'aquests receptors específics interaccionen amb la regió Fc de les immunoglobulines, induint la fagocitosi de les

cèl·lules diana o bé l'alliberació dels seus grànuls citotòxics, provocant la mort cel·lular.

Receptors Fc γ

Els receptors Fc γ són un grup de glicoproteïnes de superfície que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines [97]. Aquests receptors regulen l'activació cel·lular, l'aclariment d'immunocomplexes (IC), l'homeòstasi d'immunoglobulines circulants i l'activació de respostes immunes. Dels receptors Fc, els receptors Fc γ i els receptors Fc α , s'uneixen a les regions Fc de la IgG i de la IgA respectivament, implicant-se en l'ADCC. En funció de l'afinitat pel lligand que tenen aquests receptors es poden dividir en receptors de baixa i alta afinitat. Els receptors d'alta afinitat s'uneixen a la IgG monomèrica i normalment estan ocupats per l'IgG del plasma. Els receptors de baixa afinitat s'uneixen a agregats d'IgG i als IC d'IgG [98, 99].

Hi ha tres tipus de receptors Fc γ que poden ser tant activadors com inhibidors: el Fc γ RI (CD64), el Fc γ RII (CD32) i el Fc γ RIII (CD16). Aquests receptors es poden coexpressar a la mateixa cèl·lula, per tant la unió de l'IC a la cèl·lula pot activar les vies de senyalització tant de receptors activadors com de receptors inhibidors, i la magnitud de la resposta estarà en funció de la fixació d'un lligand (Figura 6) [100]. El Fc γ RIa, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc i Fc γ RIIIa són receptors activadors degut a la presència d'un motiu ITAM en el domini citoplasmàtic (Fc γ RIIa, Fc γ RIIc) o en la cadena γ accessòria (Fc γ RIa, Fc γ RIIIa). La unió d'aquests receptors activadors amb les cèl·lules sensibilitzades amb la IgG o amb IC IgG indueix la fosforilació de la tirosina del motiu ITAM per Src tirosin cinasa. Com a conseqüència d'això es produirà una cascada de senyals que provoquen respostes cel·lulars del tipus fagocitosi, exocitosi de grànuls, ADCC o síntesi de citocines. Només s'ha identificat un receptor Fc inhibidor tant en humans com en ratolins que és el Fc γ RIIb. Aquest receptor inclou 2 isoformes, Fc γ RIIb1 i Fc γ RIIb2, i conté un motiu ITIM en el seu domini citoplasmàtic. A les cèl·lules B, que no expressen receptors activadors, el Fc γ RIIb regula les cascades de senyalització activadores iniciades pel receptor dels limfòcits B (BCR) com la seva activació [98, 101-103]. És molt important tenir present que lligands amb baixa afinitat donen complexes no productors de senyals, que no són capaços de continuar la cascada de senyalització i, fins i tot que poden comportar-se com antagonistes [104].



Nimmerjahn F. and Ravetch J.V. *Advances in Immunology* 2007 96:179-204

Figura 6. Regulació conjunta de les senyals dels receptors Fc activadors i inhibidors.

Els IC s'uneixen a les cèl·lules efectores del sistema immunitari i donen lloc de manera simultània a senyals activadores i inhibidores. Lyn/Lck fosforila ambdós motius ITIM i ITAM al domini citoplasmàtic, iniciant les dues cascades de senyalització. Les línies vermelles indiquen els punts on les senyals inhibidores interfereixen amb les activadores. A dalt es troben els factors que poden variar el balanç de l'expressió de receptors activadors i inhibidors.

Recentment, s'ha descrit un nou membre de la família de receptors Fcγ en ratolins, encara que l'homòleg en humans no es coneix. Aquest receptor és el FcγRIV que s'expressa en neutròfils, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques. S'uneix a l'IgG2a i l'IgG2b amb una afinitat intermèdia, però no als isotips IgG1 o IgG3, i sembla ser que té funcions efectores activadores [105, 106]. L'expressió d'aquests receptors està en funció del tipus cel·lular (Taula 6).

	FcγRI	FcγRIIa	FcγRIIb	FcγRIIc	FcγRIIIa	FcγRIIIb
Monòcits/macròfags	+	+	+	-	+	-
Cèl·lules NK	-	-	-	+	+	-
Neutròfils	±	+	-	-	-	+
Limfòcits B	-	-	+	-	-	-
Cèl·lules dendrítiques	+	+	+	-	+	-
Mastòcits	±	+	+	-	-	-
Plaquetes	-	+	-	-	-	-

Taula 6. Expressió dels receptors Fcγ.

L'ADCC és un clàssic exemple de cooperació entre la resposta immune innata i l'adaptativa davant infeccions i tumors. Dintre de l'ADCC trobem com a cèl·lules efectores: les cèl·lules NK, monòcits-macròfags i leucòcits polimorfonuclears (especialment neutròfils). D'aquestes cèl·lules, les més importants són les cèl·lules NK portadores dels receptors de superfície $Fc\gamma RIIc$ (CD32c) i $Fc\gamma RIIIa$ (CD16a) [107-109]. Destruïxen les cèl·lules diana principalment alliberant grànuls citotòxics (perforina, granulinsina i granzim). Els macròfags fagociten les cèl·lules tumorals cobertes d'anticossos alliberant òxid nítric, radicals d'oxigen i una varietat de proteases. A més a més, poden destruir les cèl·lules diana per interaccions Fas/FasL [110]. El mecanisme d'acció dels neutròfils no queda clar. En principi fan l'ADCC via $Fc\alpha RI$ (CD89), però alguns autors han suggerit que transfereixen caspases activades a la cèl·lula diana durant la formació del conjugat [111, 112]. No obstant, el receptor CD16 juga un paper primordial en l'ADCC via cèl·lules NK per la qual cosa en ocasions s'ha anomenat receptor de l'ADCC [113].

Els anticossos monoclonals citotòxics dirigits contra tumors interaccionen amb els receptors $Fc\gamma$ tant activadors ($Fc\gamma RIII$) com inhibidors ($Fc\gamma RIIb$) presents a les cèl·lules mieloides. Certs estudis han demostrat que la regressió tumoral és més important en el ratolí deficient del receptor $Fc\gamma RIIb$ que en el ratolí no modificat; per altre banda el ratolí deficient del receptor $Fc\gamma RIII$ no pot evitar el creixement tumoral en presència d'anticossos monoclonals terapèutics [98]. A més, la depleció de limfòcits B pel rituximab depèn dels receptors $Fc\gamma RI$ i $Fc\gamma RIII$ [114]. Un polimorfisme al receptor $Fc\gamma RIIIa$ descriu que els pacients homozigots per l'al·lel Val158 responen millor al tractament amb rituximab que els homozigots per l'al·lel Fe158 [115, 116].

3.2.4.2 CDC

La CDC també és un mecanisme efector important en l'eradicació d'agents estranys i cèl·lules neoplàsiques. El sistema del complement actua a través de tres vies, la via clàssica, l'alternativa i la de les lectines, que convergeixen i generen a la fi les mateixes molècules efectores. La via clàssica requereix d'immunoglobulines, mentre que les altres dues s'activen directament a través de productes microbians. El primer pas en l'activació de la via clàssica, és la unió del component C1q a la Fc de la IgG o de la IgM. Aquesta unió desencadena una cascada proteolítica donant lloc a grans

quantitats del component C3b, principal molècula efectora del sistema del complement. Aquesta molècula actua per una banda com una opsonina i per altre unint-se a la C3 convertasa per donar lloc a la C5 convertasa, i posteriorment formar-se el complex d'atac a la membrana (MAC) que matarà a les cèl·lules mitjançant la disrupció de la membrana cel·lular (Figura 7). La molècula C3 està en grans quantitats al plasma i s'encarrega d'inactivar ràpidament les molècules C3b que es van generant i no s'uneixen al complex C5 convertasa. El C3b també es pot unir als receptors del complement expressats en cèl·lules efectores, com són granulòcits, macròfags o cèl·lules NK, i pot induir lisi cel·lular o fagocitosi [57].

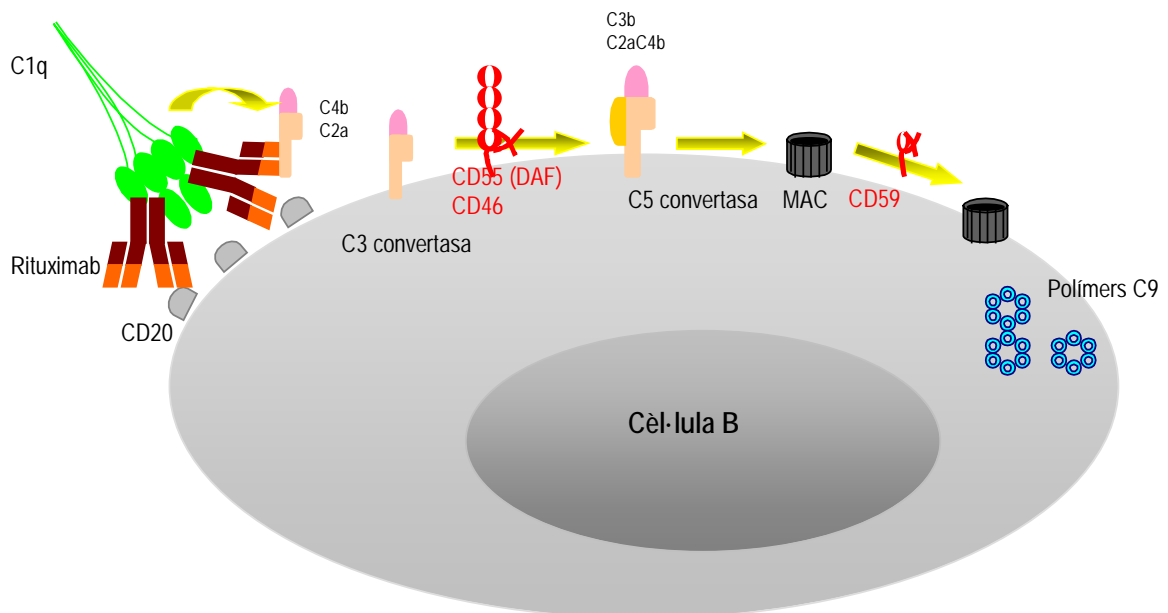


Figura 7. Activació de la via clàssica del complement.

Diferents estudis *in vitro* han demostrat que el rituximab indueix CDC en línies cel·lulars de limfoma B i en cèl·lules primàries de limfoma B [96, 117-119]; correlacionant-se aquesta lisi en part amb els nivells d'expressió de l'antigen CD20 [117, 118, 120]. La capacitat que tenen els diferents anticòsos monoclonals en induir CDC sembla ser que depèn de la seva capacitat en traslocar el CD20 dintre dels *lipids rafts* i aquest efecte podria dependre del determinant antigènic reconegut per l'anticòs monoclonal. Després del tractament amb rituximab s'ha pogut observar un augment de productes d'activació del complement i una correlació d'aquests amb els efectes

secundaris observats després de la primera infusió [121]. La primera publicació demostrant que l'activació del complement és un requisit indispensable per l'acció del rituximab va ser en un model de ratolí deficient en C1q al que s'inoculaven cèl·lules de limfoma isogènic (EL4) transduïdes amb CD20 humà i quan aquest ratolí es tractava amb rituximab era incapaç de curar-lo [122]. Resultats similars s'han obtingut en un model de xenoemplant de limfoma deplecionat de complement [123].

Per prevenir el dany a teixits existeixen una sèrie de proteïnes reguladores del complement (PRC) que inhibeixen aquest sistema, sent les més importants CD46, CD55 i CD59. El CD55 o DAF (factor accelerador de la degradació) accelera la degradació del C3 i C5 convertasa; el CD46 o MCP (proteïna cofactora de membrana) actua com a cofactor pel trencament del C3b i C4b. El CD59 prevé la formació de porus pel MAC. Encara que les cèl·lules B neoplàsiques expressen proteïnes reguladores del complement [117, 118], cosa que permetria que aquestes cèl·lules s'escapessin de l'atac del complement, no s'ha observat una relació directa entre l'expressió del CD20/PRC i la inducció de CDC pel rituximab [74, 117-119, 124] ni correlació amb la resposta clínica [119]. El que sí s'ha vist és que neutralitzant el CD59 (i menor mesura el CD55 i CD46) amb anticossos monoclonals bloquejants augmenta *in vitro* la CDC [74, 118, 125].

3.2.4.3 APOPTOSI

L'apoptosi és una forma de suïcidi cel·lular on la cèl·lula, mitjançant l'activació d'un programa intern molt conservat evolutivament, inicia la seva pròpia mort [126-130]. La integritat del citoesquelet es perd, la membrana forma invaginacions i exposa a la cara externa molècules de fosfatidilserina [131]. S'activen endonucleases amb afinitat per l'ADN internucleosomal que degradaran l'ADN i es perd la funció mitocondrial [132]. Per últim, la fagocitosis de les cèl·lules apoptòtiques no promou cap resposta inflamatòria, ja que aquestes cèl·lules formen els cossos apoptòtics (restes cel·lulars que mantenen íntegra la membrana cel·lular), fins que són fagocitats.

L'apoptosi principalment té lloc a través de 2 vies que donen lloc a l'activació de caspases (*cytosolic cysteine-proteases*). Les senyals d'estrès intracel·lulars indueixen apoptosi a través de proteïnes de la família bcl-2 provocant l'activació de la caspasa-9 (via mitocondrial), mentre que la via de receptors de mort (Fas, lligand inductor d'apoptosi relacionat amb el TNF [TRAIL], i receptors del factor de necrosi tumoral

[TNF]) està induïda per senyals externes a través de la caspasa-8. Tant la caspasa-8 com la caspasa-9 posteriorment indueixen l'activació de caspases per sota de la cascada, com seria el cas de la caspasa-3 que provocarà la mort cel·lular (Figura 8).

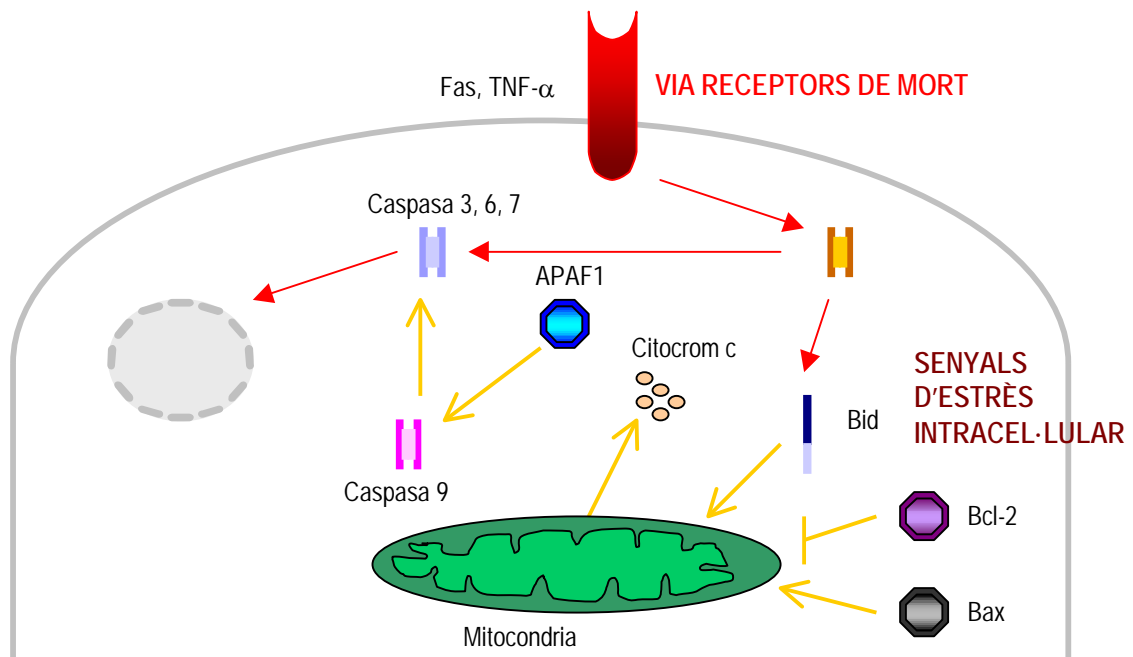


Figura 8. Principals vies d'activació apoptòtiques: receptors de mort i senyals d'estrès intracel·lular.

S'ha publicat que l'activació del Src a través del CD20 dóna lloc a una fosforilació ràpida de la fosfolipasa C-γ1 (PLC-γ1) i de PLC-γ2 [60], que indueixen l'influx de Ca²⁺ i l'activació de la caspasa-3 [63, 133]. L'apoptosi induïda a través del CD20 es redueix significativament a través d'inhibidors del Csk [63], inhibidors de les caspases, i per quelants del Ca²⁺ [63, 134, 135], fets que van a favor de que la unió del CD20 provoca l'activitat del Csk, donant lloc a la fosforilació de PLC-γ, un augment dels nivells de Ca²⁺ citoplasmàtic, i posteriorment l'activació de la caspasa-3 [62, 63]. Un fet important de l'apoptosi és la seva modulació a través de membres tant proapoptòtics com antiapoptòtics de la família del gen bcl-2 (per exemple la proteïna bcl-2 trenca aquesta maquinaria de mort cel·lular bloquejant l'activitat de les caspases, regulant el flux de Ca²⁺ o exercint una activitat antioxidantiva) [136-138].

3.2.4.4 EFECTE SINÈRGIC AMB LA QUIMIOTERÀPIA

El rituximab té sinergisme amb la quimioteràpia perquè sensibilitza les cèl·lules malignes a l'efecte apoptòtic i citotòxic de nombrosos fàrmacs (doxorubicina, cisplatí, dexametasona, fludarabina, retinòids) [139, 140]. Regula a la baixa la IL-10 en algunes línies cel·lulars de limfoma, que en condicions normals promou l'expressió de bcl-2 en cèl·lules B, fent-les d'aquesta manera més susceptibles a l'estímul apoptòtic [141, 142]. Això s'ha de tenir en compte en pacients amb LNH on les seves cèl·lules B sobreexpressen bcl-2 [143].

3.2.5 Indicacions terapèutiques del rituximab al LNH

Des del 1997, que es va aprovar pel tractament dels LNH de cèl·lules B, CD20⁺, refractaris o en recaiguda, s'estan tractant amb rituximab altres malalties malignes de cèl·lules B CD20⁺ com són la malaltia de Hodgkin, la LLC, el limfoma d'alt grau i la malaltia de Waldenstrom, obtenint-se uns resultats prometedors.

Actualment la FDA té aprovat el rituximab per:

- ✓ Pacients amb limfoma fol·licular o de baix grau en recaiguda o refractari al tractament.
- ✓ Com a primera línia associat a quimioteràpia (CVP) en limfoma fol·licular.
- ✓ Com a manteniment en limfoma de baix grau amb malaltia estable o que han respòs de manera parcial o complerta a la teràpia d'inducció amb CVP.
- ✓ Com a primera línia associat a CHOP en limfoma difús de cèl·lules B grans.

Molts pacients amb limfoma reben rituximab en algun moment del seu tractament, però en un percentatge alt la resposta és parcial i no tots responen de la mateixa manera al tractament amb rituximab. Sembla ser que aquestes diferències són degudes en part als nivells d'expressió de l'antigen CD20, ja que el percentatge de resposta varia des d'un 75% de resposta en limfomes fol·liculars no tractats prèviament (limfomes que histològicament presenten una alta densitat antigènica) fins a un 15% en limfomes limfocítics de cèl·lules petites tractats prèviament (limfomes amb baixa densitat antigènica) [82, 87, 88, 144]. No obstant, el potencial del rituximab no s'ha vist fins que s'ha combinat amb quimioteràpia convencional, com CHOP (ciclofosfamida,

doxorubicina, vincristina i prednisona), on el grau de resposta ha millorat significativament amb un percentatge de resposta més alt i una supervivència més llarga [145]. L'impacte més alt d'aquestes combinacions ha estat en el limfoma difús de cèl·lules B grans on la combinació amb CHOP està considerada de primera línia en tots els pacients [146].

3.2.6 Efectes secundaris del rituximab

Encara que normalment el rituximab és un fàrmac molt bé tolerat per la majoria de pacients, existeixen una sèrie d'efectes secundaris relacionats amb la infusió de la primera dosi [87]. Aquests efectes indesitjables s'han relacionat amb l'activació del complement i amb el nombre de cèl·lules B circulants [121]. Dintre d'aquests símptomes tenim calfreds, febre, hipotensió i debilitat. La correlació d'aquests símptomes amb els nivells de citocines circulants és controvertida, en algun estudi s'ha trobat relació amb els nivells d'IL-6 i TNF- α [147] però, en altres estudis no s'ha observat una correlació amb els nivells de citocines [121, 147]. Per tant, el responsable de la severitat d'aquests efectes secundaris podria ser l'activació del complement. De fet una reducció en la taxa d'infusió és normalment efectiva per controlar aquests efectes indesitjables [148, 149]. No obstant, és important tenir en compte que en alguns pacients han estat greus i han acabat amb la vida dels malalts [150], com és el cas de: la hipòxia i el col·lapse cardiovascular, la síndrome de lisi tumoral, i una reacció mucocutània severa (efectes confinats a pacients amb limfoma) [151].

4 RESPOSTA IMMUNITARIA TUMORAL

L'aparició de neoplàsies es dona com a conseqüència d'una proliferació incontrolada i una propagació de clons de cèl·lules transformades. El creixement dels tumors malignes depèn en gran mesura de la capacitat que tenen les cèl·lules neoplàsiques de proliferar i de l'habilitat per envair teixits de l'hoste i metastatitzar a distància. El concepte de "vigilància immunitària" proposat per Macfarlane Burnet als anys cinquanta, proposa que el sistema immunitari posseeix una funció fisiològica consistent en detectar i destruir clons cel·lulars potencialment malignes, abans que causin l'aparició de tumors, i eliminar els tumors si finalment apareixen. A més, un dels factors que influeixen en el creixement dels tumors malignes és la capacitat que adquireixen les seves cèl·lules per evadir o superar els mecanismes de defensa de l'hoste.

S'ha demostrat que els mecanismes efectors de la immunitat tant cel·lular com humoral poden destruir les cèl·lules tumorals *in vitro*. Un dels desafiaments presents a les teràpies antitumorals és poder contribuir en les respostes immunitàries protectores front als tumors, potenciant mecanismes efectors, perquè es converteixin en específics del tumor.

Una de les funcions prínceps del sistema immunològic en la resposta antitumoral és discernir entre una cèl·lula tumoral i una cèl·lula normal. Pel sistema immune innat, probablement el fet distintiu sigui l'alt grau d'apoptosi i de remodelament tissular que existeixen en aquests processos. Un gran nombre de *heat shock proteins* (HSP) alliberades per les cèl·lules apoptòtiques i de fragments proteolítics procedents de la remodelació tissular presents a la matriu extracel·lular, poden ser reconeguts pels lligands dels receptors *Toll like* (TLRs) i provocar reaccions inflamatòries en aquest context. A més, l'estrès oxidatiu associat al creixement de cèl·lules neoplàsiques indueix l'expressió de proteïnes a la superfície cel·lular que seran reconegudes per receptors activadors presents a cèl·lules efectores, com són les de cèl·lules NK, NKT i cèl·lules T $\gamma\delta$. En aquest grup de proteïnes s'inclouen MIC-A i MIC-B (proteïnes del MHC de classe I *like*) que activen per exemple a les cèl·lules NK i a algunes cèl·lules T $\gamma\delta$ a través del receptor NKG2D. Per tant, el reconeixement immune innat probablement és el que inicia la resposta inflamatòria i la producció de citocines a les zones de creixement tumoral. A la vegada, aquestes citocines inflamatòries mobilitzaran cèl·lules

dendrítiques immadures perquè presentin antígens associats a cèl·lules tumorals a les cèl·lules T $\alpha\beta$, i d'aquesta manera iniciar la resposta immune adaptativa (Figura 9)[1].

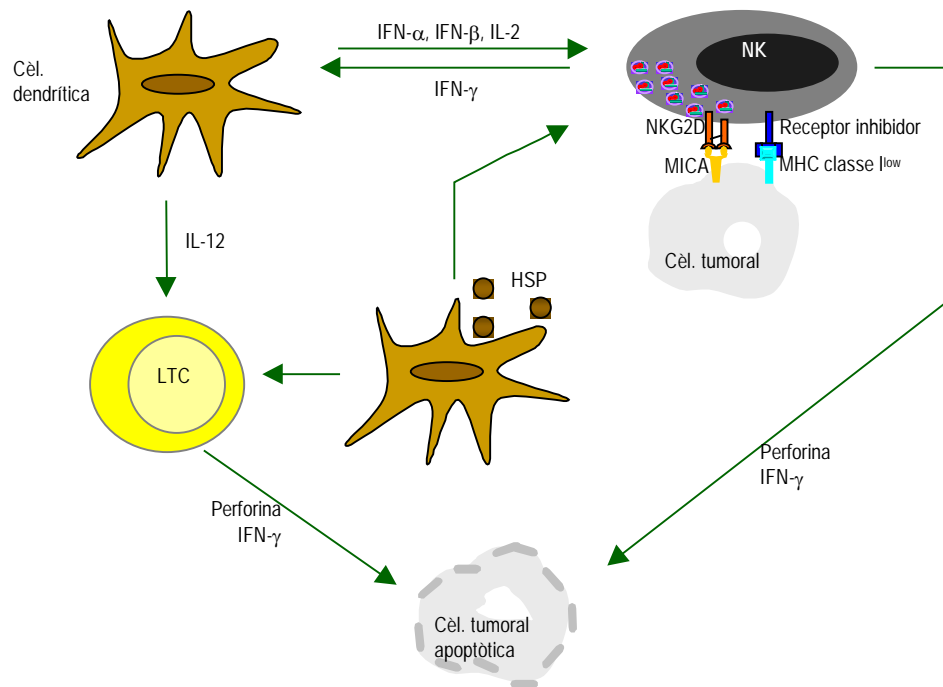


Figura 9. Encreuament de la immunitat innata i l'adaptativa als tumors.

L'activació de les cèl·lules NK a través de les cèl·lules dendrítiques pot afectar l'habilitat d'aquestes lisant el tumor (perforines) o bé reduir el creixement i capacitat metastàtica del tumor (IFN- γ). Les cèl·lules NK que han interaccionat amb les cèl·lules diana tumorals poden secretar citocines que afecten la maduració de les cèl·lules dendrítiques, i així participar en la generació i/o manteniment de la resposta específica de cèl·lules T contra el tumor. A més, tumors que secreten certes proteïnes, com HSP, són rebutjats per respostes antitumorals dependents dels limfòcits T citotòxics, generats en presència de cèl·lules NK.

4.1 CÈL·LULES NK

Les cèl·lules NK juntament amb els neutròfils i els macròfags són les principals cèl·lules efectores de la resposta immune innata. Són limfòcits que reconeixen cèl·lules estressades i/o infectades per directament matar-les i que secreten citocines inflammatòries. Estan implicades en la destrucció de molts tipus de cèl·lules tumorals. *In vitro*, tenen la capacitat de destruir cèl·lules infectades per virus i determinades línies cel·lulars tumorals, sobretot de tipus hematopoètic. *In vivo*, no es coneix amb claredat la participació d'aquests limfòcits en la immunitat tumoral, però s'ha postulat que el fet que ratolins deficients en limfòcits T no tinguin un augment en la incidència de

tumors espontanis, podria ser degut a que aquests ratolins tenen un nombre de cèl·lules NK normals; sent aquestes cèl·lules NK les responsables de fer la funció de “vigilància immunitària”. A més, s’ha descrit que pacients amb deficiència de cèl·lules NK tenen una incidència major de limfomes associats al VEB.

4.1.1 Característiques de les cèl·lules NK/NKT

La cèl·lula NK és un limfòcit granular gros que juga un paper molt important en la immunitat innata, com a primera línia de defensa contra cèl·lules infectades per virus i cèl·lules tumorals. No necessiten sensibilització prèvia per matar aquests tipus cel·lulars, a la vegada que alliberen citocines immunoreguladores i quimiocines. Les cèl·lules NK reconeixen les seves cèl·lules diana a través de receptors que reconeixen a l’MHC de classe I propi i a l’MHC de classe I *like*, i d’aquesta manera poden inhibir o potenciar la mort cel·lular.

Hi ha un grup de cèl·lules NK que expressen la molècula CD3 (cèl·lules NKT). Aquestes cèl·lules tenen funcionalitat innata i comparteixen, tant funcions com estructures de receptors amb les cèl·lules T i les cèl·lules NK convencionals.

4.1.2 Desenvolupament de les cèl·lules NK

Durant les últimes tres dècades s’havia acceptat que el desenvolupament primari de les cèl·lules NK tenia lloc a la medul·la òssia. No obstant, la possibilitat que cèl·lules precursors de medul·la òssia o estadis intermedis d’aquestes cèl·lules poguessin anar a teixits perifèrics i madurar no ha estat mai exclosa.

L’anàlisi combinat de:

- *lineage differentiation potentials*
- la capacitat de produir citocines
- la capacitat de tenir citotoxicitat natural
- el perfil d’expressió de gens
- el perfil fenotípic a superfície

donen lloc, en base a dades prèvies en humans i ratolins, als diferents estadis de desenvolupament d’aquestes cèl·lules.

És important tenir present que el procés de desenvolupament als teixits limfoides secundaris és un procés dinàmic continu. La totalitat de cèl·lules d'un subgrup no es troben sincronitzades en el mateix estadi maduratiu, i encara que aquestes poblacions exhibeixen característiques diferenciadores sempre queden alguns fets heterogenis que fan possible l'existència de subgrups addicionals. A continuació es pot observar el model proposat de desenvolupament *in vivo* de cèl·lules NK humanes (Figura 10)[152].

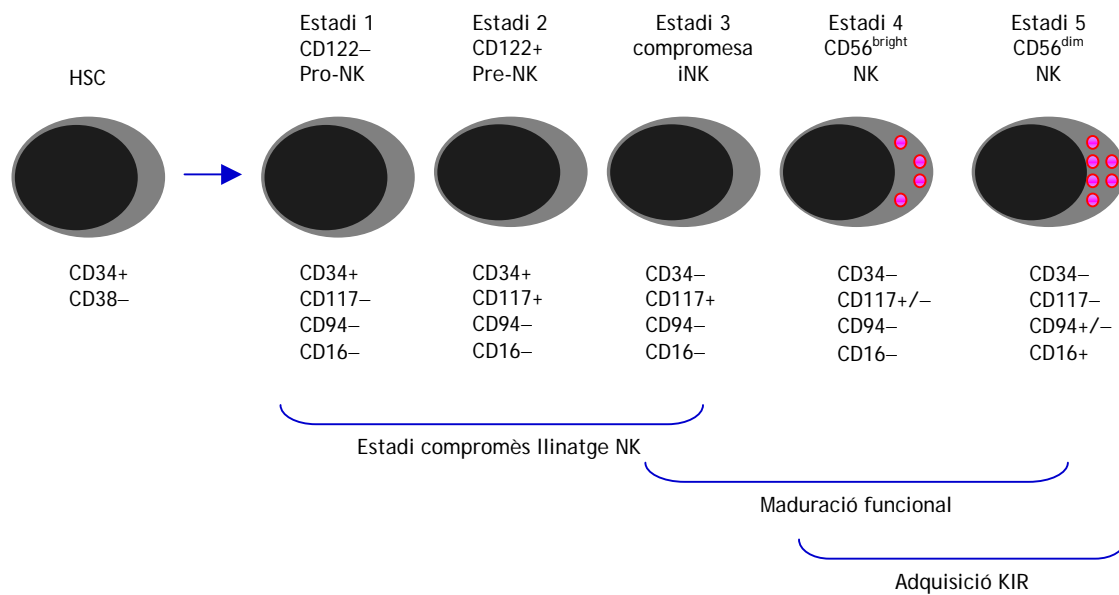


Figura 10. Model proposat pel desenvolupament de cèl·lules NK *in vivo*.

4.1.3 Biologia de les cèl·lules NK

Aquestes cèl·lules fenotípicament expressen a la seva superfície l'antigen CD56 i perden el CD3. Dintre de les seves funcions s'inclou la producció de citocines immunoreguladores com són l'INF- γ , TNF- α , IL-10 i GM-CSF, així com varies quimiocines que donen lloc a una resposta immune immediata [153]. Tenen activitat citotòxica espontània contra cèl·lules infectades per virus, cèl·lules leucèmiques i altres cèl·lules tumorals; a la vegada que produeixen la citotoxicitat cel·lular mitjançada per anticossos a través del receptor Fc γ RIII (CD16).[154] Existeixen 2 subclasses de cèl·lules NK en funció del grau d'expressió de l'antigen CD16 (Taula 7) [155].

CD56 ^{dim}	CD56 ^{brigh}
Aproximadament el 90%	Aproximadament el 10%
(+++) CD16	(+) CD16
Molta capacitat citotòxica	Poca capacitat citotòxica
Afinitat intermèdia pel IL-2R _{αβγ} (no respon a baixes dosis d'IL-2)	Afinitat alta pel IL-2R _{αβγ} (si respon a baixes dosis d'IL-2)
Poca síntesi d'IFN-γ, TNF-α, TNF-β, GM-CSF, IL-10	Sintetitzen grans quantitats d'IFN-γ, TNF-α, TNF-β, GM-CSF, IL-10
(+++) receptors KIRs	(+) receptors KIRs
(+++) receptors de la família de les lectines de tipus C CD94/NKG2	(+++) receptors de la família de les lectines de tipus C CD94/NKG2

Taula 7. Subclasses de cèl·lules NK.

4.1.4 Receptors de les cèl·lules NK

Per combatre amb rapidesa un procés, les cèl·lules NK han d'haver aconseguit tenir un reconeixement específic de cèl·lules infectades o alterades mantenint la tolerància per lo propi. La hipòtesi del *"missing-self"* [156] aposta pel paper dels receptors inhibidors i les seves dianes (MHC de classe I) com a responsables d'aquesta especificitat. Hi ha dades que suggereixen que la quantitat de molècules d'MHC de classe I a la superfície de les cèl·lules diana és proporcional al grau d'inhibició. No obstant, sembla bastant clar que els receptors activadors contribueixen substancialment en l'especificitat d'aquestes cèl·lules. En models experimentals, quan molts receptors activadors estan units simultàniament o quan un nombre suficient de receptors activadors potents estan estimulats, les cèl·lules NK són capaces d'eliminar eficientment cèl·lules que fins i tot tenen els seus receptors inhibidors units a les molècules d'MHC de classe I [157-159]. Per tant, la falta de resposta pot ser degut tant per l'activació de receptors inhibidors com per l'absència d'una senyal activadora suficientment potent per iniciar la resposta (Figura 11).

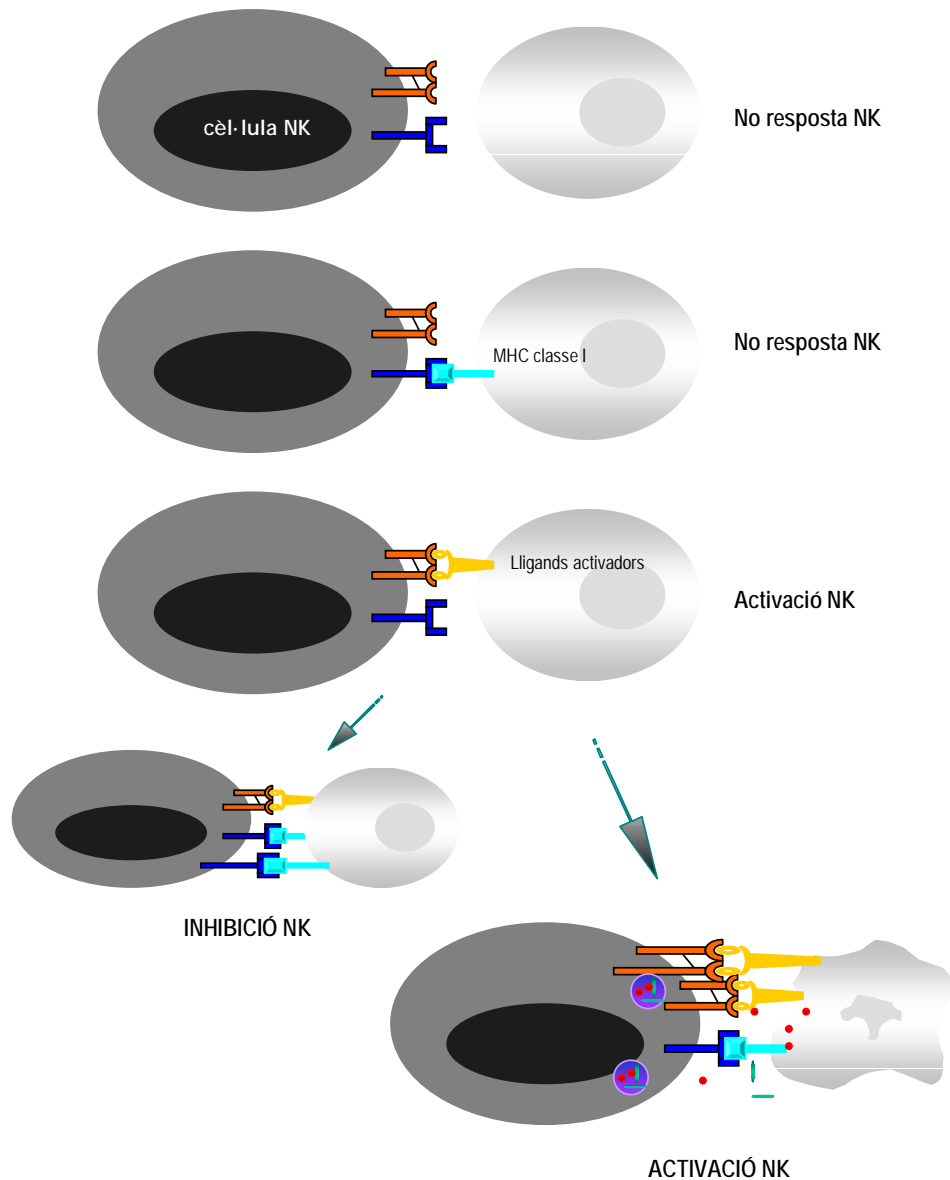


Figura 11. Esquema d'activació i inhibició de les cèl·lules NK.

La quantitat de receptors activadors i inhibidors presents a les cèl·lules NK, i la quantitat de lligands a les cèl·lules diana, així com les diferències qualitatives a les senyals transduïdes, determina el grau de resposta de les cèl·lules NK.

S'han caracteritzat un gran nombre de receptors activadors estructuralment diferents. A diferència dels receptors inhibidors, molts es troben expressats en totes les cèl·lules NK. A més, indueixen cascades de senyalització diferents, mentre que els inhibidors sembla ser que utilitzen un mecanisme comú pel seu funcionament [154, 160]. Alguns dels receptors activadors i inhibidors amb els seus lligands es poden trobar enumerats a la taula 8 i 9.

	RECEPTOR	LLIGAND
ITAM	CD16 (Fc γ RIIIa)	IgG
	NKp46 (CD335)	Hemaglutinina viral
	NKp30 (CD337)	No determinat
	NKp44 (CD336)	No determinat
	NKp80	AICL
	KIR2DS1 (CD158h)	HLA-C (baixa afinitat)
	KIR2DS2 (CD158j)	No determinat
	KIR2DS3 (CD158i)	No determinat
	KIR2DS4 (CD158i)	HLA-C (baixa afinitat)
	KIR2DS5(CD158g)	No determinat
	KIR3DS1 (CD158e2)	No determinat
NKG2C (CD94/159c)	HLA-E	
NO ITAM	NKG2D (CD314)	ULBPs, MIC-A, MIC-B
	2B4 (CD244)	CD48
	CD2	LFA-3 (CD58)
	CRACC (CD319)	CRACC (CD319)
	NTB-A	NTB-A
	DNAM-1 (CD226)	PVR (CD155), nectina-2 (CD112)
	CD96	PVR (CD155), nectina-2 (CD112)
	CD7	SECTM1, Galectin
	CD27	CD70
	CD28	CD80, CD86
	CD69	No determinat
	CD122 (IL-2R β)	IL-2, IL-15
	CD59	C8, C9
	BY55 (CD160)	HLA-C
	KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G soluble
CD44	Hialuronan	
Integrina	LFA-1 (α L β 2, CD11a/18)	ICAM-1-5
	MAC-1 (α M β 2, CD11b/18)	ICAM-1, iC3b, Fibrinogen
	CD11c/18	ICAM-1, iC3b
	VLA-4(α 4 β 1, CD49d/29)	VCAM-1, Fibronectina
	VLA-5(α 5 β 1, CD49e/29)	Fibronectina

Taula 8. Receptors activadors presents a cèl·lules NK amb els seus lligands.

ITIM	KIR2DL1 (CD158a)	HLA-Cw4	MHC
	KIR2DL2/3 (CD158b)	HLA-Cw3	
	KIR2DL4 (CD158d)	HLA-G	
	KIR2DL5 (CD158f)	No determinat	
	KIR3DL1 (CD158e1)	HLA-Bw4	
	KIR3DL2 (CD158k)	HLA-A3 i A11	
	LIR-1/ILT2 (CD85)	Múltiples HLA classe I (A, B, G)	
	NKG2A (CD94/CD159a)	HLA-E	
	KLRG1	E/N/P-cadherina	No MHC
	NKR-P1 (CD161)	LLT1	
Siglec-7 (CD328)	Àcid siàlic		
Siglec-9 (CD329)	Àcid siàlic		
IRp60 (CD300a)	No determinat		
TGF- β R	Família TGF- β		

Taula 9. Receptors inhibidors presents a cèl·lules NK amb els seus lligands.

4.1.4.1 RECEPTORS KIRs (*Killer immunoglobulin-like receptors*)

La família de gens KIR humans conté 15 gens i 2 pseudogens que estan íntimament relacionats al cromosoma 19q13.4. El nombre de gens KIR al genoma de cada individu varia dintre de la població. Aquests gens s'expressen a cèl·lules NK, $T\gamma\delta TCR^+$, $T\alpha\beta TCR^+$ memòria/efectores (normalment $CD8^+$ i algunes $CD4^+$, però no timòcits o T naíf) [161, 162]. Una vegada els gens KIR s'expressen a les cèl·lules NK o al clon de cèl·lules T, aquests es mantenen estables a la progènie d'aquestes cèl·lules [163, 164].

Els receptors KIRs pertanyen a la superfamília d'immunoglobulines i són glicoproteïnes de transmembrana de tipus I, caracteritzant-se per tenir 2 o 3 dominis "*immunoglobulin-like*" a la regió extracel·lular. Aquests receptors reconeixen específicament els al·lels HLA-A, HLA-B i HLA-C i produeixen tant senyals estimuladores com inhibidores en funció de la seqüència del domini intracel·lular [165, 166]. A nivell extracel·lular tant els KIRs activadors com els inhibidors tenen els mateixos dominis i per tant es poden unir als mateixos lligands. Són receptors de cadena única amb dos (KIR2D) o tres (KIR3D) dominis *immunoglobulin-like*, que posteriorment es poden subdividir en KIR2DL i KIR3DL si tenen una cua citoplasmàtica llarga o en KIR2DS i KIR3DS si la cua es curta [167]. Els que tenen la cua citoplasmàtica llarga generen senyals inhibidores mentre que els que tenen la cua curta les senyals són activadores [168]. Els receptors inhibidors tenen al seu domini citoplasmàtic un motiu d'inhibició de l'immunoreceptor per tirosina (ITIM) que després de la unió del receptor amb el lligand, es fosforilen els residus tirosina per l'acció de les cinases de la família src permetent el reclutament de tirosina fosfatases SHP-1 (i possiblement SHP-2) que desfosforilaran múltiples dianes de la via de motius d'activació de l'immunoreceptor per tirosina (ITAM) [169, 170]. La via activadora té motius ITAMs que quan es fosforilen per cinases de la família src permeten que s'activin tirosina cinases de la família Syk donant lloc a una activació de la cascada per sota [171].

L'afinitat que tenen els receptors inhibidors pels lligands MHC de classe I és molt més alta que la que tenen els receptors activadors [169, 172]; així quan s'uneixen tots dos tipus de receptors la senyal resultant és inhibidora i no s'activen les cèl·lules NK.

4.1.4.2 RECEPTORS *C-TYPE LECTIN LIKE*

Els gens d'aquests receptors es troben al cromosoma humà dintre del complex NK 12p12.3-p13.2. Els receptors de la família de les lectines de tipus C són heterodímers que contenen genèticament una cadena invariant (CD94) relacionada íntimament amb 4 gens de la família NKG2 (NKG2A, -C, -E i -F). Aquests receptors s'expressen a cèl·lules NK, $T\gamma\delta TCR^+$ i en un subgrup de $T\alpha\beta TCR^+$ $CD8^+$ memòria/efectores; i la seva expressió està modulada per citocines (IL-15, TGF- β , IL-12) presents a l'ambient [173, 174]. El NKG2A té un motiu ITIM citoplasmàtic i l'heterodímer CD94/NKG2A funciona com a receptor inhibidor. Per altre banda, l'heterodímer CD94/NKG2C és un receptor activador i requereix de l'associació amb la proteïna adaptadora DAP12 perquè la seva expressió a superfície i la seva senyalització sigui estable [154]. Els clons de cèl·lules NK selectivament porten receptors activadors o inhibidors, encara que hi ha alguns clons que poden coexpressar els receptors NKG2A i NKG2C [175].

Els receptors CD94/NKG2A i CD94/NKG2C s'uneixen a l'HLA-E. Aquest HLA s'uneix a pèptids que provenen de segments d'altres proteïnes MHC de classe I. Per tant, l'expressió i estabilització d'HLA-E a la superfície cel·lular dependrà de la disponibilitat dels pèptids líders proporcionats per l'HLA-A, -B, -C i -G; a més, aquests receptors són capaços de controlar la situació a la cèl·lula de proteïnes de MHC de classe I clàssiques i no clàssiques (HLA-G) utilitzant a l'HLA-E com a substitut [154].

4.1.4.3 RECEPTORS DE CITOTOXICITAT NATURAL

Els receptors NKp30, NKp44 i NKp46 es van identificar arrel de la seva implicació en la mort de cèl·lules tumorals [176]. La seva expressió en cèl·lules NK es correlaciona directament amb la capacitat que tenen per matar cèl·lules tumorals. NKp44 només s'expressa en cèl·lules NK activades amb IL-2 [177]. Aquests receptors es poden associar amb diferents proteïnes transductores de senyals, de manera que en ratolins amb disrupcions en els gens de DAP12, $Fc\gamma$, o $CD3\zeta$ s'observa deficiències selectives en la capacitat de matar determinats tumors [171]. Fins ara però no s'han identificat els lligands d'aquests receptors que faria entendre millor el mecanisme d'interacció entre cèl·lules tumorals i cèl·lules NK. Hi ha experiments indicant que NKp46 s'uneix a hemaglutinines virals [178, 179].

4.1.4.4 RECEPTOR NKG2D

El gen del receptor NKG2D es troba en el complex NK al cromosoma 12p12.3-p13.2. Està codificat per un únic gen que en principi no ha mostrat polimorfismes i funcionalment és un receptor activador [154].

És una glicoproteïna ancorada a la transmembrana que s'expressa com un homodímer unit per ponts disulfur a la superfície cel·lular de [180]:

- Totes les cèl·lules NK.
- Totes les cèl·lules T CD8⁺.
- Es regula a l'alça ràpidament en cèl·lules T CD4⁺ després de la seva activació *in vitro*.
- En un subgrup de cèl·lules NKT.
- En un subgrup de cèl·lules T $\gamma\delta$.

L'expressió de NKG2D a la superfície cel·lular requereix de l'associació amb DAP10. El receptor NKG2D sense estar associat a cap proteïna adaptadora és retingut al citoplasma i degradat [181, 182].

Els seus lligands són proteïnes de les famílies MIC i ULBP que tenen homologies estructurals amb l'MHC de classe I [180]:

1. MIC (*MHC class I chain related*): MIC-A i MIC-B
 - El gen dels membres de la família MIC es troben dintre del gen HLA.
 - No s'associen a la β 2-microglobulina ni uneixen pèptids antigènics.
 - No s'expressen en ratolins.
2. ULBPs: ULBP1, ULBP2, ULBP3 i ULBP4
 - No formen part del complex MHC i es troben al cromosoma 6.
 - Comparteixen només un 25% d'aa amb les proteïnes MIC.
 - Hi ha molta variació dintre d'aquesta família exhibint tant sols un 35% de seqüències d'aa idèntiques.

Els gens MIC són molt polimòrfics amb 54 al·lels el MIC-A i 18 al·lels el MIC-B, observant-se que les variants al·lèliques pel MIC-A poden unir-se amb diferent afinitat al NKG2D. A diferència els gens ULBP no són tant polimòrfics [183, 184].

Els lligands del NKG2D s'expressen [180]:

- En persones sanes MIC-A i MIC-B només s'expressa en cèl·lules epitelials gastrointestinals.
- L'expressió de MIC-A i MIC-B es regula a l'alça en algunes línies tumorals i alguns tumors primaris (sobretot els d'origen epitelial). També, en condicions d'estrès com és una infecció viral o en el *heat shock syndrome*.
- Les molècules ULBP també s'expressen molt poc en cèl·lules normals però normalment la seva expressió es regula a l'alça en cèl·lules infectades i transformades.

L'expressió d'ULBPs a nivell tumoral potencia el reclutament de cèl·lules NK i cèl·lules T en el tumor [185].

4.1.4.5 RECEPTOR Fc γ RIII (CD16)

Els receptors per les immunoglobulines (receptors Fc) estan àmpliament expressats al sistema immunològic i també en tipus cel·lulars més específics com per exemple cèl·lules endotelials, mesangials i osteoclasts [186]. La unió a la porció Fc proporciona un lligam entre l'especificitat del sistema immune adaptatiu i les potents funcions efectores que desencadenen les cèl·lules del sistema immune innat.

Característiques del receptor Fc γ RIII

Aquest receptor és una glicoproteïna de 50-80 kDa. Existeixen 2 gens diferents per aquest receptor i la seva expressió a la cèl·lula és específica:

1. El gen A codifica el receptor Fc γ RIIIa (CD16a) que és una glicoproteïna de transmembrana de classe I i s'expressa en cèl·lules NK, macròfags, monòcits, cèl·lules mesangials renals, mastòcits i una petita fracció de cèl·lules T circulants. Recentment s'ha demostrat que el 10-20% de les cèl·lules T CD8⁺ estimulades amb IL-2 expressen CD16a, donant lloc a l'ADCC independentment de la seva activació via TCR [187]. El CD16a és un complex heterooligomèric, format per un homodímer de cadenes γ unides amb ponts dissulfur o, per un heterodímer de cadenes γ i ζ . Quan la mort cel·lular és via ADCC l'última cadena es fosforila en el residu tirosina, però quan la mort cel·lular és de forma natural això no passa [188]. És significatiu que l'estimulació de les cèl·lules NK activades únicament via CD16 indueix l'AICD.

A més, el CD16a expressat en cèl·lules NK i en monòcits pot variar l'afinitat per la IgG segons el patró de glicosilació del receptor [189].

2. El gen B codifica una versió del CD16 (CD16b), que perd la regió transmembrana i la cua citoplàsmica, ancorant-se a la membrana via glicosil fosfatidil inositol (GPI). Aquest receptor s'expressa en neutròfils i s'implica en la desgranulació i generació de radicals d'oxigen per aquestes cèl·lules [190]. Les cèl·lules efectores d'ADCC de la línia mieloide principalment utilitzen aquest receptor per fagocitar patògens coberts d'IgG i cèl·lules apoptòtiques. Malgrat això, aquestes cèl·lules poden utilitzar altres receptors Fc i jugar un paper en la destrucció de cèl·lules tumorals mitjançant anticossos. El CD16b té menor afinitat d'unió per la IgG humana que el CD16a [113].

Polimorfisme del receptor FcγRIIIa

El gen *FCGR3A* que codifica el receptor FcγRIIIa humà presenta un dimorfisme al nucleòtid 559. Aquest dimorfisme al·lèlic funcional genera al·lotips amb un residu fenilalanina o un residu valina a la posició 158 [191, 192]. Aquest residu interacciona directament amb la regió "bisagra" inferior de la IgG1 [193]. Estudis de citometria de flux han demostrat que les cèl·lules NK que provenen de donants homozigots per la valina s'uneixen més a la IgG1 i IgG3 que les cèl·lules NK que provenen dels homozigots fenilalanina. Aquesta diferència pot ser deguda a un augment d'afinitat d'unió [192] o a un augment d'expressió a membrana d'aquest receptor quan són FcγRIIIa-158VV [194].

4.1.5 Etapes en l'activació de les cèl·lules NK

4.1.5.1 CONTACTE

El contacte cel·lular entre cèl·lules NK i cèl·lules diana dona lloc a una sèrie de canvis moleculars en les cèl·lules NK que condueixen a l'adhesió, polarització de grànuls, desgranulació i producció de citocines [195]. Els receptors que proporcionen aquestes senyals encara estan per determinar amb claredat.

4.1.5.2 ADHESIÓ

Es pensa que l'adhesió és un prerrequisit per les funcions efectores de les cèl·lules NK. La interacció de l'LFA-1 amb ICAM-1/2 és suficient per induir l'adhesió de cèl·lules NK humanes en repòs. Adhesió que es veu incrementada per la coexpressió de lligands pel CD2, CD16 i 2B4 [196].

L'adhesió i senyalització per l'LFA-1 és un procés orquestrat amb molta cura. Els receptors activadors poden proporcionar senyals de dintre a fora, que augmenten l'afinitat de l'LFA-1 com a conseqüència de canvis conformacionals. A la vegada senyals de receptors activadors poden també induir agrupacions de l'LFA-1, que potencien la seva avidesa (Figura 12) [196, 197]. Encara que les evidències genètiques suggereixen una contribució molt important de l'LFA-1 en la adhesió de cèl·lules NK, la contribució d'altres receptors queda encara per definir.

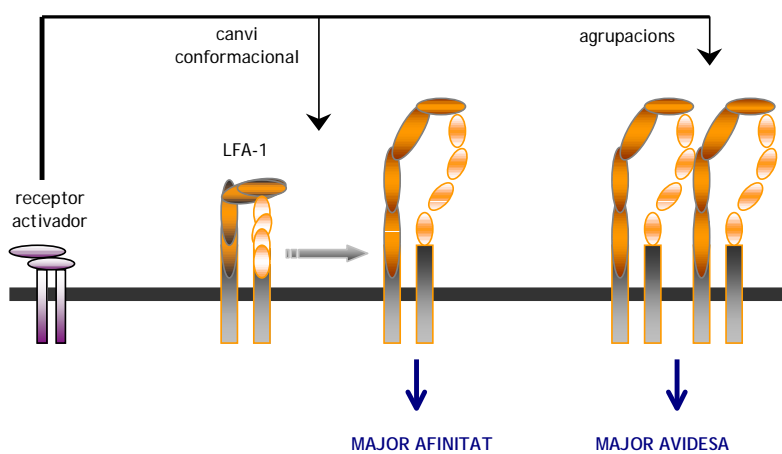


Figura 12. Regulació de l'adhesió proporcionada per l'LFA-1.

Les senyals dels receptors activadors de les cèl·lules NK poden donar lloc a canvis conformacionals conduint a una major afinitat d'unió de l'LFA-1. També poden promoure una major avidesa amb senyals que facin agrupacions de l'LFA-1.

4.1.5.3 POLARITZACIÓ

En general, en les cèl·lules citotòxiques la polarització dels lisosomes secretors (també anomenats grànuls citotòxics) precedeix a la citotoxicitat de les cèl·lules diana. Hi ha dades que impliquen a l'LFA-1 en la senyalització de la citotoxicitat i suggereixen que aquest receptor pot activar a la cèl·lula NK per la citotoxicitat. No obstant, la polarització de grànuls pot ocórrer en absència de la interacció de l'LFA-1 quan es

combina amb senyals que provenen del CD16 i del 2B4 [198]. Es necessiten nous estudis genètics per elucidar les vies responsables d'aquesta polarització de grànuls en aquestes cèl·lules.

4.1.5.4 DESGRANULACIÓ

Les perforines i altres proteïnes citotòxiques estan constitutivament expressades en cèl·lules NK en repòs i emmagatzemades a lisosomes secretors especialitzats. La desgranulació (exocitosi de lisosomes secretors) es pot mesurar per l'alliberació de granzim B als sobrenedants. Un altre assaig per mesurar la desgranulació a nivell quantitatiu es mesurar l'aparició de CD107a (proteïna-1 de membrana associada a lisosomes) a la superfície cel·lular. El CD107a és una proteïna lisosòmica de membrana que es colocalitza amb la perforina en els lisosomes secretors i es redistribueix a la superfície cel·lular quan els grànuls es fusionen amb la membrana plasmàtica.

La interacció del CD16 en cèl·lules d'insectes cobertes d'anticossos produeix desgranulació en absència de la senyal de l'LFA-1 [199]. Contràriament, la lligació del NKG2D o del 2B4 no produeix desgranulació. No obstant quan es combinen NKG2D i 2B4 si que s'indueix desgranulació sinèrgicament de cèl·lules NK en repòs [200]. Per altre banda, s'ha vist que es requereix de la presència de calci i s'indueix per senyalitzacions dependents de la proteïna G i la PKC [201]. Però, es necessiten més estudis per elucidar com la mobilització de Ca^{2+} depenent de PLC- γ i l'activació de PKC donen lloc a la desgranulació.

4.1.6 Funcions efectores de les cèl·lules NK

La principal funció efectora de les cèl·lules NK és la citotoxicitat. Un dels mecanismes productors de citotoxicitat és l'alliberació de grànuls citoplasmàtics, com són les perforines i els granzims, que lisen les cèl·lules diana. Aquestes cèl·lules almenys expressen tres lligands de la família TNF (Fas lligand, TNF, i lligand inductor de l'apoptosi relacionat amb el TNF [TRAIL]) que indueixen apoptosi de cèl·lules tumorals [202]. També s'ha vist que secreten citocines Th1 i Th2. La producció d'aquestes citocines està en funció de l'estat maduratiu d'aquestes cèl·lules, així les cèl·lules NK madures perden la capacitat de produir citocines Th2 i adquireixen la capacitat de

produir IFN- γ [203]. A més, proporcionen lligams entre la immunitat innata i l'adquirida mitjançant respostes bidireccionals amb les cèl·lules dendrítiques (DCs) (Figura 13). A les fases inicials d'una reacció inflamatòria i posterior contacte amb cèl·lules tumorals autòlogues, les DCs immadures sintetitzen TNF- α amb o sense IFN- γ , citocines que provoquen l'activació de cèl·lules NK en repòs i la seva maduració. Les cèl·lules NK activades lisen les cèl·lules tumorals i proporcionen a les DCs madures detritus cel·lulars que els internalitzen per poder-los presentar posteriorment a cèl·lules T presents als nòduls limfàtics. A les fases finals de la resposta antitumoral les cèl·lules NK tornen a tenir un paper rellevant ja que rodegen i lisen les DCs que estan al voltant del tumor i d'aquesta manera inhibeixen la presentació antigènica [204].

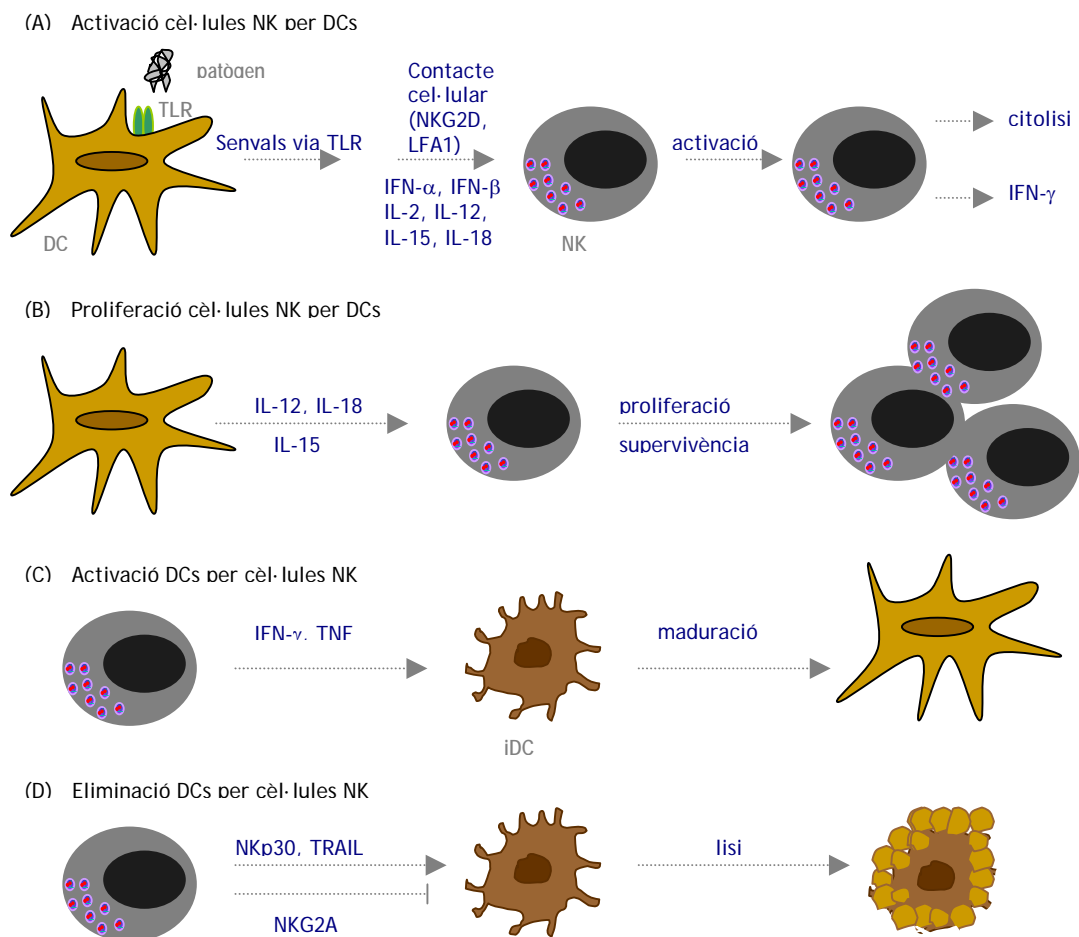


Figura 13. Respostes bidireccionals entre cèl·lules dendrítiques i cèl·lules NK.
 Les cèl·lules dendrítiques poden afectar la funció de les cèl·lules NK induint activació (a) i/o proliferació (b) de les cèl·lules NK. Recíprocament, les cèl·lules NK poden afectar les funcions de les cèl·lules dendrítiques i donar lloc a una activació (c) o una eliminació (d) d'aquestes últimes.

5 MECANISMES D'EVASIÓ TUMORAL

El concepte de vigilància immunitària defineix que el sistema immune pugui reconèixer precursors tumorals i en moltes ocasions pugui destruir-los abans que el tumor es faci clínicament aparent. Recentment, s'ha vist que el sistema immune no només protegeix a l'hoste del desenvolupament tumoral si no que pot també promoure el creixement tumoral degut a una tolerància immune induïda pel tumor.

Estudis fets amb ratolins delectats de determinats gens diana (components específics tant de la immunitat innata com de l'adaptativa) han proporcionat les millors evidències de que la vigilància immunitària influeix el desenvolupament de determinats tumors. Així, per exemple tenim [1]:

- Ratolins sense perforines presenten un augment de limfomes.
- Ratolins sense les proteïnes RAG i STAT-1, presenten deficiències en certs mecanismes de la resposta immune innata i adaptativa, desenvolupant tumors epitelials intestinals i mamaris.
- Ratolins sense limfòcits $T\gamma\delta$ tenen una susceptibilitat augmentada de patir càncer de pell després de l'aplicació tòpica de carcinògens, reflexant la importància que tenen els limfòcits intraepitelials en la supervivència i mort de les cèl·lules epitelials anormals.

No es sorprenent que cèl·lules T no puguin rebutjar tumors que apareixen espontàniament. Això probablement es degut a una pèrdua dels antígens que els fan diferents, de molècules d'adhesió o de les molècules coestimulatòries necessàries per conduir una resposta de cèl·lules T primària. Són antígens processats per cèl·lules presentadores i presentats als limfòcits T, però que en absència de senyals coestimulatòries provoquen anergia o delecio de cèl·lules T. Fins i tot, hi ha tumors que expressen antígens específics tumorals que són reconeguts com a propis al no presentar un procés inflamatori simultani [1].

Existeixen altres mecanismes pels quals els tumors fan que el sistema immunològic no els ataqüi evadint-se d'ell. Els tumors tenen tendència a ser genèticament inestables. Aquesta inestabilitat podria generar mutants que perdrien antígens i s'escaparien a la resposta immune. Alguns tumors, com són el càncer de colon i el de cèrvix, perden l'expressió d'una molècula concreta de l'MHC de classe I,

potser degut a una immunoselecció de cèl·lules T específiques pel pèptid presentat per aquesta molècula de MHC de classe I. Estudis experimentals han demostrat que quan un tumor perd l'expressió de molècules de MHC de classe I no pot ser reconegut per cèl·lules T citotòxiques, encara que continua sent susceptible al reconeixement per cèl·lules NK. No obstant, es pot evitar el reconeixement de cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques específiques i a la vegada ser resistents a les cèl·lules NK, conferint al tumor un avantatge selectiu *in vivo*.

Un altre mecanisme d'evasió immune tumoral a esmentar és la producció de citocines immunosupressores (TGF- β , IL-10) pel tumor i la creació per part d'aquest d'ambients immunològicament privilegiats. Aquests tumors creixen en nòduls envoltats per barreres físiques de col·lagen i fibrina fent-se invisibles al sistema immune, de manera que aquest ignora la seva existència. Poden créixer fins que la seva massa tumoral és incontrolable i destrueixen la barrera física, o provoquen un procés inflamatori al seu voltant [1].

Dintre dels mecanismes d'evasió immune a l'ADCC l'estratègia més freqüent, que utilitzen les cèl·lules canceroses, és la modulació de l'expressió d'antígens de l'MHC. Per exemple, les cèl·lules leucèmiques regulen a la baixa antígens clàssics de l'MHC de classe I per evadir-se de la resposta de l'hoste tant per CTLs com per cèl·lules NK. S'ha observat que regulen a la baixa antígens al·loespecífics HLA-Bw4 i HLA-A però no s'ha vist el mateix amb l'HLA-Bw4 [205]. Els antígens de l'HLA-Bw4 serveixen com a lligands dels receptors inhibidors KIRs presents a les cèl·lules NK [171, 206]. Com les senyals inhibidores via receptors KIR dominen vers les senyals activadores via CD16 o CD32, la interacció KIR/Bw4 podria evitar la mort de cèl·lules tumorals per les cèl·lules NK durant la reacció d'ADCC. Aquests resultats suggeririen que les teràpies contra leucèmies, que es basen en la utilització de cèl·lules T, podrien utilitzar al·loantígens restringits a l'HLA-Bw4, ja que si les cèl·lules canceroses modularen a la baixa l'HLA-Bw4 tornarien a ser susceptibles a la mort cel·lular per les cèl·lules NK. A més, l'expressió de receptors KIR en cèl·lules NK està augmentada en alguns pacients amb càncer. Cal destacar que en un model de ratolí singènic de leucèmia, el bloqueig dels receptors inhibidors presents a les cèl·lules NK LY-49C i LY-49I amb un anticòs específic (fragment F(ab')₂) pel receptor augmenta l'efecte antitumoral tant *in vitro* com *in vivo*. Igual que la transferència de cèl·lules NK abans del tractament amb fragments d'anticòs confereix una protecció més alta al ratolí [207].

Les cèl·lules canceroses també tenen una expressió més alta d'antígens de MHC no clàssics. Per exemple un 38% de càncers mamaris expressen HLA-G [208]. L'HLA-G normalment està expressat a les cèl·lules trofoblàstiques que envaeixen la decidua materna durant l'embaràs i es creu que és per inhibir la resposta immune semial·logènica materna front el fetus. S'ha trobat que els càncers de mama expressen HLA-G (tant la forma soluble com la unida a membrana) mentre que els teixits veïns no cancerígens no l'expressen. Els receptors per l'HLA-G són ILT-2, ILT-4, KIR2DL4 i el coreceptor CD8 de les CTL que s'expressen en monòcits, macròfags, cèl·lules NK i limfòcits T CD8⁺ [155, 209]. La interacció amb aquests receptors fa que disminueixi o s'inhibeixi l'activitat funcional d'aquestes cèl·lules. Per altre banda, l'HLA-E interacciona amb la família de receptors CD94/NKG2A, presents a les cèl·lules NK i a un subgrup de cèl·lules T, inhibint la migració endotelial de les cèl·lules NK [210].

5.1 ESTRATÈGIES PER POTENCIAR L'ADCC

Com s'ha mencionat anteriorment, la citotoxicitat i per tant les cèl·lules que tenen com a principal funció efectora la citotoxicitat, estan implicades en molts mecanismes d'evasió tumoral. Dintre dels mecanismes d'acció dels anticossos monoclonals es postula la importància de l'ADCC, per la qual cosa s'han descrit una àmplia varietat d'estratègies que tenen com a finalitat potenciar l'ADCC. Exemples d'això tenim:

- Utilització d'associacions d'anticossos monoclonals on les seves dianes són diferents epítops d'un mateix antígen.

Una de les limitacions de l'eficàcia terapèutica dels anticossos monoclonals és una expressió limitada d'antígens diana a les cèl·lules canceroses [101, 211]. Aquesta limitació es podria superar utilitzant un grup d'anticossos que com a diana tinguessin diferents epítops en el mateix antígen. De fet, s'ha demostrat en un model animal de càncer de mama, que tant *in vivo* com *in vitro*, és més efectiu la utilització d'una associació d'anti-Her-2 [212].

- Bloqueig de receptors inhibidors en cèl·lules efectores portadores de receptors Fc. En ratolins genoanul·lats pel receptor FcγIIb s'ha demostrat que els anticossos monoclonals antitumorals són molt més eficaços [103, 213], suggerint que els anticossos monoclonals s'uneixen a aquests receptors inhibidors i regulen de manera negativa el seu propi efecte antitumoral. A més, com s'ha discutit anteriorment

diferents receptors inhibidors (com per exemple: KIR, ILT-2), que s'uneixen a molècules d'MHC de classe I clàssiques i no clàssiques, estan regulats a l'alça en cèl·lules efectores de pacients amb càncer. Poden expressar l'HLA-G, que al unir-se als seus receptors, inhibiran la mort de cèl·lules tumorals per cèl·lules NK i monòcits [155, 214]. Per tant, el bloqueig d'aquests receptors inhibidors faria possible que augmentés l'efecte antitumoral dels anticossos monoclonals. Això es podria arribar a aconseguir per mitjà d'anticossos amb fragments $F(ab')_2$ específics pel receptor o per pèptids que mimetitzessin a aquests anticossos [113].

- Utilització de citocines humanes recombinants i altres molècules per augmentar les funcions efectores de les cèl·lules portadores dels receptors Fc.

Petites dosis d'IL-2 humana recombinant expandeix *in vitro* les cèl·lules NK $CD3^+CD56^+$ i potència la seva capacitat citolítica augmentant, tant *in vivo* com *in vitro*, la Herceptin-ADCC contra cèl·lules de càncer de mama [215, 216]. De la mateixa manera, el G-CSF i el GM-CSF, mobilitzen neutròfils i monòcits des dels precursors de medul·la òssia a la circulació. Tant els neutròfils com els monòcits són cèl·lules portadores de receptors Fc, que juntament amb les cèl·lules NK, seran cèl·lules importants portant a terme els efectes antitumorals dels anticossos monoclonals [97, 217]. Per tant, la utilització dels anticossos monoclonals en combinació amb aquestes citocines, podria augmentar la seva eficàcia en pacients amb càncer. Com a enfocament alternatiu, es podria crear la fusió proteica d'un anticòs monoclonal i una citocina, essent les cèl·lules diana preferents les cèl·lules NK i les CTLs no específiques [218]. Per altre banda, en un model murí de limfoma singènic, s'ha observat que els CpG ODN potencien eficaçment l'efecte antitumoral de varis anticossos monoclonals, tant *in vitro* com *in vivo*, augmentant l'ADCC [219].

- Infusió de cèl·lules NK autòlogues expandides *in vitro* o infusió d'una línia cel·lular NK aprovada clínicament.

La combinació d'aquestes infusions cel·lulars amb els anticossos monoclonals seria útil en pacients amb càncer que tenen afectada la funció de les cèl·lules NK, de manera adquirida o congènita [113].

- Combinació d'un anticòs anticadherina E juntament amb el monoclonal antitumoral. Els anticossos anticadherina E quan s'utilitzen sols no tenen efectes sobre el tumor, però en combinació trenquen els agregats multicel·lulars tumorals i augmenten l'ADCC [220].

- Anticossos monoclonals antitumorals biespecífics.
Són anticossos que, per poder ser més efectius reclutant cèl·lules efectores com cèl·lules NK, monòcits i neutròfils, tenen com a diana un antigen únic específic del tumor i diferents receptors Fc (per exemple: CD16, CD64 i CD89) [221].
- Anticossos amb major afinitat d'unió pels receptors Fc.
Com a exemple tenim un rituximab amb major capacitat d'unió pel Fc [222].

5.2 POTENCIACIÓ DE LES FUNCIONS EFECTORES DE L'HOSTE

A l'apartat anterior s'ha descrit com la immunitat cel·lular front a tumors pot reforçar-se fent que les cèl·lules tumorals expressin molècules coestimuladores i citocines, o bé administrant als pacients amb càncer citocines o altres molècules que activin i estimulin la proliferació i diferenciació dels limfòcits T i de les cèl·lules NK.

5.2.1 Citocines - IL-15

Les citocines són polipèptids produïts en resposta a microorganismes i altres antígens que intervenen i regulen les reaccions immunitàries i inflamàtores. Encara que les citocines entre elles són estructuralment diferents, comparteixen varies propietats:

- La secreció de citocines és un esdeveniment breu i autolimitat.
- Les accions de les citocines solen ser pleiotròpiques i redundants.
- Normalment influeixen en la síntesi i accions d'altres citocines.
- El seu efecte pot ser local i sistèmic.
- La seva funció s'inicia quan s'uneixen a receptors específics de membrana presents a cèl·lules diana.
- Les senyals externes regulen l'expressió dels receptors de citocines i, per tant, la resposta de les cèl·lules a aquestes citocines.
- Les respostes cel·lulars a la majoria de citocines consisteixen en canvis en l'expressió de gens a les cèl·lules diana, el que provoca un canvi en el patró funcional i, en ocasions una proliferació de les cèl·lules diana.
- La resposta cel·lular a citocines està fortament regulada, i existeixen mecanismes de retroalimentació inhibidors per disminuir aquesta resposta.

Les citocines es poden classificar en tres categories funcionals segons les seves accions biològiques principals [1]:

1) Mediadores i reguladores de la immunitat innata.

Es produeixen principalment pels fagòcits mononuclears en resposta a agents infecciosos. Els productes bacterians com el LPS, i els vírics com l'ARN bicatenari, s'uneixen als TLRs a la superfície cel·lular o als endosomes dels macròfags i estimulen la síntesi i secreció de citocines importants en la resposta immune innata. Aquestes citocines també es poden secretar pels macròfags activats pels limfòcits T estimulats per un antigen (immunitat adaptativa). La majoria de citocines d'aquest grup actuen sobre les cèl·lules endotelials i els leucòcits per estimular les reaccions inflamatòries precoces front a microorganismes i controlar aquestes respostes. A més, les cèl·lules NK i les NKT també sintetitzen aquestes citocines durant la resposta immune innata (Taula 10).

2) Mediadores i reguladores de la immunitat adaptativa.

Aquestes citocines majoritàriament són sintetitzades pels limfòcits T en resposta al reconeixement específic d'antígens estranys. Algunes actuen principalment regulant el creixement i diferenciació de diferents poblacions limfocitàries i, per tant, participant de manera important a la fase d'activació de les respostes immunitàries que depenen dels limfòcits T. Altres citocines d'aquest grup poden atraure, activar i regular cèl·lules efectores especialitzades (macròfags, neutròfils i eosinòfils) per eliminar antígens en la fase efectora de la resposta immune adaptativa.

3) Estimuladores de l'hematopoesi.

Les sintetitzen les cèl·lules de l'estroma de la medul·la òssia, els leucòcits i altres cèl·lules, per estimular el creixement i diferenciació dels leucòcits immadurs.

Citocina	Pes molecular	Principal font cel·lular	Principals cèl·lules diana i efectes biològics
TNF	17 kD; homotrímer de 51 kD	Macròfags, limfòcits T	Cèl. endotelials: activació (inflamació, coagulació) Neutròfils: activació Hipotàlem: febre Fetge: síntesi de proteïnes de fase aguda Múscul, teixit adipós: catabolisme (caquèxia) Altres tipus cel·lulars: apoptosi
IL-1	Forma madura de 17 kD; Precursors de 33 kD	Macròfags, cèl. endotelials, algunes cèl. epitelials	Cèl. endotelials: activació (inflamació, coagulació) Hipotàlem: febre Fetge: síntesi de proteïnes de fase aguda
Quimiocines	8-12 kD	Macròfags, cèl. endotelials, limfòcits T, fibroblasts, plaquetes	Leucòcits: quimiotaxis, activació; Migració a teixits
IL-12	Heterodímer de 35 kD + subunitats de 40 kD	Macròfags, cèl. dendrítiques	Limfòcits T: diferenciació Th1 Limfòcits T i NK: síntesi d'IFN- γ , augment d'activitat citolítica
IFN de tipus I (IFN- α , IFN- β)	IFN- α : 15-21 kD IFN- β : 20-25 kD	IFN- α : macròfags IFN- β : fibroblasts	Totes les cèl: estat antivíric, augment de l'expressió d'MHC de classe I NK: activació
IL-10	Homodímer de 34-40 kD; Subunitats de 18 kD	Macròfags Limfòcits T (sobretot Th2)	Macròfags, cèl. dendrítiques: inhibició de la síntesi d'IL-12 i expressió de coestimuladors i molècules d'MHC de classe II
IL-6	19-26 kD	Macròfags, cèl. endotelials, limfòcits T	Fetge: síntesi de proteïnes de fase aguda Limfòcits B: proliferació de cèl. productores d'anticossos
IL-15	13 kD	Macròfags, altres	NK: proliferació Limfòcits T: proliferació (CD8 ⁺ memòria)
IL-18	17 kD	macròfags	NK i T: síntesi d'IFN- γ
IL-23	Heterodímer de 19 kD subunitat i 40 kD subunitat de la IL-12	Macròfags, cèl. dendrítiques	Limfòcits T: manteniment de les cèl. T productores d'IL-17
IL-27	Heterodímer de 28 kD i 13 kD subunitats	Macròfags, cèl. dendrítiques	Limfòcits T: inhibició de les cèl·lules Th1; paper en la diferenciació Th1? Cèl. NK: síntesi d'IFN- γ

Taula 10. Principals característiques de citocines implicades en la immunitat innata [1].

IL-15

La IL-15 inicialment es va identificar com una citocina capaç de fer proliferar cèl·lules T mimetitzant l'efecte de la IL-2. Com a conseqüència d'això es va iniciar un estudi exhaustiu de la relació funcional i bioquímica existent entre aquestes dues citocines. El receptor de la IL-15 és un receptor heterotrimèric. La cadena γ (γ_c o també anomenada CD132) la comparteix amb altres citocines (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, i IL-21) (Figura 14) i li confereix l'habilitat d'estimular la via de les MAP cinases i PI3 cinases

que donen lloc a senyals antiapoptòtiques i mitogèniques. La subunitat β de la IL-15 també és comú a la IL-2 i és la responsable de l'estimulació de les vies de senyalització dependents de JAK-3, STAT-5 i AKT que aporten supervivència cel·lular i proliferació. Per últim, els receptors d'alta afinitat, tant de la IL-2 com de la IL-15, contenen la tercera subunitat anomenada IL-2R α (CD25) o IL-15R α , respectivament. La IL-15R α uneix la IL-15 amb alta afinitat ($K_d \approx 10^{-11}M$) i té un únic domini d'unió al lligand [223].

El fet que aquestes dues citocines comparteixen cadenes comuns als seus receptors i vies de senyalització farà que tinguin funcions comuns. No obstant, a la resposta immune adaptativa poden tenir funcions diferents, i fins i tot poden competir entre elles [224-228]. Així s'observa que la IL-2 a través de la mort cel·lular induïda per l'activació (AICD) i la seva participació en el manteniment de cèl·lules T reguladores perifèriques CD4⁺CD25⁺ és una citocina important en l'eliminació de cèl·lules T autoreactives i juga un paper crucial a la patogènesi de les malalties autoimmunes [229-232]. Per altre banda, la IL-15 és important en el manteniment a llarg termini de cèl·lules T de gran avidesa front a respostes de patògens invasors, ja que augmenta la supervivència de cèl·lules T CD8⁺ amb fenotip de memòria [224-226, 233, 234].

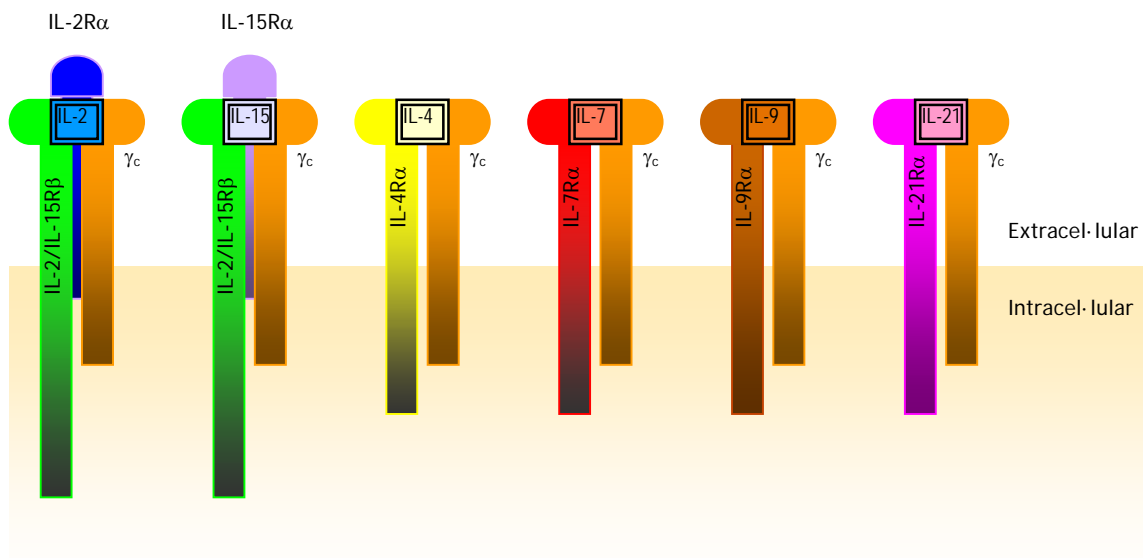


Figura 14. Estructura de la família de receptors de citocines que tenen en comú la cadena γ .

5.2.1.1 FUNCIONS DE LA IL-15

Pel fet de compartir estructures comuns amb la IL-2, les funcions d'aquesta citocina es classifiquen segons siguin comuns a la IL-2 o pròpies de la IL-15.

Funcions comuns a la IL-2

- Estimula la proliferació de cèl·lules T activades CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺ i CD8⁺ [227, 228, 235-237].
- Facilita la inducció de CTLs.
- Indueix la proliferació i la síntesi d'immunoglobulines per les cèl·lules B que han estat estimulades amb anticossos específics IgM o amb el CD40 lligand.
- Estimula la generació, proliferació i activació de cèl·lules NK [228].

Funcions pròpies de la IL-15

- Senyals a través de la transpresentació d'IL-15 regulen estretament *in vivo* la supervivència de les cèl·lules NK madures en repòs [238].
- La IL-15 i el IL-15R α s'expressen en timus, per tant les senyals de la IL-15 podrien mantenir la diferenciació intratímica de les cèl·lules T [239].
- Promou el manteniment de les cèl·lules T de memòria CD8⁺CD44^{hi} [224-227, 233, 234].
- El ratolí transgènic d'IL-15 inhibeix l'AICD induïda per la IL-2 [226].
- Els ratolins IL-15^{-/-} i IL-15R α ^{-/-} tenen pèrdues selectives de cèl·lules T CD8⁺ amb fenotip memòria, cèl·lules NK, cèl·lules NKT i subgrups de limfòcits intraepitelials. El fenotip d'aquestes dos soques de ratolins és molt similar, indicant que el IL-15R α probablement es requereix per senyals de la IL-15 rellevants fisiològicament [240-242].
- L'absència de la transpresentació mitjançada pel IL-15R α fa que les cèl·lules NK no es generin a partir dels seus precursors de medul·la òssia [243].
- La transpresentació d'IL-15 per cèl·lules presentadores d'antígens, com són les cèl·lules dendrítiques, és necessària per la generació a llarg termini de cèl·lules T CD8⁺ amb fenotip de memòria antígen-específic de forta avidesa. Degut a l'absència de cèl·lules NK i de cèl·lules T CD8⁺ memòria, els ratolins deficients d'IL-15 són més susceptibles a patir infeccions letals per microorganismes que no són letals en ratolins no modificats [233, 234].

Existeixen explicacions perquè la IL-15 té funcionalitat pròpia malgrat aquestes dues citocines s'uneixen a receptors que comparteixen 2 subunitats i tenen vies de senyalització comuns. Entre aquestes tenim:

- Una distribució diferent de les cadenes α . El receptor α de la IL-15 (IL-15R α) s'expressa principalment en monòcits activats i DCs, mentre que el receptor α de la IL-2 (IL-2R α) s'expressa principalment en cèl·lules B i T activades [244].
- Les cèl·lules en presència d'IL-15 produeixen una modulació a la baixa en l'expressió del IL-15R α , mentre que la presència d'IL-2 provoca la inducció de l'expressió del IL-2R α [245].
- La IL-15 indueix la proliferació de cèl·lules T principalment a través de FKBP1A, que per la proliferació induïda per la IL-2 no es requereix, encara que la IL-2 podria activar aquesta via en alguna ocasió [244]. Mentre que FKBP1B està implicat en la resposta T a la IL-2 però no a la IL-15.
- TRAF2 i SYK són reclutats per la cua citoplasmàtica del IL-15R α [246].
- La IL-15 contràriament a la IL-2 es secreta en petites quantitats i principalment està unida a la membrana, induint la senyal en un context de contacte cel·lular.

5.2.1.2 MECANISME D'ACCIÓ DE LA IL-15

La IL-15 envia les senyals a la sinapsi immunològica juntament amb senyals coestimuladores que modifiquen la resposta de la cèl·lula [247]. L'estimulació de monòcits o cèl·lules dendrítiques amb interferons I o II, juntament amb l'activació del factor nuclear κ B (degut a la unió CD40-CD40 lligand o TLR 4-polisacàrid) provoca una expressió coordinada d'IL-15 i IL-15R α . El IL-15R α i la IL-15 expressats per aquests monòcits o cèl·lules dendrítiques s'associen a la superfície cel·lular i es poden reciclar en vesícules endosòmiques durant dies sobrevivint a la degradació lisosomal, per posteriorment reexpressar-se a la superfície cel·lular, fent d'aquesta manera que persisteixi el IL-15R α i la IL-15 associada units a la membrana. El IL-15R α presenta la IL-15 en *trans* a cèl·lules que expressen IL-2/IL-15R β i γ_c però no IL-2R α . Dintre de les cèl·lules diana que expressen el receptor IL-2/IL-15R β i γ_c estan les cèl·lules NK i les cèl·lules T CD8⁺ de memòria (Figura 15) [247].

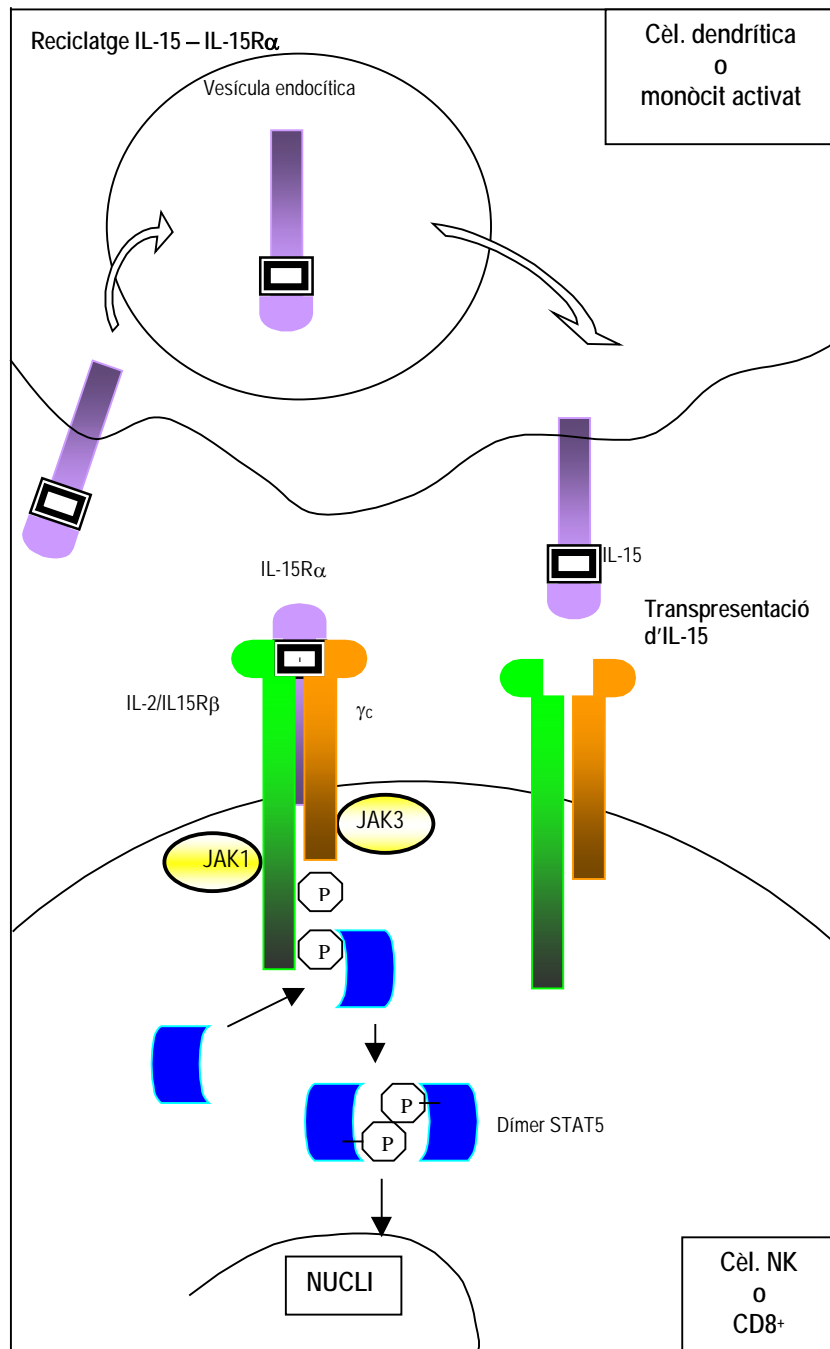


Figura 15. L'IL-15Rα presenta la IL-15 en *trans* a cèl·lules NK i cèl·lules T CD8⁺ veïnes.

5.2.2 CpG Oligodesoxinucleòtids (ODN)

El sistema immune innat s'activa per l'exposició a *patogen-associated molecular patterns* (PAMPs) sent l'ADN bacterià un PAMP. Motius específics presents a la seqüència de l'ADN bacterià són els responsables de desencadenar la resposta immune innata. Aquests motius són dinucleòtids CpG no metilats flanquejats per dos purines 5' i dos pirimidines 3' [248, 249]. Aquests motius CpG són aproximadament 20 vegades menys freqüents a l'ADN dels mamífers que a l'ADN bacterià, degut a una diferència en la freqüència d'utilització i al patró de metilació en eucariotes vers procariotes [250, 251].

L'ADN bacterià i els oligodesoxinucleòtids sintètics que expressen motius CpG no metilats donen lloc a l'estimulació de cascades immunològiques que culminen en la maduració, diferenciació, i proliferació de múltiples cèl·lules immunològiques, on s'inclouen limfòcits B i T, cèl·lules NK, monòcits, macròfags i cèl·lules dendrítiques [249, 252-255]. Ni l'ADN dels mamífers ni els CpG ODN control on els dinucleòtids CpG crítics han estat eliminats, per inversió de bases o per metilacions, desencadenen aquests efectes immunològics estimuladors [249, 256].

5.2.2.1 MECANISME D'ACTIVACIÓ DELS CpG ODN

En el procés de reconeixement dels CpG ODN estan implicats els receptors *Toll-like* i en concret el receptor que reconeix CpG ODN (TLR9). Aquests receptors són una gran família de *pattern recognition receptors* (PRR) composta per 10 subtipus diferents. Estudis amb ratolins deficients en TLR9 han demostrat que la presència d'aquest receptor és imprescindible pels efectes que provoquen els CpG ODN. A més, s'ha observat la reconstitució de la resposta *in vitro* a CpG ODN una vegada s'ha transfectat a la mateixa cèl·lula el TLR9. El TLR9 humà s'expressa en cèl·lules B, cèl·lules NK i en pDC (en ratolins també al compartiment mieloide). Per la seva activació és necessària la internalització del CpG ODN i la posterior maduració a l'endosoma, colocalitzant-se amb el receptor a nivell intracel·lular als diferents compartiments segons el tipus de CpG ODN (Figura 16) [256-259]. La interacció del TLR9 amb el CpG ODN desencadena l'acidificació i augment de mida de la vessícula, esdeveniments crítics en la senyalització ja que agents que inhibeixen la maduració o

acidificació endosomal (com és el cas de la cloroquina) bloquegen l'activació immunològica [260, 261].

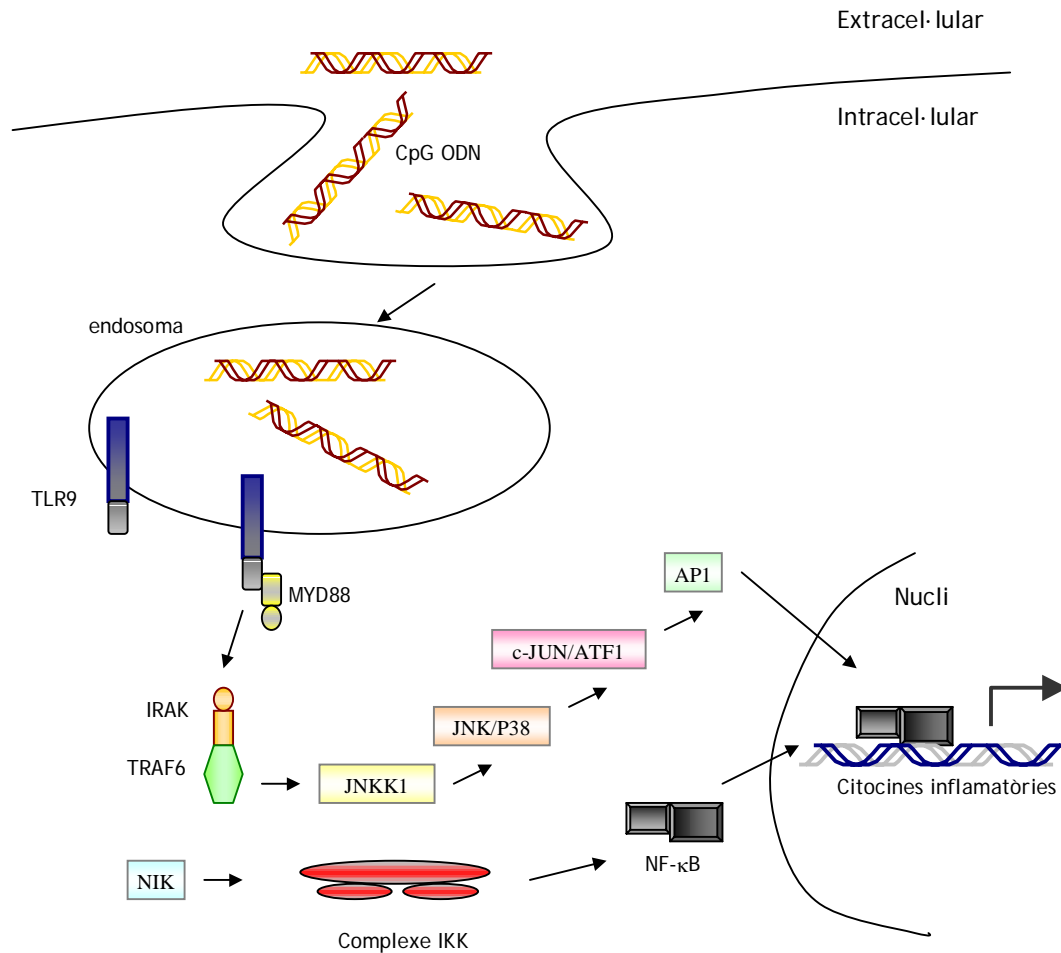


Figura 16. Senyalització cel·lular dels CpG ODN.

S'han descrit tres classes estructuralment diferents de CpG ODN sintètics capaços d'estimular cèl·lules que expressen el TLR9 humà:

- Classe B (també anomenat tipus K o ODN 2006)

És un potent adjuvant Th1. Porta a terme la diferenciació d'APCs i, la proliferació i activació de cèl·lules B secretant IgM, IL-10 i IL-6 [262-264].

- Classe A (també anomenat tipus D o ODN 2216)

És especialment potent en l'activació de pDCs humanes que produiran grans quantitats d'IFN- α , i com a conseqüència una forta activació i síntesi d'IFN- γ per cèl·lules NK i cèl·lules T $\gamma\delta$ [265].

- Classe C

Estimula fortament les cèl·lules B a secretar IL-6, de la mateixa manera que produeix *in vitro* grans quantitats d'IFN- α per les pDCs (per tant combina propietats estimuladores de la classe B i A) [266].

Estudis examinant l'activitat de PBMCs van mostrar que tots els primats responien als mateixos CpG ODN. Contràriament, els ratolins només responien a alguns dels que havien estat molt potents en primats [267].

3.2.4.2 APLICACIONS TERAPÈUTIQUES DELS CpG ODN

Activitat immunoprotectora

L'efecte immunoprotector dels CpG ODN té el pic alguns dies després de la seva administració i persisteix durant algunes setmanes. En primer lloc, el CpG ODN provoca que les pDCs secretin IFN de tipus I, que limiten el creixement d'un ampli espectre de bacteries i virus, degut en part a l'activació dels macròfags. A més de les pDCs altres tipus cel·lulars contribueixen a aquesta protecció. Les cèl·lules B que expressen el TLR9 i són directament estimulades pel CpG ODN produeixen immunoglobulines polireactives que ajuden a eliminar alguns patògens. De la mateixa manera, cèl·lules NK i macròfags que són indirectament activats pels IFNs també actuen eliminant patògens [268-270].

També s'ha observat en pacients immunosuprimits, a l'embaràs i en animals nounats que aquests CpG ODN milloren la capacitat de resistència a infeccions. Encara que s'ha de tenir present que aquesta protecció no és per tots els patògens. És probable que la resposta Th1 que indueixen els CpG ODN podria reduir l'habilitat de l'hoste a controlar infeccions que requereixen una forta resposta Th2 per la seva eliminació [267].

Adjuvant de vacunes

El CpG ODN promou la producció de citocines proinflamatòries i Th1, a la vegada que indueix l'activació i maduració d'APCs. L'efecte adjuvant té tres components: (1) potencia la funció de les APCs; (2) indueix un microambient de citocines i quimiocines que mantenen la immunitat antigen específica; (3) millora el processament antigènic

per la unió del DNA a receptors en APCs. Com a conseqüència dels efectes derivats de la producció de citocines Th1, els CpG ODN preferentment indueixen la producció d'IFN- γ per les cèl·lules NK i les cèl·lules T, que milloren la secreció d'anticossos IgG2a i facilita el desenvolupament de limfòcits T citotòxics antígen específics [271].

Prevenió i tractament d'al·lèrgies

L'asma és una malaltia inflamatòria de les vies respiratòries que reflexa una sobreproducció de citocines Th2 (especialment IL-4 i IL-5). Citocines que promouen una resposta Th1 (com són l'IFN- γ i la IL-12) milloren aquest procés. Un dels factors que influeixen l'equilibri immunològic són les infeccions. De fet s'ha postulat que la incidència augmentada d'asma a les ciutats industrialitzades es deu a una disminució d'infeccions bacterianes pels programes de vacunació infantil i l'increment d'antibiòtics utilitzats. En aquest context és interessant l'ús de CpG ODN per redirigir la resposta immunitària cap a una resposta Th1.

OBJECTIUS

L'evolució clínica de la leucèmia limfocitària crònica (LLC) és amb freqüència indolent, però és una malaltia que roman incurable. Els pacients simptomàtics tenen una supervivència entre 1-7 anys, fins i tot utilitzant les millors opcions terapèutiques. Diferents estudis en Fase II han mostrat que l'associació del Rituximab a la quimioteràpia ha millorat el percentatge de resposta i el període lliure de malaltia. No obstant, tots els pacients a la llarga experimenten una progressió de la malaltia. En aquest punt el nombre d'opcions terapèutiques, especialment en aquells pacients que són refractaris a la fludarabina, queda bastant limitat.

Encara que han estat avaluades tot una sèrie de combinacions terapèutiques en pacients amb recaiguda o refractaris als tractaments, cap alternativa ha demostrat ser superior. Per tant, és evident la necessitat de trobar alternatives terapèutiques per aquests pacients.

Un dels principals mecanismes d'acció del rituximab és la citotoxicitat cel·lular dependent d'anticossos. Les principals cèl·lules efectores implicades en aquest mecanisme d'acció són les cèl·lules portadores de receptors Fc γ . Dintre d'aquest grup les que juguen un paper primordial són les cèl·lules NK.

El CpG ODN A mimetitzant l'activitat estimuladora del DNA bacterià, a través del TLR 9 provoca una forta activació i síntesi d'IFN- γ per cèl·lules NK. Per altre banda, la IL-15 és una citocina estretament relacionada en la supervivència, proliferació i activació de les cèl·lules NK.

La hipòtesi de treball general va ser l'anàlisi del CpG ODN A i de la IL-15, com a molècules potenciadores de la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK i de l'ADCC, per poder ser utilitzades associades al rituximab com a adjuvants en el tractament de les leucèmies limfàtiques cròniques.

Objectius específics:

1. Analitzar en una línia cel·lular de limfoma B humà (Raji, CD20⁺) i posteriorment en leucèmies limfocitàries cròniques, la potenciació de la citotoxicitat natural i de l'ADCC, de PBMCs sense estimular i estimulades amb CpG ODN A i IL-15.
2. Caracteritzar la població efectora responsable de l'activació i l'increment citotòxic quan s'administra CpG ODN A i IL-15 com a molècules estimuladores.
3. Analitzar els canvis, en l'expressió de receptors activadors implicats en la citotoxicitat i en la producció de citocines implicades en la resposta immunitària innata, de la població efectora estimulada.
4. Analitzar la implicació del TGF- β , com a citocina immunosupressora i moduladora de la resposta citotòxica en cèl·lules leucèmiques i en la producció de citocines, durant l'estimulació de la població efectora.
5. Valorar l'efecte del polimorfisme Fc γ RIIIa present a les cèl·lules efectores en la resposta citotòxica *in vitro*.

MATERIALS I MÈTODES

1. MOSTRES CEL·LULARS

1.1 Obtenció i purificació de cèl·lules mononuclears i de LLC

Les cèl·lules mononuclears provenen de donacions voluntàries de sang perifèrica del Centre de Transfusió i Banc de Teixits (CTBT - Barcelona). Les cèl·lules de LLC provenen de pacients diagnosticats a l'hospital de la Santa Creu i Sant Pau prèviament al seu tractament i després del consentiment informat.

1.2 Purificació de concentrats de cèl·lules sanguínies a partir de "buffy coats"

Buffy-coat és un terme que pot traduir-se per "capa leuco-plaquetària". Aquesta capa s'observa després de la centrifugació de sang total a 2500 xg durant 10 minuts a temperatura ambient (T.A.). Trobarem tres fraccions clarament diferenciades: la superior que és plasma, la intermèdia que correspon al *buffy coat* i la inferior on trobarem el concentrat d'eritròcits. Posteriorment l'obtenció de les cèl·lules mononuclears es va dur a terme amb la tècnica de centrifugació mitjançant un gradient de densitats. D'aquesta manera, els leucòcits no sedimenten pràcticament i es poden recol·lectar de la part superior del tub. Amb aquesta finalitat es va utilitzar el Lymphoprep™ (Axis-Shield), fent-se tot en condicions d'esterilitat (Figura 17).

Procediment de purificació amb Ficoll-Hypaque®

- Dilució del concentrat cel·lular amb sèrum fisiològic (dilució 1/2).
- Afegir 4 ml de ficoll a tubs de 15 ml.
- Lliscar lentament sobre el ficoll el concentrat cel·lular diluït sense trencar el gradient.
- Centrifugar durant 20 minuts, a 2000 rpm (Beckman TJ-6), a T.A.
- Recuperar la interfase cel·lular on es troben les cèl·lules mononuclears (limfòcits i monòcits principalment) aspirant amb pipeta Pasteur. Tenir en compte que al botó cel·lular hi ha eritròcits i granulòcits que han pogut travessar la capa de ficoll.
- Resuspendre les cèl·lules mononuclears en RPMI 1640 (PAA) i centrifugar a 1750 rpm, 5 minuts, a 4°C (HERMLE Z 400K) per rentar les cèl·lules.
- Amb una alíquota, fer una dilució en líquid de Turck 1/10 de les cèl·lules purificades i fer el recompte cel·lular en una càmera de Neubauer.

Líquid Turck

Àcid acètic 10%

Blau metilè 1%

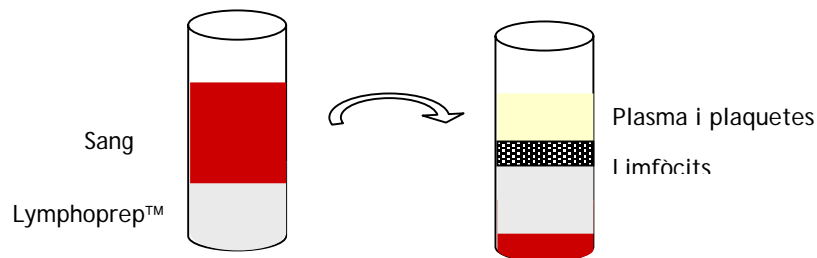


Figura 17. Centrifugació per gradient de densitats.

1.3 Congelació de cèl·lules mononuclears

Actualment el millor mètode d'emmagatzematge és la congelació en N_2 líquid. La suspensió cel·lular ha de ser congelada lentament (descens aproximat $1^\circ C/min$) en presència d'un agent com el glicerol o el dimetilsulfòxid (DMSO).

Procediment de congelació cel·lular

- Obtenció del botó cel·lular de cèl·lules mononuclears mitjançant la centrifugació de les cèl·lules en cultiu a 1750 rpm (HERMLE Z 400K), durant 5 minuts a $4^\circ C$.
- Descartar el sobrenadant i posar immediatament el botó cel·lular en un bany de gel.
- El botó cel·lular es resuspendrà a una concentració de $30-40 \cdot 10^6$ cèl·l/ml amb FCS (PAA) + 10% DMSO (Sigma) fred.
- Posteriorment es faran alíquotes de 1 ml per criotub (Nunc) i es dipositaran en un container Cryo $1^\circ C$ freezing (Nalgene) aproximadament 24 h, fins arribar a una temperatura de $-80^\circ C$.
- Arribat a aquest punt, els criotubs seran transferits ràpidament a nitrogen líquid ($-196^\circ C$) on s'emmagatzemaran submergits en N_2 o a la fase gasosa superior durant llargs períodes de temps (anys) sense deteriorament cel·lular apreciable.

1.4 Descongelació cel·lular

Quan es treballa amb línies cel·lulars és important disposar d'alíquotes congelades de cèl·lules amb la finalitat de minimitzar l'acumulació de canvis genètics en les línies contínues, evitar la senescència i la transformació en línies finites, i evitar la pèrdua accidental d'una línia per mort o contaminació. A més, per qüestions d'accessibilitat, fer alíquotes de cèl·lules primàries ens permet rendibilitzar molt més la mostra. La descongelació dels estocs congelats s'ha de realitzar ràpidament, diluint la suspensió i eliminant l'agent preservant amb la màxima rapidesa.

Procediment de descongelació cel·lular

- Immediatament extret el vial del contenidor de nitrogen líquid s'ha de submergir la meitat del vial en un bany a 37°C.
- Agitar suaument fins a la desaparició de pràcticament tot el gel de l'interior del vial. En aquest moment s'ha de passar ràpidament a un bany de gel.
- Desinfectar el vial amb alcohol i resuspendre lentament (gota a gota) les cèl·lules amb FCS a 4°C.
- Passarem les cèl·lules amb FCS a un tub de 12 ml, afegint RPMI 1640 fred fins emplenar el tub.
- Agitar suaument i centrifugar a 1750 rpm/5 minuts/18-20°C.
- El botó cel·lular es tornarà a resuspendre en RPMI 1640 i es tornarà a centrifugar en les mateixes condicions.
- En aquest moment les cèl·lules estan preparades per ser cultivades en RPMI complet.

RPMI-1640 complet

RPMI 1640	(PAA)
FCS 10%	(PAA)
L-glutamina 2mM	(Invitrogen)
Penicilina 100 U/ml	(Invitrogen)
Estreptomicina 100 µg/ml	(Invitrogen)

1.5 Comptatge i viabilitat cel·lular

Una vegada el botó cel·lular de cèl·lules es trobava resuspès en un determinat volum de medi de cultiu es va procedir a fer una dilució $\frac{1}{2}$ en Trypan Blue Solution 0,4% (Sigma-Aldrich) durant 3-5' a T.A. Posteriorment en una càmera de Neubauer es va realitzar el recompte de cèl·lules presents en 2 quadres de 9. Degut a que es va fer una dilució mitjana, el nº de cèl·lules resultants del recompte es va multiplicar $\times 2$. Les cèl·lules han de estar ben resuspeses per evitar la seva agrupació, si en el moment de contar es veien agrupacions es comptabilitzaven com una sola cèl·lula. A més, la presència de molts hematies feia necessària una tinció amb Líquid de Turck.

$$\text{Comptatge cel·lular} = \text{n}^\circ \text{ cèl} \times 5000 = \text{n}^\circ \text{ cèl/ml} \times \text{volum cel·lular} = \text{n}^\circ \text{ cèl·lules totals}$$

$$\text{Percentatge viabilitat cel·lular} = (\text{n}^\circ \text{ cèl viables} / \text{n}^\circ \text{ cèl totals}) \times 100$$

2. CULTIUS CEL·LULARS

En funció del volum de cèl·lules a cultivar es varen utilitzar les següents plaques (Nunclon):

Nº DE POUS	VOLUM CEL·LULAR
96	200 μ l
48	500 μ l
24	1 ml
12	2 ml
6	3 ml

2.1 Cultiu línies cel·lulars

Línia cel·lular Raji

Tipus cel·lular: És una línia de limfoma de Burkitt humà.

Immunologia: CD3⁻, CD10⁺, CD13(+), CD19⁺, CD20⁺, CD34⁻, CD37⁺, CD80⁺, CD138⁻, HLA-DR⁺, smlgG(+), cylgG⁻, smlgM(+), cylgM⁺, sm/cykappa⁻, sm/cylambda⁻.

Morfologia: Cèl·lules rodones que es mantenen en suspensió i que parcialment fan agrupacions.

Condicions de cultiu: Les cèl·lules s'han de cultivar en RPMI 1640 complet. El medi s'ha de canviar cada 2-3 dies, recol·lectant les cèl·lules per centrifugació i resuspenent-les a una concentració de 5×10^5 cèl/ml.

Incubació: A 37 °C amb un 5 % de CO₂ (Incubador NUAIRE™).

Línia cel·lular Nalm-6

Tipus cel·lular: És una línia de leucèmia humana pre-B.

Immunologia: CD3⁻, CD10⁺, CD13⁻, CD19⁺, CD34⁻, CD37⁻, CD138⁺, HLA-DR⁺, sm/cylgG⁻, cylgM⁺, smlgM⁻, sm/cykappa⁻, sm/cylambda⁻.

Morfologia: Cèl·lules rodones petites individuals en suspensió.

Condicions de cultiu: Les cèl·lules s'han de cultivar en RPMI 1640 complet. El medi s'ha de canviar cada 2-3 dies, recol·lectant les cèl·lules per centrifugació i resuspenent-les a una concentració de $1-2 \times 10^6$ cèl/ml.

Incubació: A 37 °C amb un 5 % de CO₂ (Incubador NUAIRE™).

2.2 Cultiu de cèl·lules mononuclears

En primer lloc es procedia a descongelar el nombre d'alíquotes de cèl·lules mononuclears necessàries, en funció dels requeriments cel·lulars de l'experiment. Depenent del nombre de cèl·lules es repartien en plaques de cultiu de 25 cm² o 75 cm² amb filtre (NUNC®) a una concentració de 1×10^6 cèl/ml. Immediatament s'afegien els diferents estímuls (IL-2, IL-15, CpG ODN A, CpG ODN control) a les plaques a diferents concentracions i es posaven a l'incubador (37°C, 5% CO₂, 95% d'humitat NUAIRE™) el temps necessari segons cada experiment. El medi de cultiu utilitzat per les cèl·lules mononuclears va ser RPMI 1640 complet.

IL-2	Peprotech, London, UK
IL-15	Peprotech, London, UK
TGF-β2	Peprotech, London, UK
CpG ODN control	MWG-Biotech AG, Ebersburg, Germany
CpG ODN A	MWG-Biotech AG, Ebersburg, Germany

2.3 Cultiu de limfòcits B (LLC-B)

Les mostres de sang fresques de LLC es processaven ràpidament mitjançant un Ficoll i es congelaven en N₂ líquid en alíquotes fins el moment del seu ús. En la majoria d'experiments es va descongelar 1 vial de cèl·lules B per experiment. Aquestes cèl·lules es van rentar dues vegades fent centrifugacions de 5 minuts a 1750 rpm a 4°C amb RPMI 1640, per eliminar qualsevol resta que pogués quedar de DMSO. Posteriorment es van cultivar en medi de cultiu B a una concentració de 1 × 10⁶ cèl/ml.

Medi B	
Iscove's Dulbeco Medium	(Sigma-Aldrich)
FCS 2%	(PAA)
BSA 0,5%	(Calbiochem, Armstadt)
Holotransferrina humana 50 µg/ml	(Sigma-Aldrich)
Insulina 5 µg/ml	(Sigma-Aldrich)
Gentamicina 15 µg/ml	(Invitrogen)
IL-4 2 ng/ml	(Peprotech)

3. PURIFICACIÓ DE CÈL·LULES NK

Per l'aïllament de cèl·lules NK es van utilitzar:

1.- El "NK Cell isolation Kit II" (Miltenyi Biotec).

Mètode de selecció negativa.

2.- El "EasySep[®] Human CD56 selection kit" (StemCell Technologies).

Mètode de selecció positiva.

3.1 Purificació de cèl·lules NK per selecció negativa

L'aïllament es va realitzar utilitzant el "NK Cell isolation Kit II". És un mètode de selecció negativa, on les cèl·lules que no expressen marcadors de superfície de cèl·lules NK es marquen magnèticament amb un còctel d'anticossos monoclonals conjugats amb biotina i posteriorment amb anticossos monoclonals antibiotina conjugats amb micropartícules. Les cèl·lules que no són NK marcades magnèticament quedaran retingudes en una columna LS MACS® (Miltenyi Biotec) col·locada en un camp magnètic MACS™ Separator (Miltenyi Biotec). La columna conté una coberta hidrofílica que permet un omplert ràpid, de manera que les cèl·lules NK no marcades passaran a través de la columna.

Procediment de marcatge magnètic (selecció negativa)

(durant tot el procediment s'ha de treballar ràpid, mantenint les cèl·lules en fred, igual que els tampons i amb volums de 10^7 cèl·lules totals)

- Abans de començar s'ha de passar el botó cel·lular per una membrana de niló de 30 μm (CellTrics®, Immunotools) per eliminar els possibles grumolls de cèl·lules que podrien obturar la columna.
- Determinar el nombre de cèl·lules.
- Centrifugar la suspensió cel·lular a 300 xg durant 10 minuts i retirar completament el sobrenadant.
- Resuspendre el botó cel·lular en 40 μl de tampó (medi purificació NK (1)) per un total de 10^7 cèl·lules.
- Afegir 10 μl de còctel d'anticossos conjugats amb biotina per un total de 10^7 cèl·lules.
- Posteriorment s'ha de barrejar tot i incubar durant 15 minuts a 4-8°C.
- Passats aquests 15 minuts, afegir 30 μl de tampó per un total de 10^7 cèl·lules.
- Afegir pel mateix nombre de cèl·lules 20 μl d'anticossos antibiotina conjugats amb micropartícules.
- Barrejar tot perfectament i fer una incubació addicional de 20 minuts a 4-8 °C.
- Rentar les cèl·lules amb un volum de tampó 10-20 vegades el volum que tenim i centrifugar-les a 300 xg durant 10 minuts.
- Resuspendre el botó cel·lular amb tampó a una proporció de 500 μl per 10^8 cèl·lules.

Procediment de separació magnètica

- Col·locar la columna dintre del camp magnètic que proporciona el MACS™ Separator.
- Preparar la columna rentant-la amb 3 ml de tampó.
- Aplicar la suspensió cel·lular a la columna, fent possible que la fracció no marcada passi a través de la columna.
- Tornar a rentar la columna 3 vegades amb un volum total de tampó de 9 ml. En aquest moment tindrem tota la població de cèl·lules NK recol·lectada en un tub.
- Retirar la columna del camp magnètic i rentar-la amb 9 ml de tampó per eluir la població retinguda a la columna. Aquesta població serà la marcada magnèticament (cèl·lules que no són NK) (Figura 18).

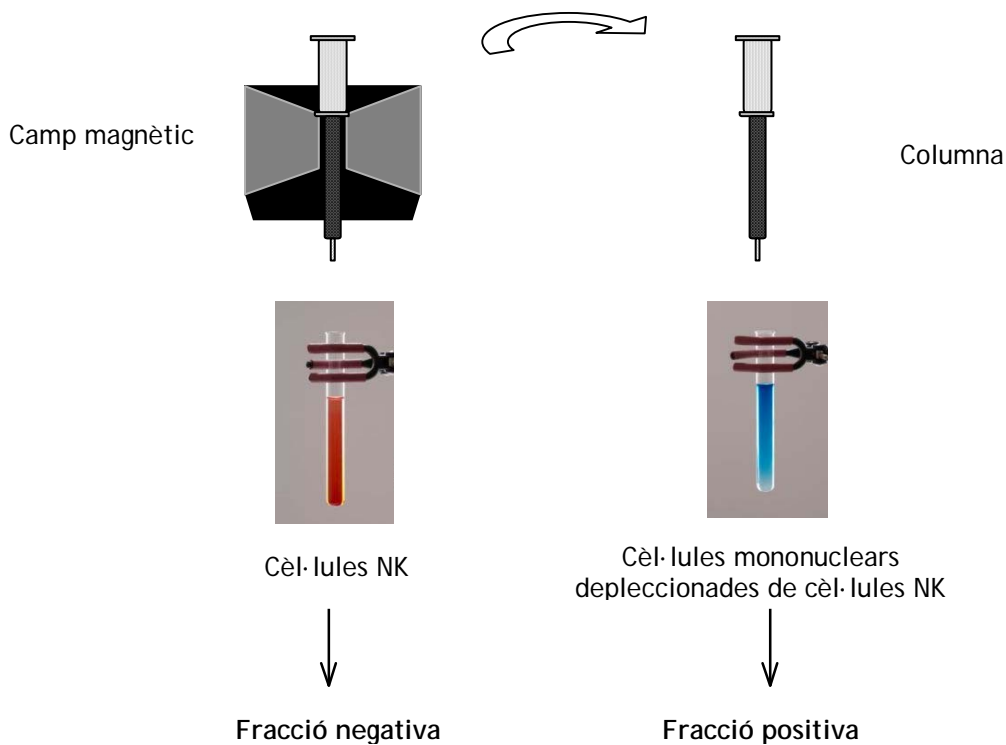


Figura 18. Purificació magnètica. Mètode de selecció negativa.

Tampó purificació NK (1)

PBS (pH 7,2)

BSA 0,5%

EDTA 2 mM

Reactius del "NK Cell isolation Kit II":

- ✓ Còctel d'anticossos monoclonals humans conjugats amb biotina contra CD3, CD4, CD14, CD15, CD19, CD36, CD123 i Glicoforin A.
- ✓ Anticossos monoclonals antibiotina conjugats amb micropartícules (clon:Bio3-18E7.2;ratolí IgG1).

3.2 Purificació de cèl·lules NK per selecció positiva

L'aïllament es va realitzar utilitzant el "EasySep[®] Human CD56 selection kit". Es un mètode de selecció positiva, on les cèl·lules que expressen l'antigen CD56 es seleccionaran per la unió de nanopartícules magnètiques recobertes de dextrà utilitzant un complex d'anticossos tetramèrics biespecífics. Així, aquests complexos reconeixen el dextrà i l'antigen present a la superfície cel·lular. Posteriorment les cèl·lules marcades magnèticament es separaran de les no marcades mitjançant el camp magnètic EasySep[®].

Procediment de marcatge magnètic (selecció positiva)

- Abans de començar s'ha de passar el botó cel·lular per una membrana de niló de 30 µm (CellTrics[®], Immunotools) per eliminar els possibles grumolls de cèl·lules que podrien obturar la columna.
- Determinar el nombre de cèl·lules.
- Centrifugar la suspensió cel·lular a 300 xg durant 10 minuts i retirar completament el sobrenadant.
- Resuspendre el botó cel·lular en tampó (medi purificació NK (2)) a una concentració de 1×10^8 cèl·lules/ml.
- Afegir els anticossos a una concentració de 100 µl/ml de cèl·lules.
- Posteriorment s'ha de barrejar tot i incubar durant 15 minuts a T.A.
- Passats aquests 15 minuts, afegir les nanopartícules a una concentració de 50 µl/ml de cèl·lules.
- Barrejar tot perfectament i fer una incubació addicional de 10 minuts a T.A.
- Posteriorment afegir a la suspensió cel·lular medi NK fins arribar a un volum total de 2,5 ml i resuspendre-ho be.

Procediment de separació magnètica

- Col·locar el tub amb la suspensió cel·lular resuspesa en un volum total de 2,5 ml dintre del camp magnètic EasySep[®] magnet.
- Mantenir en tub dintre del camp magnètic durant 5 minuts.
- Decantar el sobrenadant invertint el tub dintre del camp magnètic i mantenint-lo invertit durant 2-3 segons.
- Tornar el tub a la posició original sense intentar eliminar cap gota amb moviments bruscs.
- Retirar el tub del camp magnètic i rentar la suspensió cel·lular amb 2,5 ml de medi NK (2) repetint tot el procediment de separació 2 vegades.
- Les cèl·lules recuperades del sobrenadant serà la fracció de cèl·lules mononuclears depleccionades de cèl·lules NK. Les cèl·lules recuperades del tub al extreure'l del camp magnètic serà la fracció positiva de cèl·lules NK (Figura 19).

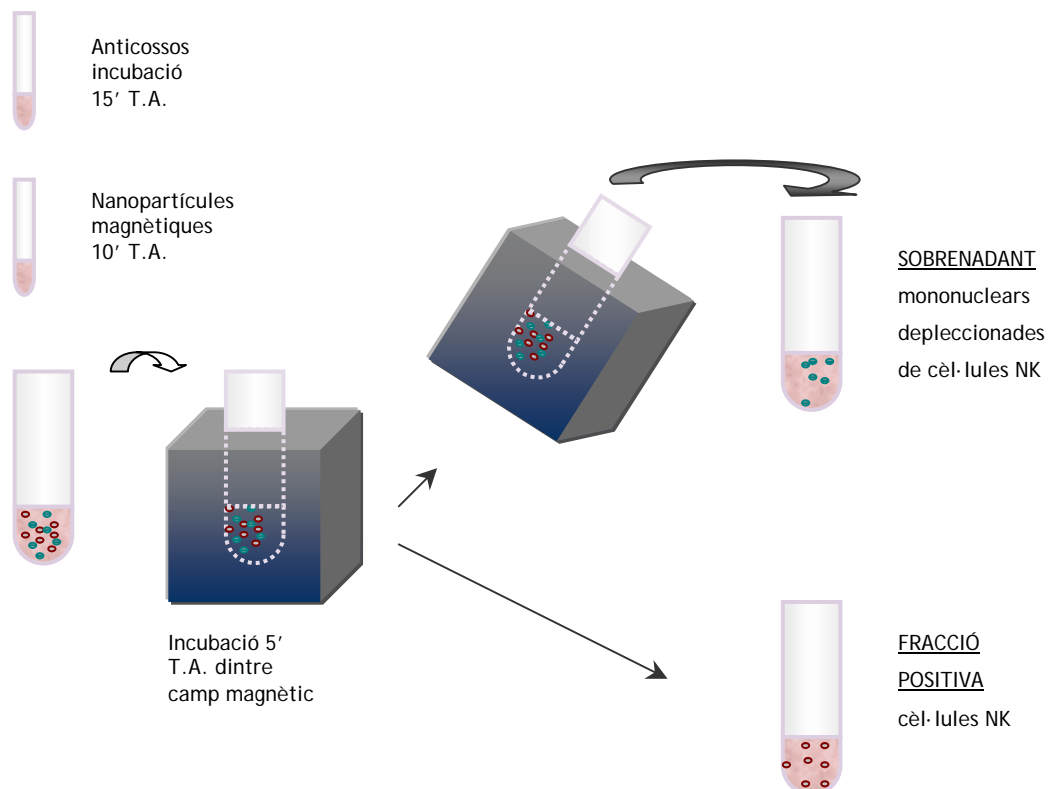


Figura 19. Purificació magnètica. Mètode de selecció positiva.

Tampó purificació NK (2)
PBS (pH 7,2)
FBS 2%
EDTA 1 mM

4. MARCATGE CEL·LULAR AMB RADIONÚCLIDS

El marcatge cel·lular és una tècnica utilitzada tant per l'obtenció d'imatges a medicina nuclear com per estudis de cinètica cel·lular.

Per considerar que un radionúclid és un bon marcador ha de complir:

1. Romandre associat a la cèl·lula durant tot el temps que duri l'assaig.
2. La seva energia i la vida mitjana han de ser apropiades per l'estudi.
3. Ha de preservar la funció cel·lular.

Els radionúclids utilitzats als nostres experiments han estat el ^{51}Cr pels estudis de citotoxicitat i la timidina- ^3H pels assajos de proliferació. Pel seu maneig ha estat necessari realitzar els experiments a la zona isotòpica. Com el ^{51}Cr emet radiacions gamma, era necessari el blindatge amb plom (5 mm). Pel control d'una possible contaminació es varen utilitzar Comptador Geiger (LUDLUM 3) i dosimetria personal de termoluminescència (TLD).

5. PROLIFERACIÓ CEL·LULAR

La proliferació cel·lular ha estat quantificada mitjançant la tècnica d'incorporació de timidina tritiada al DNA. El paràmetre que es mesura és la síntesi de DNA. Les cèl·lules al sintetitzar el nou DNA incorporaran timidina- ^3H , a la vegada que timidina no marcada present en el medi. La incorporació a la cadena de DNA d'una timidina- ^3H fa que es bloquegi el procés de síntesi fent que el DNA es repliqui però que la cèl·lula no es divideixi. La incorporació de timidina- ^3H és proporcional a la síntesi total de DNA i es mesura en un comptador de centelleig beta una vegada s'ha descartat la timidina tritiada no incorporada. (Curs de formació de supervisors. Unitat de protecció radiològica -OSSMA. Barcelona 2002.)

Procediment d'incorporació de timidina- ^3H

- Cultivar les cèl·lules afegint per pou un volum cel·lular de 200 μl a una concentració de $1,25 \times 10^6$ cèl/ml (Incubador NUAIRE™).
- Immediatament afegir a cada pou els diferents estímuls a les diferents concentracions en estudi (tot per triplicat).
- A les 72 hores de cultiu en condicions d'esterilitat, 37°C, 5% CO_2 i 95% d'humitat, s'incorpora la timidina tritiada [^3H] (Amersham Biosciences), a una concentració final de 1 μCi per pou (25 mCi/mmol d'activitat específica).
- Passat 8 hores filtrar els cultius utilitzant l'aparell de filtració SKATRONAS.
- Una vegada els filtres (FilterMat. Skatron) estan secs (aproximadament a les 2 hores), s'afegeix 1 ml de líquid de centelleig (OptiPhase "Hisafe" Vallac) i es mesura la quantitat de radiació beta emesa per cada filtre durant 1 minut en un comptador de centelleig (Tri-Carb 2100 TR Packard).
- Els resultats s'expressaran en comptes per minut (cpm).

6. CITOTOXICITAT CEL·LULAR

La citotoxicitat cel·lular és un mecanisme d'acció molt important com a resposta de l'hoste principalment front a la presència de tumors, en trasplantaments al·logènics i en les infeccions víriques. Es basa en el reconeixement per part de les cèl·lules citotòxiques d'antígens a la superfície de les cèl·lules diana per posteriorment matar-les. Entre els mecanismes de citotoxicitat es troba la citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos (ADCC). L'ADCC ens mostra l'habilitat que tenen les cèl·lules portadores dels receptors Fc a la seva superfície cel·lular (particularment cèl·lules NK amb el $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$) en reconèixer cèl·lules diana cobertes d'anticossos IgG i provocar-lis la mort cel·lular.

In vitro, la citotoxicitat es pot mesurar marcant cèl·lules diana amb ^{51}Cr i posteriorment enfrontant-les a cèl·lules efectores a diferents *ràtios* (efectores:diana). En aquest enfrontament moriran les cèl·lules diana alliberant al sobrenedant el ^{51}Cr que es quantificarà en un lector de radiació gamma. Comparant aquests nivells amb la quantitat de ^{51}Cr que alliberen els controls (cpm màxim, cpm espontani), calcularem el percentatge de lisi per cada *ràtio* de cèl·lules efectores.

Pel càlcul del percentatge de lisi obtingut a cada pou utilitzarem la següent fórmula:

$$\% \text{ lisi} = (\text{cpm experiment} - \text{cpm espontani}) / (\text{cpm màxim} - \text{cpm espontani}) \times 100$$

cpm = comptes per minut (lectura donada pel comptador gamma)
cpm màxim = són els comptes resultants de l'enfrontament de les cèl·lules diana amb Tritó X 100 al 1%
cpm espontani = són els comptes resultants de l'enfrontament de les cèl·lules diana amb RPMI-1640 complet

Procediment de citotoxicitat per alliberació de ^{51}Cr (1)

Preparació de les cèl·lules diana

- Les cèl·lules diana (línea cel·lular Raji, línea cel·lular Nalm o limfòcits B tumorals) mantingudes la nit anterior en condicions d'esterilitat a 37°C i 5% CO₂, es recuperaran mitjançant una centrifugació de 5 minuts/1750 rpm/4°C.
- El botó cel·lular es resuspendrà en RPMI-1640 complet en el cas de les línies cel·lulars i en RPMI-5 en el cas dels limfòcits B tumorals.
- Realitzarem un contacte cel·lular per agafar la quantitat de cèl·lules necessària pel nostre experiment i les tornarem a centrifugar en les mateixes condicions que hem mencionat anteriorment.
- A aquest botó cel·lular afegirem el ^{51}Cr (Amersham Bioscience), tenint en compte que en el cas de les línies cel·lulars posarem 150 µCi de ^{51}Cr per milió de cèl·lules i amb els limfòcits B tumorals 50 µCi per milió.
- La incubació del ^{51}Cr amb les cèl·lules serà de 2 hores a 37°C i un 5% de CO₂ (Precision Scientific 5415). Després de 1 hora d'incubació agitarem suaument les cèl·lules.
- Posteriorment es rentaran les cèl·lules amb RPMI-1640 i es resuspendran a una concentració de 1 x 10⁶ cèl/ml en RPMI complet les línies cel·lulars i en RPMI-5 els limfòcits B tumorals.
- En aquest moment agafarem 100 µl per comprovar el marcatge cel·lular, posant-los en un tub de 5 ml i contant-los en un comptador de radiació gamma (Cobra auto-gamma Packard®).
- El volum cel·lular ajustat a una concentració de 1 x 10⁶ cèl/ml el dividirem en 2 tubs, de manera que afegirem a 1 tub el rituximab a una concentració de 10 µg/ml i al altre tub IgG control a la mateixa concentració.
- Això s'incubarà durant 45 minuts a 37°C i un 5% de CO₂.
- Tornarem a rentar durant 10 minuts/2000 rpm/4°C.
- Finalment ajustarem les cèl·lules a 1 x 10⁵ cèl/ml per aplicar 100 µl per pou (placa de 96 pous fons rodó), quantitat que correspon a 10000 cèl/pou (Figura 20).

Procediment de citotoxicitat per alliberació de ⁵¹Cr (2)

Preparació de les cèl·lules efectores

- Les cèl·lules efectores descongelades el dia anterior es mantindran en cultiu amb RPMI-1640 complet durant 20-24 h, en funció de l'experiment a realitzar. El nombre total de cèl·lules efectores es dividirà en diferents plaques de cultiu segons els estímuls a estudiar a una concentració de 1×10^6 cèl/ml. Així dependent de l'experiment tindrem:
 - Placa de cèl·lules efectores sense estímulo.
 - Placa de cèl·lules efectores amb IL-15.
 - Placa de cèl·lules efectores amb CpG ODN.
- Es recuperen les cèl·lules efectores, resuspenent el botó cel·lular en RPMI-1640 complet.
- Comptabilitzar el nombre de cèl·lules que hi ha a cada tub i distribuir-les segons els *ratios* que haguem d'utilitzar.
- Posteriorment, afegirem 100 µl/pou per triplicat.

Procediment de citotoxicitat per alliberació de ⁵¹Cr (3)

Preparació de la placa de citotoxicitat

- Una vegada s'han ajustat les cèl·lules a les concentracions pròpies de cada experiment, aplicarem a cada pou 100 µl tant de cèl·lules diana com de cèl·lules efectores (volum final per pou de 200 µl).
- Centrifugació de la placa durant 1 minut a 1000 rpm sense fre (Beckman® J2-HC).
- Incubació de la placa durant 4 hores a 37°C i un 5% de CO₂ (Precision scientific 5415).
- Centrifugació de la placa durant 3 minuts a 1500 rpm sense fre.
- Recuperar 100 µl de sobrenadant de cada pou.
- Lectura de la radiació emesa en un comptador gamma (Cobra auto-gamma Packard®).

RPMI 5		
RPMI 1640 medium HEPES modification	40 ml	(Sigma-Aldrich)
RPMI 1640	60 ml	(PAA)
Human serum AB from clotted male	5%	(Sigma-Aldrich)
L-glutamina	1%	(Invitrogen)
Gentamicina	15 µg/ml	(Invitrogen)

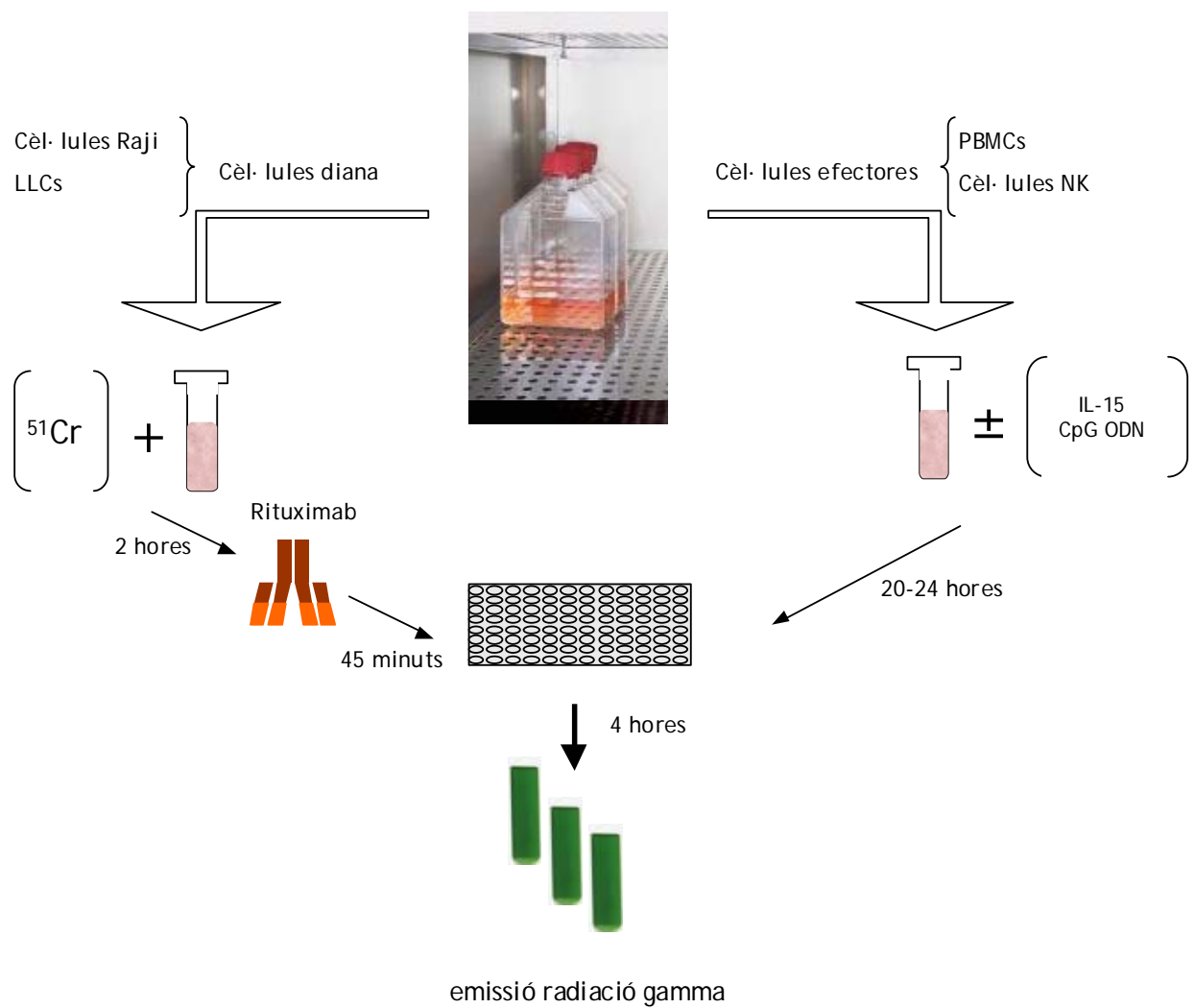


Figura 20. Citotoxicitat cel·lular per alliberació de ^{51}Cr .

7. ANALISI DEL POLIMORFISME Fc γ RIIIa (CD16)

7.1 Extracció de DNA

L'objectiu dels diferents passos en la purificació de DNA té com a finalitat separar d'aquest els materials contaminants com el RNA i les proteïnes. La desproteïnitització s'aconsegueix en general agitant la barreja amb un volum de fenol (o alternativament cloroform), ja que és un desnaturalitzador actiu de proteïnes que suprimeix la solubilitat de les proteïnes de la preparació i les precipita. El mètode de purificació de DNA QIAamp[®] (QIAGEN) que es va utilitzar no requereix fenol/cloroform. Amb aquest mètode, el DNA va quedar absorbit en una membrana de *silica-gel* durant una breu centrifugació. Les condicions de pH i sals al lisat van assegurar que les proteïnes i altres contaminants no quedessin retingudes a la membrana. Posteriorment, el DNA unit a la membrana es va rentar amb dos tampons diferents per eliminar completament qualsevol residu contaminant sense alterar la puresa del DNA. Finalment el DNA purificat es va eluir de la columna amb aigua.

Lectura de la concentració de DNA

La concentració de DNA a l'eluit es determina per espectrofotometria, a partir de la densitat òptica, a una absorbància de 260 nm. Les lectures obtingudes a aquesta absorbància s'han de trobar entre 0,1 i 1,0 (es considera que 1 ml de solució amb densitat òptica a 260 nm igual a 1, equival a 50 μ g de DNA de doble cadena). En la calibració de l'espectrofotòmetre (Gene Quant pro) es va utilitzar aigua, igual que per fer les dilucions dels eluits.

$$\text{Concentració de DNA} = \text{lectura a 260} \times \text{dilució} \times 50 = \mu\text{g/ml}$$

La puresa es va determinar calculant el *ràtio* de l'absorbància a 260 nm i a 280 nm (A_{260}/A_{280}). Aquest *ràtio* ha d'estar entre 1,7-1,9 per considerar un DNA pur, valors inferiors indiquen contaminació proteica. Posteriorment aquest DNA purificat es va emmagatzemar a -20°C per la seva posterior utilització.

Procediment d'extracció de DNA

- Posar 20 µl de la proteasa de QIAGEN (7,5 AU (Ansón Units)) en un tub de 1,5 ml.
- Afegir 200 µl de *Buffy Coat* al tub i vortejar durant 15 segons.
- Posteriorment afegir 200 µl de tampó AL (lisi cel·lular) i tornar a vortejar durant 15 segons.
- Seguidament incubar la barreja durant 10 minuts en un bany sec a 56°C.
- Passat aquests 10 minuts treure el tub del bany i deixar-lo atemperar durant 3 minuts.
- Afegir 200 µl d'etanol absolut i vortejar durant 15 segons.
- Fer un pols a la centrifuga per treure les possibles gotes que hagin quedat a les parets del tub i passar tot el volum a una columna (QIAamp spin column).
- Centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut (Centrifuge 5415C. Eppendorf).
- Posar la columna en un nou tub recol·lector i afegir a aquesta 500 µl de tampó AW1 (solució de rentat que conté un 57% d'etanol).
- Centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut.
- Tornar a posar la columna en un nou tub recol·lector, afegint aquesta vegada 500 µl de tampó AW2 (solució de rentat que conté un 71% d'etanol i azida sòdica 0,04%).
- Centrifugar a 14000 rpm durant 3 minut.
- Col·locar la columna en un tub de 1,5 ml i afegir a la columna 200 µl d'aigua destil·lada.
- Incubar la columna amb l'aigua 5 minuts a T.A.
- Centrifugar a 8000 rpm durant 1 minut.
- Es recuperarà el tub eppendorf amb el DNA eluït en 200 µl d'aigua per la posterior lectura de la seva concentració.

7.2 Nested PCR

El genotipatge del polimorfisme es va realitzar tal com va descriure Koene et al. 1997 mitjançant una nested PCR (reacció en cadena de la polimerasa) seguida d'una digestió al·lel específica utilitzant un enzim de restricció.

La PCR desenvolupada al 1983 per Kary Mullis, s'utilitza per amplificar exponencialment un fragment de DNA mitjançant una replicació enzimàtica. Esquemàticament consisteix en (Figura 21):

1.- Desnaturalització del DNA a 94-96°C.

A aquesta temperatura es produeix la disrupció dels ponts d'hidrogen que uneixen les bases complementàries.

2.-Aparellament a aproximadament 65°C.

Permet la unió dels cebadors al DNA i de la Taq polimerasa.

3.- Elongació a 70-74°C.

Pas on la polimerasa sintetitza la cadena complementària de DNA afegint dNTPs en la direcció de 5' a 3'. La temperatura en aquest procés dependrà de la polimerasa utilitzada.

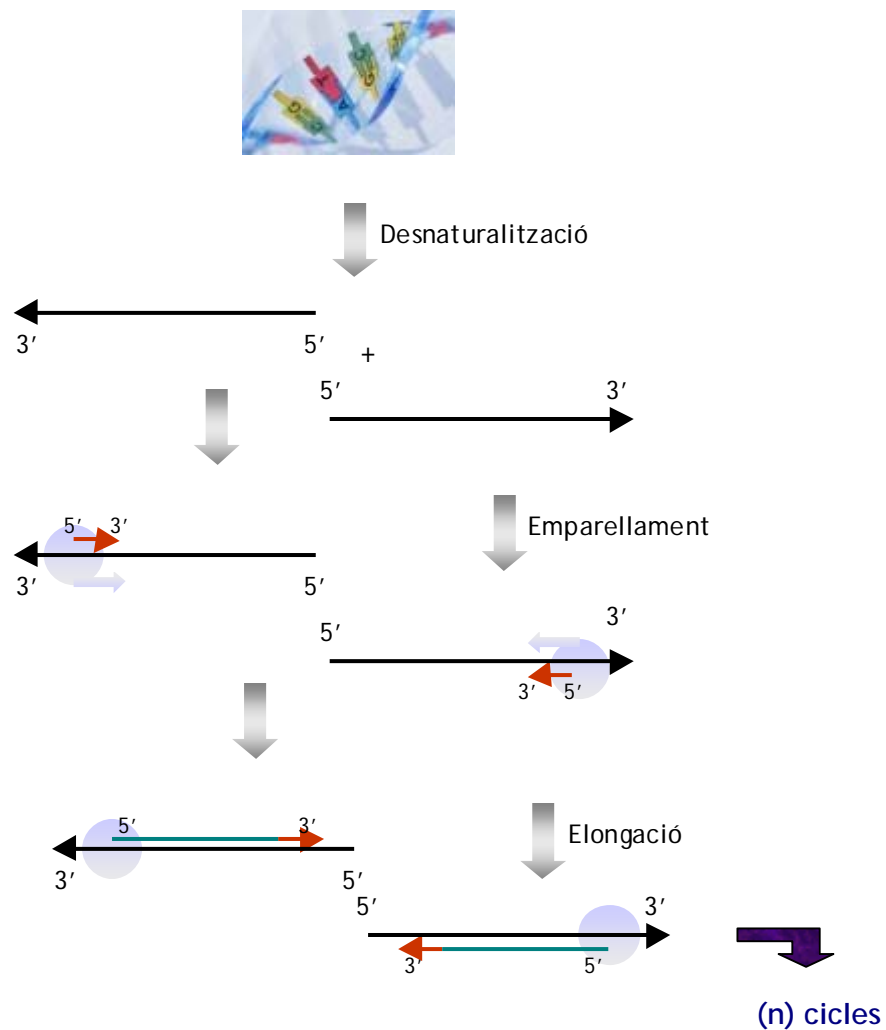


Figura 21. Reacció en cadena de la polimerasa.

Una variació d'aquesta tècnica és la Nested PCR que permet augmentar l'especificitat del DNA amplificat reduint el soroll de fons d'amplificacions de DNA no específiques. S'utilitzen 2 parells de cebadors en 2 reaccions successives de PCR. El producte de DNA generat en la primera reacció de PCR inclou la diana pel segon parell de cebadors de la segona PCR.

La Nested PCR necessària pel nostre anàlisi va amplificar a partir del DNA genòmic un fragment de 1,2 Kb i la segona PCR un fragment de 94 pb. Al segon producte de 94 pb és on es troba el lloc de restricció per l'enzim *NlaIII* (CATG). Quan l'al·lel és homozigot *FCGR3A-158V*, a la posició 559 hi ha el nucleòtid G, i l'enzim digereix el fragment de 94 pb en 2 fragments més petits (61 pb i 33 pb). Mentre que el fragment dels homozigots *FCGR3A-158F* no es digereix (Figura 22).

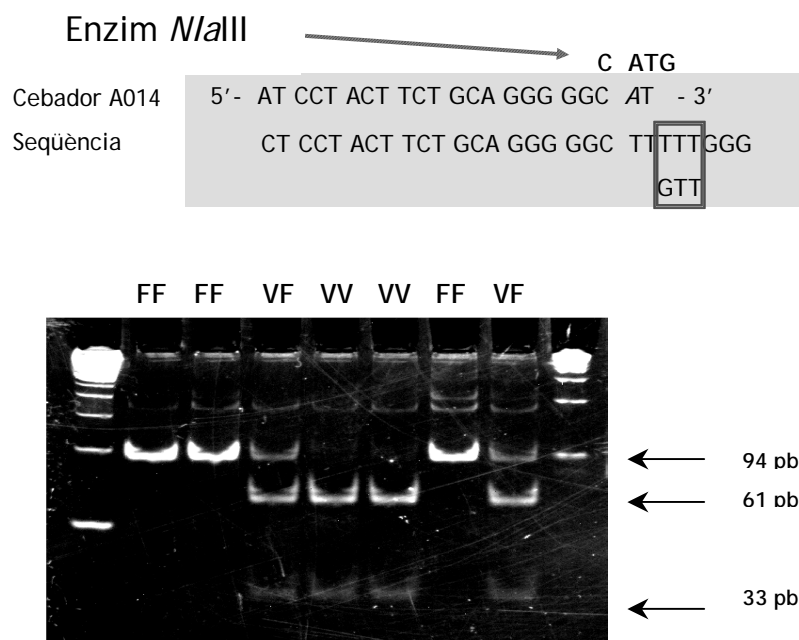


Figura 22. Resultat de la digestió enzimàtica de la Nested PCR.

Procediment d'amplificació del DNA. Nested PCR

Reactius

Primera PCR

- 100 ng DNA genòmic
 - 100 ng de cada cebador (Roche)
 - 100 µM de cada dNTP (Amersham)
 - 0,75 U de la Taq DNA polimerasa. (Biotools)
- $\left[\begin{array}{l} 5'-ATATTTACAGAATGGCACAGG-3' \\ 5'-GACTTGGTACCCAGGTTGAA-3' \end{array} \right]$

Segona PCR

- 1 µl del DNA amplificat
 - 100 ng de cada cebador (Roche)
 - 100 µM de cada dNTP
 - 0,75 U de la Taq DNA polimerasa.
- $\left[\begin{array}{l} 5'-ATCAGATTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT-3' \\ 5'-ACGTGCTGAGCTTGAGTGATGGTGATGTTTAC-3' \end{array} \right]$

Amplificació al termociclador (Biometra T Gradient) segons les següents condicions:

1^{ra} PCR

10 minuts a 95°C
1 minut a 95°C
30 segons a 58,5°C
1,5 minuts a 72°C
8 minuts a 72°C

35 cicles

2^{na} Nested PCR

5 minuts a 95°C
1 minut a 95°C
30 segons a 65°C
1 minut a 72°C
9,5 minuts a 72°C

1,2 Kb

pes molecular dels productes resultants

94 pb

Procediment de l'electroforesi del DNA amplificat

Primera PCR - electroforesi en gel d'agarosa al 1,5%

- 200 ml TBE 0,5X
- 3 g Seakem LE agarosa (Iberlabo)
- 5 µl bromur etidi (10 mg/ml), per obtenir una concentració final al gel de 0,5 µg/ml, que s'afegeix quan el gel es refreda fins aproximadament 50°C.

Escalfar la barreja fins que l'agarosa estigui totalment dissolta.

Aplicació 5 µl per pou del marcador de pes molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (GibcoBRL).
(Aquest marcador permet visualitzar mides de DNA que oscil·len entre 100 pb i 12 Kb)

Tampó de carrera TBE 0,5X.

Condicions electroforesi 200 V, 400 mA, 20 minuts.

Visualització del gel amb llum UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$).

Segona PCR - electroforesi en gel d'agarosa al 2%.

Marcador de pes molecular utilitzat de 50 pb (Invitrogen)

TBE 10×

Tris base	108 g
Àcid bòric	55 g
EDTA 0,5M pH8	40 ml
H ₂ O q.s.p.	1 l

Ladder 1 Kb plus

Ladder 1 Kb plus (1 µg/ml)	50 µl
BlueJuice 6×	84 µl
H ₂ O q.s.p.	500 µl

BlueJuice 6×

Blau de bromofenol	0,125 g
Xilencianol	0,125 g
Glicerol (99%)	17 ml
H ₂ O q.s.p.	50 ml

Procediment de la digestió enzimàtica

Digestió enzimàtica *NlaIII* (New England Biolabs)

- 10 µl Nested PCR
- 1 µl *NlaIII* (10 unitats)
- 5 µl Tampó 10×
- 5 µl BSA dilució 1/10
- 29 µl H₂O

Condicions 3 hores a 37°C.

Electroforesi

Es pot realitzar de manera opcional en:

1.- Gel poliacrilamida al 10%

Tampó de carrera TBE 1X.

Cubeta XCell II™ Mini Cell (Novex) i pous de 5 mm.

Es carrega un volum de 20 µl/pou (17 µl reacció enzimàtica + 4 µl BlueJuice 6×).

Voltatge 1-8 V/cm.

Tinció del gel de poliacrilamida amb bromur d'etidi:

- 50 ml TBE 1X
- 0,5 µg/ml Bromur etidi

Condicions 45 minuts a T.A.

Visualització del gel amb llum UV ($\lambda = 302$ nm).

2.- Gel agarosa al 2,5% . Marcador de pes molecular de 50 pb.

Gel poliacrilamida 10%

Acrilamida 30%	33,1 ml
TBE 5×	20 ml
Persulfat amònic 10%	700 µl
TEMED	35 µl
H ₂ O q.s.p.	100 ml

8. CITOMETRIA DE FLUX

La citometria de flux és una tècnica destinada a la quantificació de components o característiques estructurals de les cèl·lules. En base a aquesta particularitat pot emprar-se per l'anàlisi dels diferents tipus cel·lulars en una barreja o suspensió.

Els paràmetres que típicament es mesuren de manera simultània són:

1. Dispersió frontal de la llum (*forward scatter*), valor proporcional a la mida cel·lular.
2. Dispersió de la llum ortogonal (*side scatter*), proporcional a la quantitat d'estructures granulars o complexitat de la cèl·lula.
3. Intensitats de fluorescència a diferents longituds d'ona.

La dispersió de la llum s'utilitza en l'exclusió de les cèl·lules mortes, agregats cel·lulars, restes cel·lulars, així com per reduir el soroll de fons en el mesurament de la fluorescència. És suficient per discriminar limfòcits de monòcits i granulòcits en mostres leucocitàries hemolisades.

Les intensitats de fluorescència es mesuren a diferents longituds d'ona i de manera simultània per cadascuna de les cèl·lules. A fi de mesurar els components d'interès de cada cèl·lula, poden emprar-se diverses sondes fluorescentes. Els anticossos conjugats amb fluorocroms són utilitzats molt sovint en la quantificació de la densitat antigènica de determinats marcadors, i distingir subpoblacions de tipus cel·lulars, fins i tot aquelles cèl·lules amb expressió de transgens.

La tècnica de conjugació a fluorocroms permet realitzar mesures de la unió de virus o hormones als seus corresponents receptors de superfície. També es poden analitzar components intracel·lulars amb sondes fluorescentes específiques, com per exemple el contingut cel·lular d'ADN (permetent estudis de cicle cel·lular i ploidia), l'ADN sintetitzat de *novo*, seqüències nucleotídiques específiques, ARNm, filaments d'actina, i en definitiva qualsevol estructura per a la que existeixi un anticòs o una sonda fluorescent disponible. A més, pot emprar-se en la monitorització de canvis en el calci intracel·lular, del potencial de membrana, el pH, o del contingut d'àcids grassos.

8.1 Expressió de marcadors de superfície

Existeixen molècules de superfície que estan relacionades per exemple amb l'activació cel·lular, diferenciació o l'apoptosi. L'estudi de la seva expressió dona una valuosa informació sobre l'estat funcional de les cèl·lules. Mitjançant la utilització d'anticossos monoclonals que reconeixen aquestes molècules es va determinar el seu nivell d'expressió per citometria de flux.

Els anticossos utilitzats als nostres estudis foren els següents:

ESPECIFICITAT	CLON	ISOTIP	CASA COMERCIAL	VOLUM (1 10 ⁶ cèl·lules)
CD3 - FITC	16A9	Ratolí IgG _{2a}	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD3 - PE	MEM-57	Ratolí IgG _{2a}	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD4 - PCy5	RPA-T4	Ratolí IgG _{1,κ}	eBioscience	5 µl
CD8 - PE	MEM-31	Ratolí IgG _{2a}	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD14 - FITC	MEM-18	Ratolí IgG ₁	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD19 - PCy5	SJ25-C1	Ratolí IgG ₁	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD20 - FITC	MEM-97	Ratolí IgG ₁	Immunotools GmbH (Alemanya)	5 µl
CD56 - FITC	MEM-188	Ratolí IgG _{2a}	Caltag (Alemanya)	5 µl
CD56 - PE	MEM-188	Ratolí IgG _{2a}	Caltag (Alemanya)	5 µl
CD56 - PCy5	B159	Ratolí IgG _{1,κ}	BD Pharmingen™	5 µl
CD16 - FITC	3G8	Ratolí IgG _{1,κ}	BD Pharmingen™	5 µl
LFA-1 - PE	G43-25B	Ratolí IgG _{2a,κ}	BD Pharmingen™	3 µl
NKG2D - PE	1D11	Ratolí IgG _{1,κ}	BD Pharmingen™	5 µl
CD69 - PE	FN50	Ratolí IgG _{1,κ}	BD Pharmingen™	3 µl

Expressió de marcadors de superfície cel·lular

Sang total

- Marcar 100 µl de sang amb els anticossos corresponents durant 10 minuts a T.A.
- Passar les mostres pel TQ-prep (Coulter) per lisar els eritròcits, establir el pH i fixar les cèl·lules, ja que dispensa:
Solució A: àcid fòrmic (lisa els eritròcits)
Solució B: carbonat sòdic, clorur sòdic i sulfat sòdic (estabilitza el pH i l'osmolaritat)
Solució C: paraformaldehid (fixa les cèl·lules)
- Posteriorment anàlisi de les mostres pel citòmetre de flux EPICS-XL MCL (Coulter).

Cèl·lules mononuclears cultivades

- Recuperar les cèl·lules de la placa de cultiu i rentar-les amb RPMI 1640.
- Eliminar el RPMI 1640 i resuspendre el botó cel·lular en tampó de marcatge, fent un segon rentat.
- Marcar les cèl·lules amb els anticossos corresponents en un volum de 100µl de tampó de marcatge, durant 20 minuts i a 4°C.
- Passat aquest temps, afegir 300 µl de isoton[®] II diluent (Coulter) per tub, realitzar un vòrtex i analitzar pel citòmetre de flux EPICS-XL MCL (Coulter).

Cèl·lules purificades

Amb les cèl·lules purificades tant en suspensió com cultivades es va seguir el mateix procediment descrit en el apartat de cèl·lules cultivades.

Part dels marcadors es van analitzar individualment i en altres situacions es va procedir a fer combinacions pel marcatge simultani de les cèl·lules com es veu detallat a l'apartat de resultats.

Totes les dades emmagatzemades a l'ordinador van ser analitzades utilitzant el software del Coulter System II (versió 3).

Tampó de marcatge

PBS

FCS 5%

Azida sòdica 0,1%

8.2 Apoptosi cel·lular

Els canvis morfològics en la membrana cel·lular són un dels primers processos que es donen quan les cèl·lules entren en mort per apoptosi. Una de les tècniques es basa en la detecció del fosfolípid fosfatidilserina, present a la cara interna de la membrana cel·lular que quan s'inicia el procés d'apoptosi passa a la cara exterior. L'Annexina-V, proteïna depenent de Ca^{2+} que s'uneix amb elevada afinitat a la fosfatidilserina, al ser conjugada amb un fluorocrom permet detectar per citometria de flux aquelles cèl·lules que es troben en apoptosi. La combinació d'Annexina-V amb iodur de propidi (PI), permet discriminar les cèl·lules que es troben a l'inici del procés d'apoptosi (Annexina⁺, PI⁻), d'aquelles que ja es troben en moments més avançats de la mort cel·lular (Annexina⁺, PI⁺). Per determinar la proporció de cèl·lules en apoptosi es va utilitzar el Kit comercial Annexin V-FITC (Bender MedSystem™).

Marcatge d'apoptosi cel·lular (Bender MedSystem)

- Diluir el tampó de marcatge (4x) del kit a raó de 1:4 amb H₂O destil·lada.
- Recuperar les cèl·lules en cultiu i rentar-les amb PBS.
- Resuspendre el botó cel·lular amb 200 µl del tampó de marcatge i afegir 2,5 µl d'Annexina-V marcada amb FITC.
- Incubar 10 minuts a T.A.
- Rentar les cèl·lules amb PBS.
- Resuspendre les cèl·lules amb 200 µl del tampó de marcatge i afegir 5 µl de iodur de propidi, vòrtex.
- Analitzar pel citometre de flux EPICS-XL MCL (Coulter) en un histograma de dues dimensions el percentatge de cèl·lules positives per Annexina-V (tant PI⁺ com PI⁻).

Totes les dades emmagatzemades a l'ordinador van ser analitzades utilitzant el software del Coulter System II (versió 3).

Tampó de marcatge (4x)

Hepes/NaOH pH=7,4 10 mM

NaCl 140 mM

CaCl₂ 2,5 mM

9. QUANTIFICACIO DE CITOCINES I QUIMIOCINES

La determinació de la quantitat de citocines i quimiocines present als sobrenedant dels cultius cel·lulars es va realitzar utilitzant la tècnica d'ELISA (IFN- γ i TNF- α) i immunoassaig amb boles fluorescents (FlowCytomix) (IFN- γ , IL-10, IL-5, IL-13, MIP-1 α i MIP-1 β).

9.1 ELISA

Aquesta tècnica es basa en la detecció d'un antigen immobilitzat en una fase sòlida mitjançant anticossos que directa o indirectament produeixen una reacció on el seu producte final, que pot ser per exemple un colorant, es pot mesurar espectrofotomètricament. A l'inici del nostre assaig la placa es va recobrir amb un primer anticòs anticitocina. Després de rentar l'excés d'anticòs es van afegir als pous els sobrenedant on es trobaven les citocines que havien de ser reconegudes pel primer anticòs. Un segon rentat va eliminar tot el material no retingut, la qual cosa permet aplicar un segon anticòs antiantigen marcat (Figura 23).

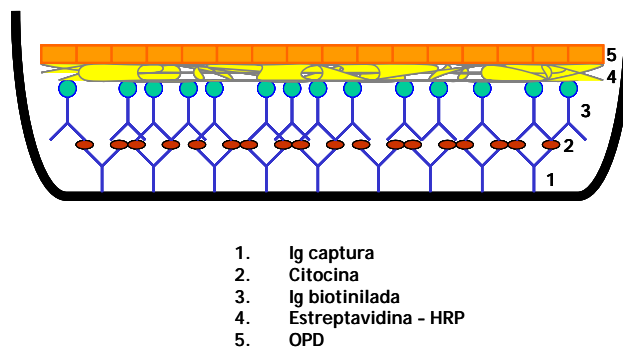


Figura 23. ELISA.

Els sobrenedant recuperats del cultius cel·lulars van ser centrifugats durant 10 minuts a 14000 rpm (Centrifuge 5415-R), i posteriorment es van congelar a -80°C fins el moment del seu ús.

Procediment de l'ELISA (ImmunoTools)

(Utilització placa NUNC MAXISORP 96 pous)

○ ANTICÒS DE CAPTURA.

Dilució de l'anticòs de captura 1/100 amb tampó de captura.

Posar 100 µl/pou d'aquesta solució, cobrir la placa i deixar-la incubant tota la nit a 4°C.

○ Rentar 5 vegades amb PBS i deixar que la placa s'assequi bé.

○ BLOQUEIG.

Afegir 200 µl/pou de tampó de bloqueig i incubar 1 hora a T.A.

○ Rentar 5 vegades amb tampó de rentat.

○ INCUBACIÓ DE LES MOSTRES I ELS ESTÀNDARDS.

Diluir l'estàndard des de 500 pg/ml fins 2 pg/ml i les mostres diluir-les 1/5 amb tampó de dilució.

Posar 100 µl/pou durant 1 hora a T.A.

○ Rentar 5 vegades amb tampó de rentat.

○ INCUBACIÓ DE L'ANTICÒS CONJUGAT AMB BIOTINA.

Dilució 1/100 amb tampó de dilució i aplicar 100 µl/pou durant 1 hora a T.A.

○ Rentar 5 vegades amb tampó de rentat.

○ INCUBACIÓ DE L'ESTREPTAVIDINA CONJUGADA AMB PEROXIDASA (Pharmingen BD).

Dilució 1/2000 amb el tampó de dilució i aplicar 100 µl/pou durant 30 minuts a T.A.

○ Rentar 5 vegades amb tampó de rentat

○ INCUBACIÓ AMB EL SUBSTRATE.

Incubació 100 µl/pou de SIGMA FAST™ OPD a T.A., protegint la placa de la llum.

Parar la reacció aproximadament entre 30-45 minuts amb 50 µl/pou d'àcid sulfúric al 25%.

○ LECTURA DE LA PLACA.

Llegir en l'espectrofotòmetre a una longitud d'ona de 450 nm i restar el valor obtingut a 620 nm, per substracció del fons.

Tampó de captura

Carbonat/bicarbonat pH 9,6 100 mM

Tampó de bloqueig

PBS

BSA 1%

Tampó de rentat

PBS

Tween-20 0,01%

Tampó de dilució

PBS

BSA 1%

Tween-20 0,05%

SIGMA FAST™ OPD

OPD 0,4 mg/ml

Urea H₂O₂ 0,4 mg/ml

Tampó citrat fosfat 0,05 M

H₂O 20 ml

9.2 Immunoassaig amb boles fluorescentes (FlowCytomix)

En aquest assaig les boles estan recobertes amb anticossos que específicament reaccionen amb cada partícula a determinar pel sistema. Les boles es poden diferenciar per la seva mida i per la intensitat de fluorescència. Una barreja de boles recobertes amb anticossos específics de cada partícula a analitzar s'incuba amb els sobredant, fent que les partícules presents a la mostra s'uneixin als anticossos. Posteriorment s'afegirà un segon anticòs conjugat amb biotina que s'unirà a les partícules capturades pel primer anticòs. I finalment, una estreptavidina-PE s'afegirà per unir-se a la biotina conjugada i emetre senyals fluorescentes (Figura 24).

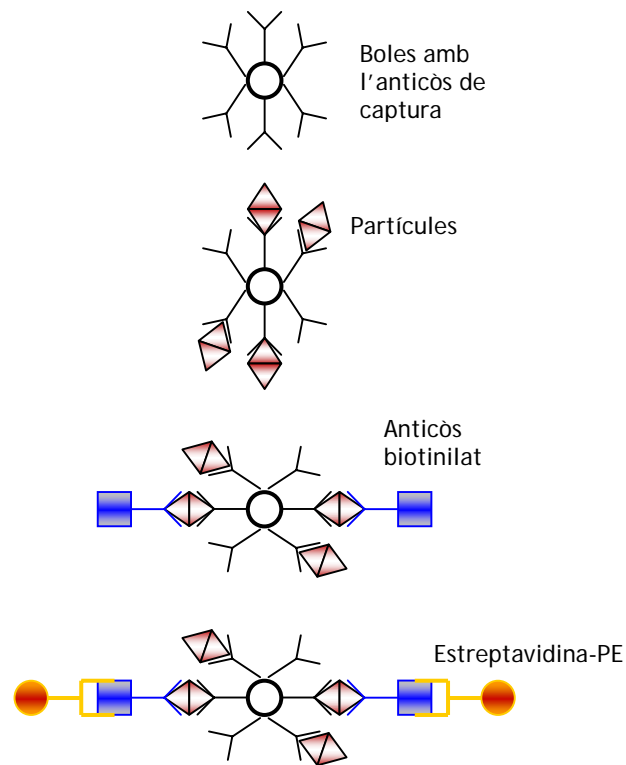


Figura 24. Immunoassaig amb boles fluorescentes.

Procediment FlowCytomix (1) (Bender MedSystem)

Reactius:

"Human Basic kit"

"Setup beads"

Tampó Assaig 10X (PBS amb 10% BSA)

Tampó Dilució

Estreptavidina-PE

Placa de 96 pous amb filtre

Software d'anàlisi

"Human Simplex Kit" (IFN- γ , IL-10, IL-13, IL-5, MIP-1 α i MIP-1 β)

Boles recobertes amb l'anticòs monoclonal

Standard

Anticòs monoclonal conjugat amb biotina

Procediment FlowCytomix (2)
(Utilització placa 96 pous amb filtre)

- Afegir 50 µl del Tampó Assaig 1x per pou per a humitejar els pous.
- Treure el tampó aspirant fent buit amb el "Multi-Well Plate Vacuum Manifold" (PALL).
- Afegir 25 µl de cada Standard per pou, 25 µl del Standard 1 en un pou més, als blancs 25 µl del Tampó Assaig 1x, i 25 µl dels sobrenadants a la resta de pous.
- Seguidament 25 µl de la barreja de boles recobertes amb els anticossos (FL4) a tots els pous (inclouent els blancs).
- Finalment 50 µl de la barreja d'anticossos conjugats amb biotina, també a tots els pous (inclouent els blancs).
- Cobrir la placa amb paper adhesiu i paper d'alumini.
- Incubació de la placa durant 2 hores (18-25°C) en lleugera agitació (500 rpm) (Microplate shaker PBS-1000. Grant-bio).
- Buidar els pous utilitzant el "vacuum filtration manifold".
- Afegir 100 µl del Tampó Assaig 1x i buidar amb el "vacuum filtration manifold". Repetir aquest últim pas.
- Afegir 100 µl del tampó Assaig a cada pou i seguidament 50 µl de la Estreptavidina-PE (FL2) també a cada pou (inclou els blancs).
- Cobrir la placa amb paper adhesiu i paper d'alumini.
- Incubació de la placa durant 1 hora (18-25°C) en lleugera agitació (500 rpm).
- Buidar els pous utilitzant el "vacuum filtration manifold".
- Afegir 100 µl del Tampó Assaig 1x i buidar amb el "vacuum filtration manifold". Repetir aquest últim pas.
- Afegir 200 µl del Tampó Assaig a cada pou.
- Barrejar bé amb la pipeta el contingut de cada pou i transferir aquest volum de 200 µl a un tub de citometria.
- Afegir a tots els tubs de citometria 300 µl del Tampó Assaig per aconseguir un volum final de 500 µl.
- Els tubs es poden analitzar immediatament per citometria de flux EPICS-XL MCL (Coulter) o guardar-se un màxim de 24 hores a 4°C protegits de la llum. Si no s'han analitzat abans de 2 hores s'ha de fer un vòrtex dels tubs.

Procediment FlowCytomix (3)

Condicions del citòmetre per l'anàlisi:

Preparació del "Setup beads"

Vòrtex del vial durant uns segons i posteriorment agafar 500 µl i posar-los en un tub de citometria.

Anàlisi del "Setup beads"

Ajustar els paràmetres FS/SSC.

Crear les regions per les poblacions de les boles.

Definir el nombre d'events.

Ajustar el voltatge de la FL2 de manera que les boles es trobin a la part esquerra del panell ja que ens mesurarà la quantitat de citocines i/o quimiocines presents a la mostra.

Abans d'iniciar l'adquisició de les mostres s'ajustaran els voltatges FL2/FL4 i les compensacions amb el standard 1.

Tampó Assaig 1x (48 pous)

Tampó assaig 10x 25 ml

H₂O q.s.p 250 ml

Barreja dels standards (S1-S7)

Seguir protocol "Human Basic Kit" en funció del nombre d'especificitats a determinar

Barreja de les boles recobertes amb anticossos (48 pous)

Tapar de la llum

Vial boles amb l'anticòs 75µl de cada especificitat

Tampó Dilució q.s.p. 1500µl

Barreja dels anticossos conjugats amb biotina (48 pous)

Vial anticòs conjugat amb biotina 150 µl de cada especificitat

Tampó Dilució q.s.p. 3000 µl

Estreptavidina-PE (48 pous)

Estreptavidina-PE 88µl

Tampó Assaig 1x q.s.p 2750µl

10. ANÀLISI ESTADÍSTIC

L'anàlisi estadístic de les dades obtingudes es va realitzar aplicant el test de la t de *Student*. En tots els casos es va realitzar una prova T per mostres relacionades i el nivell de significança estadística va ser $p < 0,05$; a excepció de l'anàlisi del polimorfisme on la prova T va ser per mostres independents però amb el mateix nivell de significança estadística. Les dades van ser analitzades utilitzant el *software* SPSS (versió 15.0; SPSS Inc., Chicago, IL. USA).

RESULTATS

1. POTENCIACIÓ DE L'ADCC DONADA PEL RITUXIMAB

Per valorar la capacitat citotòxica de cèl·lules efectores activades presents a les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMCs: principalment cèl·lules T, cèl·lules B, cèl·lules NK i monòcits), quan aquestes s'enfronten a cèl·lules de limfoma B preincubades amb rituximab, l'estudi es va dissenyar en dos grans blocs. Primerament els experiments es van adreçar a demostrar aquest efecte utilitzant com a cèl·lules diana una línia cel·lular de limfoma B (Línia cel·lular Raji), i posteriorment es van confirmar els resultats en mostres de Leucèmies Limfàtiques Cròniques (LLC-B) humanes.

2. LÍNIA CEL·LULAR RAJI

Com el rituximab és un anticòs monoclonal dirigit contra la molècula CD20 present a cèl·lules B, vàrem escollir pels nostres experiments com a cèl·lula diana, la línia cel·lular Raji (línia de limfoma de Burkitt humana) CD20⁺ (Materials i mètodes, apartat 2.1), i vàrem comprovar per citometria de flux (Materials i mètodes, apartat 8.1) l'expressió antigènica en superfície d'aquesta molècula (Figura 25).

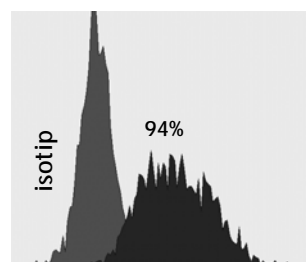


Figura 25. Expressió de l'antigen CD20 a la línia cel·lular Raji.
Percentatge de cèl·lules CD20⁺ marcades amb FITC.

2.1 RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES PBMCs

2.1.1 EXPERIMENTS PRELIMINARS DE PROLIFERACIÓ

Per poder assolir els nostres objectius, el primer pas va ser determinar la dosi mínima d'IL-15 amb capacitat estimuladora de PBMCs. Amb aquesta finalitat es van realitzar assajos de proliferació (Materials i mètodes, apartat 5) amb diferents concentracions d'IL-15.

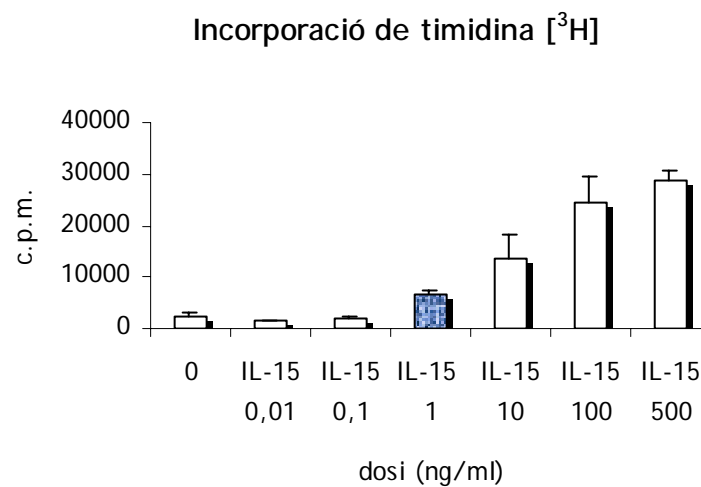


Figura 26. Experiment de proliferació cel·lular. PBMCs cultivades amb diferents concentracions d'IL-15 (0.01 - 500 ng/ml) durant 72 hores. Resultat expressat en c.p.m.. Mostra la mitjana ± DS dels pous per triplicat.

Tal com indica la figura 26, la mínima dosi d'IL-15 amb capacitat proliferativa va ser de 1 ng/ml.

2.1.2 EXPERIMENTS PRELIMINARS DE CITOTOXICITAT

Una vegada determinada la dosi mínima d'IL-15 capaç de fer proliferar les PBMCs, es va procedir a comprovar si aquesta dosi era també responsable de potenciar la capacitat citotòxica de les PBMCs. Primerament va ser necessari veure si la línia cel·lular Raji era una línia eficient pels assajos de citotoxicitat, així com determinar la concentració de rituximab a utilitzar.

2.1.2.1 Línia cel·lular Raji

Vàrem comparar la línia cel·lular Raji amb la línia cel·lular Nalm-6 (línia de leucèmia humana pre-B) que no expressa l'antigen CD20 (Materials i mètodes, apartat 2.1) per comprovar que la presència de rituximab incrementava el percentatge de lisi de les cèl·lules efectores en la línia cel·lular Raji. Com indica la figura 27, en l'assaig d'ADCC (Materials i mètodes, apartat 6) amb la línia cel·lular Raji (CD20⁺) la presència del rituximab fa que el percentatge de lisi resultant de PBMCs activades amb IL-2 (10 U/ml) augmenti (19,1% vs 81,3%; control vs rituximab, respectivament); cosa que no es reflecteix amb la línia cel·lular Nalm-6 per no expressar l'antigen CD20.

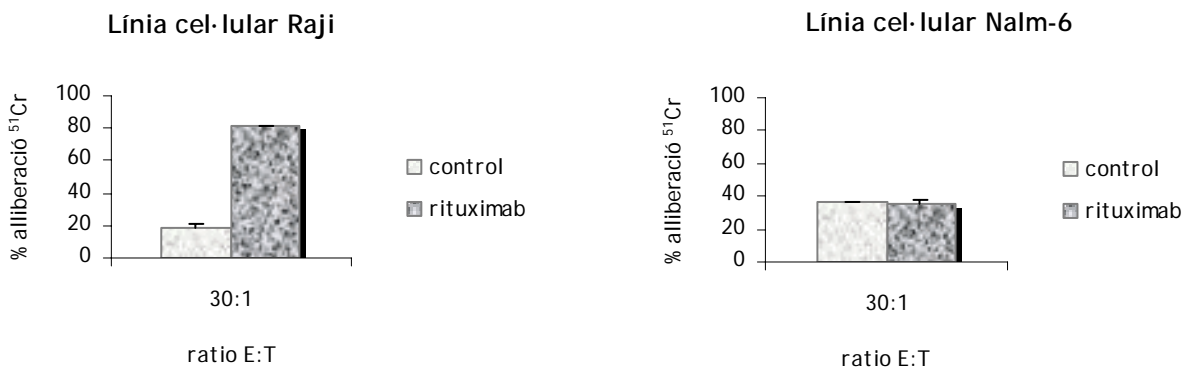


Figura 27. Experiment d'ADCC comparant, com a cèl·lules diana, la línia cel·lular Raji amb la línia cel·lular Nalm-6.

Es van utilitzar com a cèl·lules efectores PBMCs en cultiu amb medi complet activades amb IL-2 (10 U/ml) durant 20 hores; i una concentració de rituximab de 10 µg/ml. Ratio E:T (efectores:diana) ($3 \times 10^5:1 \times 10^4$). Els resultats mostren la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

2.1.2.2 Determinació de la concentració saturant de rituximab

Revisant la literatura molts autors havien utilitzat als seus experiments una concentració de rituximab de 10 µg/ml per ésser una concentració saturant i que es podia comparar a concentracions sèriques de pacients tractats amb rituximab [57, 89, 120, 124, 272]. No obstant, es van voler comprovar aquestes dades realitzant un experiment de citotoxicitat amb diferents concentracions de rituximab. Com indiquen els resultats de la figura 28, 10 µg/ml és una concentració saturant de rituximab, essent la concentració utilitzada als posteriors assajos d'ADCC.

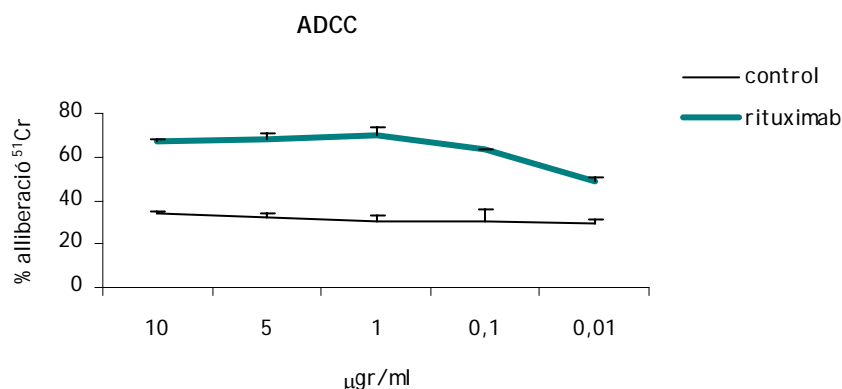


Figura 28. ADCC amb la línia cel·lular Raji i diferents concentracions de rituximab. PBMC en cultiu amb medi complet durant 20 hores. Concentracions de rituximab i/o Ig des de 0,01 - 10 µg/ml. Ratio E:T utilitzat en aquest experiment de 20:1. Els resultats mostren la mitjana ± DS dels pous per triplicat.

2.1.2.3 Càlcul de la concentració òptima d'IL-15

Establertes les condicions de l'assaig citotòxic es va procedir a valorar si la mínima concentració d'IL-15 amb capacitat proliferativa (1 ng/ml) era també capaç d'augmentar la capacitat citotòxica de les PBMCs (Figura 29).

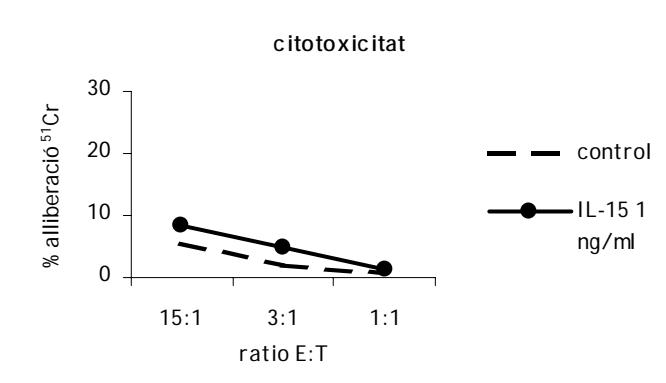


Figura 29. Citotoxicitat de PBMCs estimulades amb IL-15 (1 ng/ml). PBMC en cultiu amb IL-15 (1 ng/ml) durant 20 hores. Els resultats mostren la mitjana ± DS dels pous per triplicat.

Segons aquests resultats, la concentració d'IL-15 de 1 ng/ml no és suficientment potent per produir una activació cel·lular capaç d'incrementar la capacitat citotòxica natural de les PBMCs. Per la qual cosa, es va procedir a provar una concentració superior d'IL-15 (10 ng/ml).

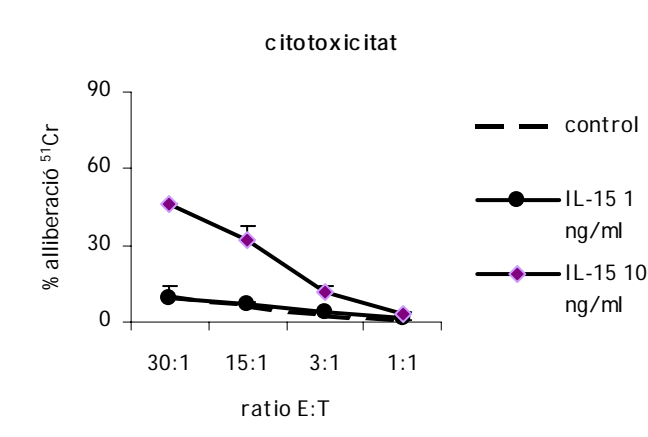


Figura 30. Citotoxicitat de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml). PBMC en cultiu amb medi complet, IL-15 (1 ng/ml o 10 ng/ml) durant 20 hores. Els resultats mostren la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

La presència d'IL-15 a una concentració de 10 ng/ml durant 20 hores fa que les PBMCs rebin l'estímul suficient per incrementar la capacitat citotòxica natural (10% vs 46%; control vs IL-15 (10 ng/ml), al ratio 30:1 respectivament) (Figura 30). Tant bon punt es va trobar aquesta concentració, va ser necessària la confirmació d'aquest resultat en un nombre més alt d'experiments.

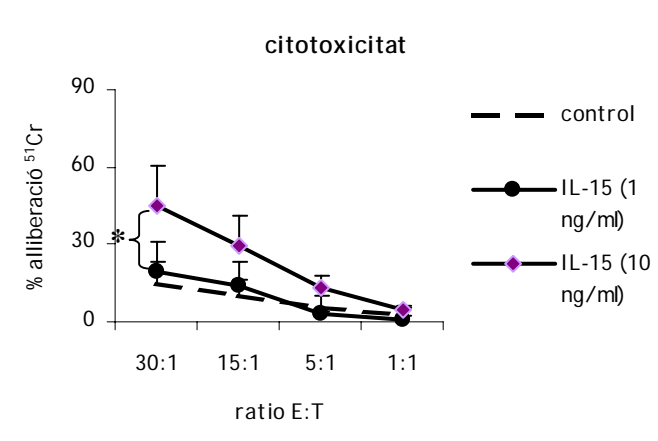


Figura 31. Capacitat citotòxica natural de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml). PBMCs en cultiu amb medi complet, IL-15 (1 ng/ml o 10 ng/ml) durant 20 hores. Control $19,3 \pm 11,7$ vs IL-15 10 ng/ml $45,3 \pm 15,1$; ratio 30:1 (* $p=0,008$). Els resultats mostren la mitjana \pm DS de 4 experiments independents amb 3 donants diferents.

Com ens indica la figura 31 es va poder confirmar la concentració de 10 ng/ml com a estadísticament significativa ($p=0,008$) potenciant la citotoxicitat natural de les PBMCs.

2.1.3 CITOTOXICITAT DE PBMCs ACTIVATEDES AMB IL-15

En funció d'aquests resultats es va valorar si aquesta concentració d'IL-15 seria capaç d'incrementar la citotoxicitat de les PBMCs com a cèl·lules efectores en presència de rituximab.

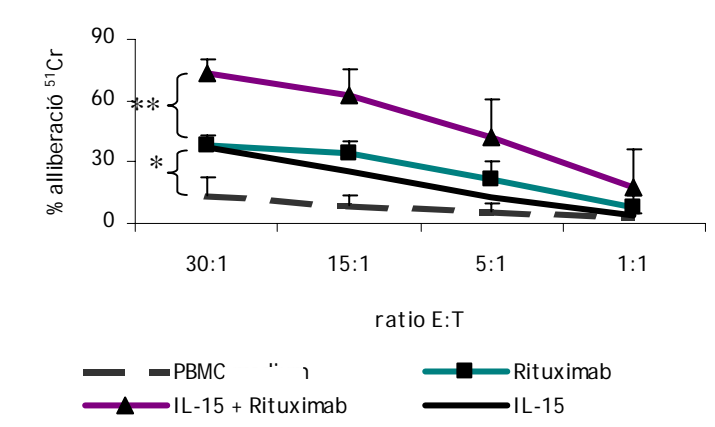


Figura 32. ADCC de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml).

PBMCs en cultiu amb medi complet ± IL-15 10 ng/ml durant 20 hores. Control $13,5 \pm 8,5$ vs rituximab $37,8 \pm 4,9$; ratio 30:1 (* $p=0,001$). Rituximab $37,8 \pm 4,9$ vs IL-15 + rituximab $73,1 \pm 7,6$; ratio 30:1 (** $p<0,001$). Els resultats mostren la mitjana ± DS de 7 experiments independents amb 5 donants diferents.

Al igual que havíem observat a l'experiment de citotoxicitat, 10 ng/ml d'aquesta citocina potenciava l'ADCC de PBMCs de manera estadísticament significativa. No només es va observar un increment estadísticament significatiu en presència de rituximab vs la presència d'una IgG control ($37,8\% \pm 4,9\%$ vs $13,5\% \pm 8,5\%$; ràtio 30:1 respectivament (* $p=0,001$)), si no que també es va observar que aquesta citocina era capaç de potenciar l'ADCC basal quasi el doble ($37,8\% \pm 4,9\%$ vs $73,1\% \pm 7,6\%$; PBMCs sense activar vs PBMCs activades amb IL-15 respectivament; ràtio 30:1 (** $p<0,001$)) (Figura 32).

2.1.4 CITOTOXICITAT DE PBMCs ACTIVADES AMB CpG ODN A

Un altre dels nostres objectius va ser analitzar el CpG ODN A com a molècula responsable de l'activació de cèl·lules NK a través dels receptors *Toll like* (TLR) i de la potenciació de la seva capacitat citotòxica. Per poder establir l'assaig d'ADCC amb aquesta molècula, va ser necessari veure la capacitat citotòxica natural del CpG ODN A vs un CpG ODN control (Materials i mètodes, apartat 6).

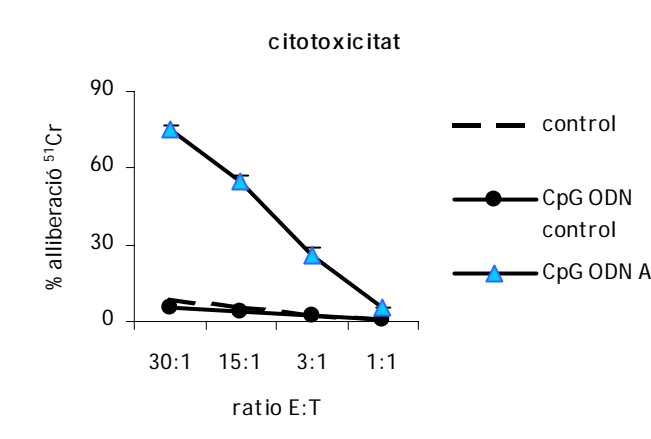


Figura 33. Citotoxicitat natural utilitzant CpG ODN control vs CpG ODN A. PBMC en cultiu amb medi complet, CpG ODN control, CpG ODN A a una concentració de 5 µg/ml durant 20 hores. Els resultats mostren la mitjana ± DS dels pous per triplicat.

Segons el resultat de la figura 33, el CpG ODN control no exerceix cap efecte estimulador sobre les PBMCs. El percentatge de lisi resultant en presència de CpG ODN control és similar a l'obtingut quan les PBMCs estan únicament cultivades en medi complet. En canvi, el CpG ODN A sí que va mostrar tenir capacitat potenciadora de la citotoxicitat natural (5,8% ± 1% vs 75,5% ± 1,5%; CpG ODN control vs CpG ODN A, ràtio 30:1 respectivament). Així, es va procedir a realitzar una sèrie d'assajos d'ADCC per corroborar aquest resultat preliminar i valorar l'efecte del CpG ODN A en presència de rituximab en un nombre més alt de donants.

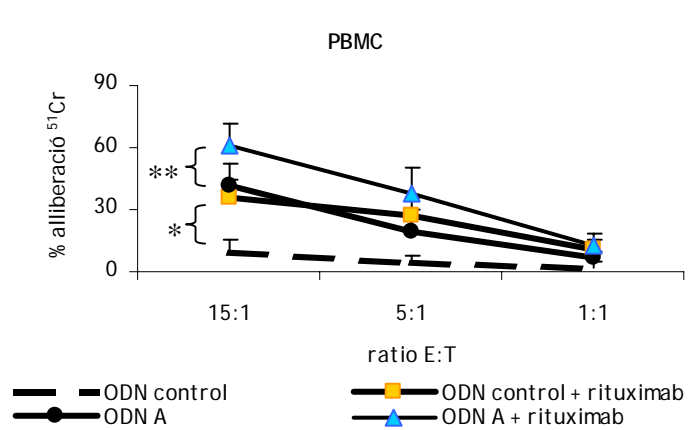


Figura 34. ADCC amb PBMCs activades amb CpG ODN control vs CpG ODN A.

PBMCs en cultiu amb medi complet, ± CpG ODN control, ± CpG ODN A a una concentració de 5 µg/ml durant 20 hores. CpG ODN control $9,6 \pm 6,2$ vs CpG ODN A $41,3 \pm 10,6$; ratio 15:1 (* $p=0,02$). CpG ODN control + rituximab $36 \pm 8,4$ vs CpG ODN A + rituximab 61 ± 11 ; ratio 15:1 (** $p=0,02$). Els resultats mostren la mitjana ± DS de 4 experiments independents amb 4 donants diferents.

Els resultats de 4 experiments independents amb 4 donants diferents (Figura 34), varen indicar que efectivament el CpG ODN A a una concentració de 5 µg/ml era capaç de potenciar tant la capacitat citotòxica natural com l'ADCC de les PBMCs de forma significativa ($p=0,02$).

2.2 RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES CÈL·LULES NK

2.2.1 CITOTOXICITAT DE CÈL·LULES NK ACTIVADES AMB IL-15

Per caracteritzar la població responsable d'aquest increment en la capacitat citotòxica que experimenten les PBMCs quan es cultiven amb IL-15, es va portar a terme la purificació per selecció negativa (Materials i mètodes, apartat 3) de cèl·lules NK presents a les PBMCs (Figura 35).

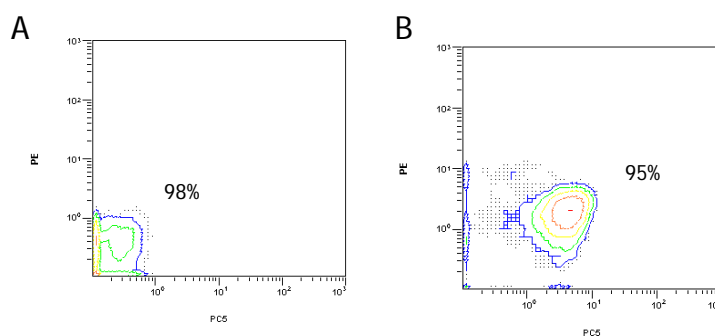


Figura 35. Purificació de cèl·lules NK.
 Anàlisi per citometria de flux de la població purificada. Marcatge cel·lular de superfície (A) Control Isotip PE/PC5. (B) CD56-PC5 / CD16-PE.

Per comparar l'efecte d'aquesta població purificada respecte les PBMCs totals, prèviament a la purificació es va quantificar el percentatge de cèl·lules CD16⁺ presents a cada PBMC. Posteriorment, es va ajustar la ràtio de cèl·lules efectores segons aquest percentatge. Així, si el percentatge de cèl·lules CD16⁺ era un 10%, la ràtio E:T utilitzada va ser de 2:1 (cèl·lules NK:cèl·lules Raji, respectivament) respecte a la ràtio 20:1 (PBMCs:cèl·lules Raji, respectivament)(Materials i mètodes, apartat 6).

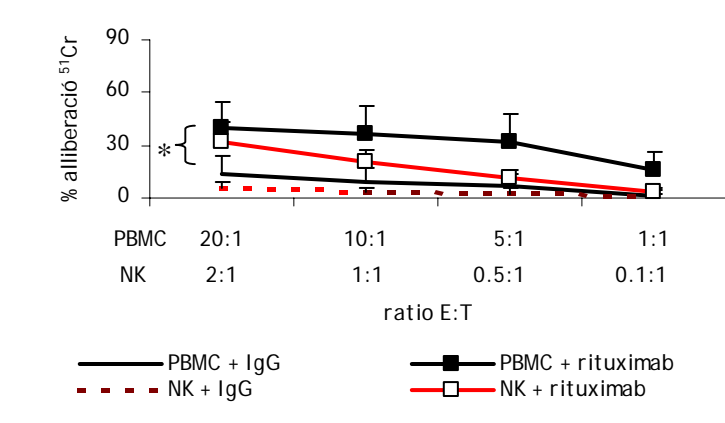


Figura 36. ADCC de PBMCs vs NK purificades.
 PBMCs i NK purificades del mateix donant es van mantenir en cultiu amb medi complet durant 20 hores. PBMC + IgG $13,5 \pm 10$ vs PBMC + rituximab $39,6 \pm 14,6$; ratio 20:1 (*p=0,03). NK + IgG $5,5 \pm 3,3$ vs NK + rituximab $32,2 \pm 10,6$; ratio 2:1 (p=0,06) Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb 3 donants diferents.

Al realitzar l'assaig d'ADCC amb PBMCs i NK purificades sota les mateixes condicions, es va observar que el percentatge de lisi de les cèl·lules NK purificades en

presència de rituximab ($32,2\% \pm 10,6\%$; ràtio 2:1) fou pròxim al de les PBMCs del mateix donant ($39,6\% \pm 14,6\%$; ràtio 20:1)($p=0,2$)(Figura 36).

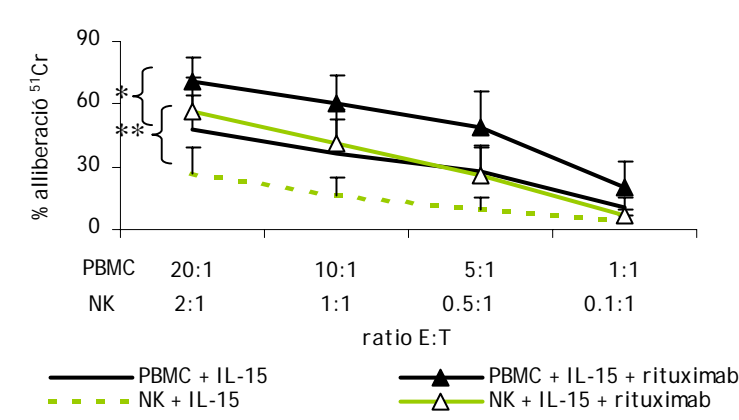


Figura 37. ADCC de PBMCs vs NK purificades activades amb IL-15.

PBMC i NK purificades del mateix donant es van activar amb IL-15 (10 ng/ml) durant 20 hores. PBMC + IL-15 $47,6 \pm 16,3$ vs PBMC + IL-15 + rituximab $71,1 \pm 11,7$; ratio 20:1 ($*p=0,03$). NK + IL-15 $27 \pm 12,4$ vs NK + IL-15 + rituximab $56,2 \pm 16,5$; ratio 2:1 ($**p=0,02$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents realitzats amb 3 donants diferents.

No obstant, a l'analitzar l'efecte de la IL-15 en aquest mateix experiment, es va observar com les cèl·lules NK purificades quan s'activen amb aquesta citocina experimenten un increment de l'ADCC estadísticament significatiu ($27\% \pm 12,4\%$ vs $56,2\% \pm 16,5\%$; NK + IL-15 vs NK + IL-15 + rituximab respectivament, ràtio 2:1 ($p=0,02$)) però que és menor al produït per les PBMCs ($47,6\% \pm 16,3\%$ vs $71,1\% \pm 11,7\%$; PBMC + IL-15 vs PBMC + IL-15 + rituximab respectivament, ràtio 20:1 ($p=0,03$))(Figura 37). Al trobar aquests resultats, va ésser necessari analitzar la fracció de cèl·lules presents a la PBMC una vegada les cèl·lules NK havien estat purificades, per mirar si aquesta fracció era la responsable de les diferències trobades a la figura 37. Per això, del mateix donant es va analitzar (en el mateix experiment d'ADCC i sota les mateixes condicions) la capacitat citotòxica de la PBMC, de les cèl·lules NK purificades i de la fracció restant una vegada purificades les cèl·lules NK (Figura 38).

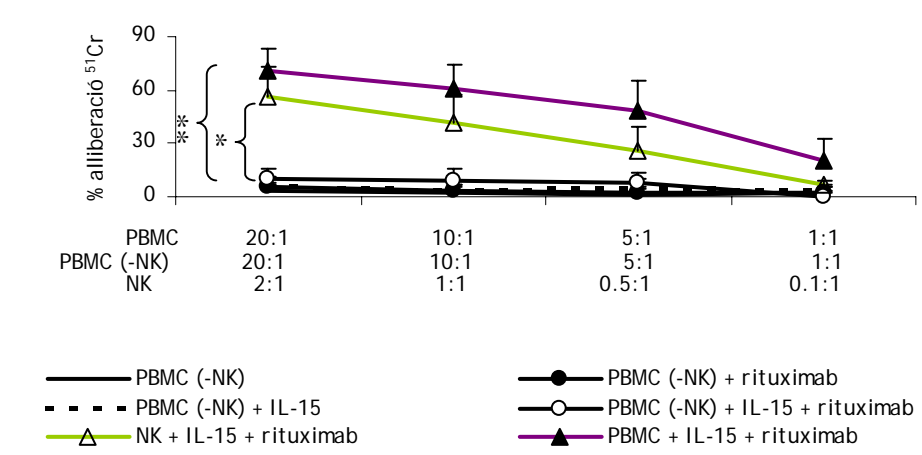


Figura 38. ADCC de PBMCs, NK purificades i PBMCs deplecionades de NK, activades amb IL-15.

PBMCs, NK purificades i PBMCs deplecionades de NKs del mateix donant es van activar amb IL-15 (10 ng/ml) durant 20 hores. PBMC (-NK) + IL-15 + rituximab $10,4 \pm 5,2$ vs PBMC + IL-15 + rituximab $71,1 \pm 11,7$; (** $p=0,01$). PBMC (-NK) + IL-15 + rituximab $10,4 \pm 5,2$ vs NK + IL-15 + rituximab $56,2 \pm 16,5$; (* $p=0,05$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb 3 donants diferents.

Els resultats varen demostrar que les cèl·lules NK eren les màximes responsables de la potenciació de l'ADCC per la IL-15 ja que el percentatge de lisi resultant de la població de PBMCs, una vegada havien estat deplecionades les cèl·lules NK, era pràcticament nul quan es comparava amb les altres 2 poblacions cel·lulars.

2.2.2 CITOTOXICITAT DE CÈL·LULES NK ACTIVADES AMB CpG ODN A

Tant bon punt es va demostrar que el CPG ODN A actuava estimulando tant la citotoxicitat natural com l'ADCC de les PBMCs, es va passar a identificar la població responsable d'aquesta potenciació. Així, es va procedir a purificar per selecció negativa les cèl·lules NK de les PBMCs (Materials i mètodes, apartat 3), i posteriorment a realitzar l'assaig d'ADCC amb aquesta població purificada i estimulada amb CpG ODN A.

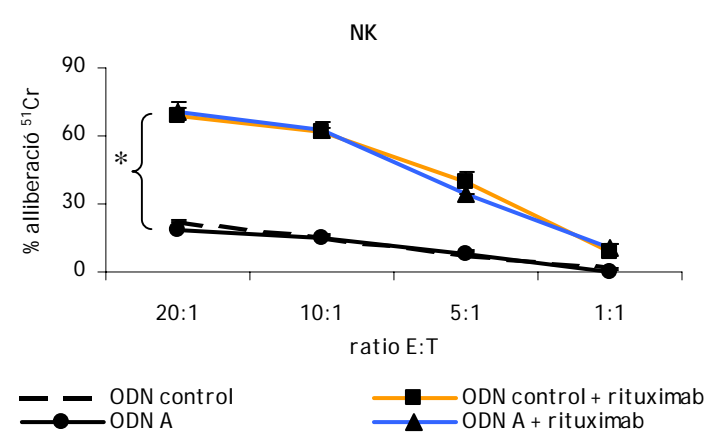


Figura 39. ADCC de cèl·lules NK activades amb CpG ODN control vs CpG ODN A.

Cèl·lules NK en cultiu amb medi complet, CpG ODN control, CpG ODN A a una concentració de 5 µg/ml durant 20 hores. CpG ODN control $9,1 \pm 3,5$ vs CpG ODN A $10,5 \pm 1,5$; ratio 20:1. CpG ODN control + rituximab $69,1 \pm 2,9$ vs CpG ODN A + rituximab $70,8 \pm 4$; ratio 20:1 (* $p=0,005$). Els resultats mostren la mitjana \pm DS de 2 experiments independents amb 2 donants diferents.

En l'anàlisi d'aquests resultats, tal com indica la figura 39, es va observar que les cèl·lules NK purificades no s'activaven en presència de CpG ODN A contràriament al que passava amb les PBMCs. Com a conseqüència d'això el percentatge de lisi resultant amb les cèl·lules NK purificades activades amb el CpG ODN A era similar al del CpG ODN control ($10,5\% \pm 1,5\%$ vs $9,1\% \pm 3,5\%$; CpG ODN A vs CpG ODN control, ràtio 20:3 respectivament). Paral·lelament, en concordança amb això el CpG ODN A en presència de rituximab tampoc provocava cap increment de l'ADCC respecte al CpG ODN control ($70,8\% \pm 4\%$ vs $69,1\% \pm 2,9\%$; CpG ODN A + rituximab vs CpG ODN control + rituximab; ràtio 20:1 respectivament), encara que la presència de rituximab sí que augmentava la lisi de forma significativa (* $p=0,005$). Després de constatar que el CpG ODN A no potenciava la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK, el següent pas va ser analitzar si la potenciació observada pel CpG ODN A a les PBMCs era degut a l'activació dels tipus cel·lulars (limfòcits T, limfòcits B i monòcits) que quedaven una vegada havien estat deplecionades de cèl·lules NK.

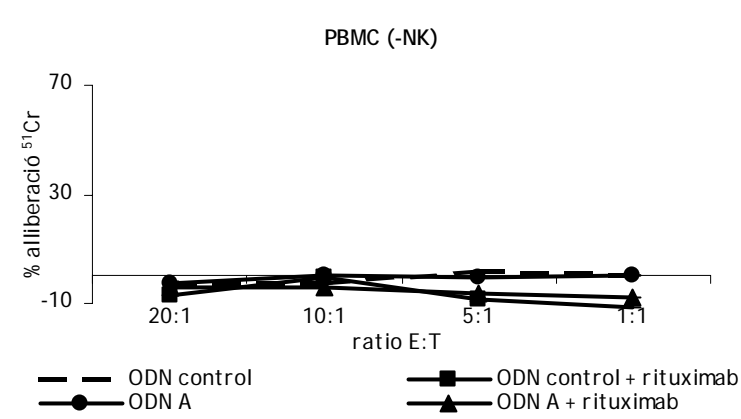


Figura 40. ADCC de PBMCs deplecionades de cèl·lules NK.

PBMCs deplecionades de cèl·lules NK en cultiu amb medi complet, ± CpG ODN control, ± CpG ODN A a una concentració de 5 µg/ml durant 20 hores. Resultat d'un donant mostrant la mitjana ± DS dels pous per triplicat; i representatiu de 3 experiments independents.

Malgrat el CpG ODN A no tenia un efecte directe sobre la cèl·lula NK, el que si es va observar és que aquestes cèl·lules continuaven sent les principals responsables potenciant l'ADCC de les PBMC, ja que la depleció de cèl·lules NK feia que les PBMCs perdessin tot tipus de capacitat citotòxica (Figura 40). Interaccions cel·lulars dels altres tipus cel·lulars (probablement APCs) amb les cèl·lules NK, podrien ser la causa d'aquest increment en l'ADCC quan s'utilitzen PBMCs.

2.3 QUANTIFICACIÓ DE LA PRODUCCIÓ D'IFN- γ

Per aprofundir en el paper que juguen aquestes dues molècules (IL-15 i CpG ODN A) al nostre sistema experimental, vàrem quantificar la producció d'IFN- γ per les cèl·lules efectores (PBMCs i cèl·lules NK purificades) activades amb IL-15 (10 ng/ml) o CpG ODN A (5 μ g/ml) quan es cocultivaven en presència de cèl·lules diana (cèl·lules Raji) preincubades amb rituximab. Es va analitzar la producció d'IFN- γ tant per PBMCs com per cèl·lules NK purificades, a diferents intervals de temps mitjançant la tècnica d'ELISA (Materials i mètodes, apartat 9.1).

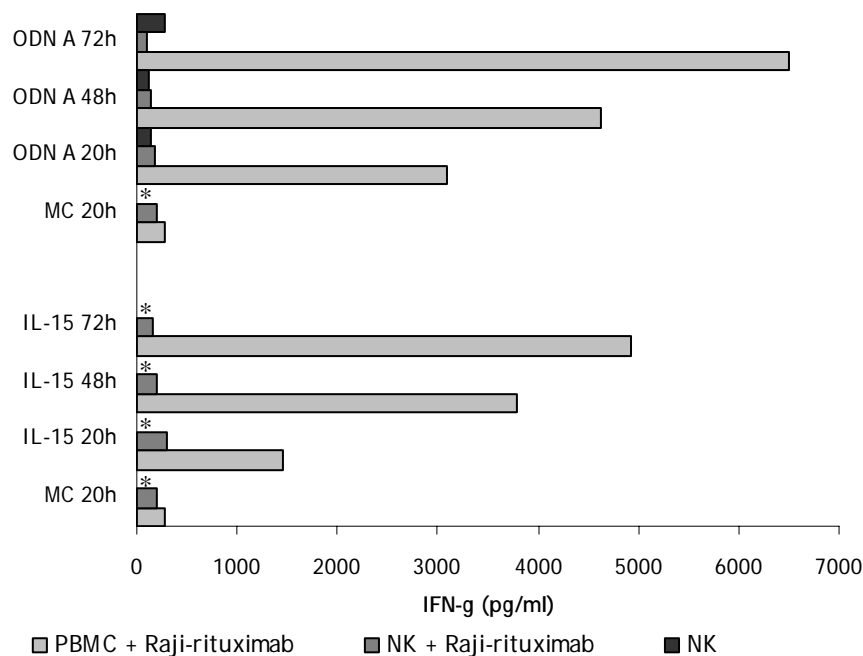


Figura 41. Quantificació d'IFN- γ als sobrenadants de PBMCs i cèl·lules NK cocultivades amb cèl·lules Raji preincubades amb rituximab.

PBMCs i cèl·lules NK activades amb IL-15 i CpG ODN A a diferents intervals de temps (20, 48 i 72 hores). Els sobrenadants es van recollir en aquests intervals de temps i els resultats indiquen quantitats acumulades d'IFN- γ . Aquestes dades són d'un donant i representatives de 3 experiments independents (* indetectable).

Els resultats varen mostrar que als sobrenadant de les PBMCs, cocultivades amb cèl·lules Raji preincubades amb rituximab, existia una major quantitat de IFN- γ que als sobrenadant dels cultius de cèl·lules NK cocultivades també amb cèl·lules Raji preincubades amb rituximab. A més, aquesta producció s'incrementava gradualment en el temps i va ser més alta en presència de CpG ODN A que d'IL-15 (Figura 41).

2.4 INFLUÈNCIA DEL POLIMORFISME DEL RECEPTOR FcγRIIIA

Segons resultats publicats per altres autors, la resposta clínica al rituximab en alguns tipus de LNH es veu influenciada pel polimorfisme del receptor FcγRIIIa [115, 116]. La rellevància d'aquestes dades ens va fer plantejar l'objectiu d'analitzar si aquest polimorfisme es correlacionava amb la capacitat citotòxica de les cèl·lules efectores. Amb aquest propòsit en primer lloc vàrem analitzar el polimorfisme del FcγRIIIa-158V/F de totes les PBMCs que havien estat estimulades amb IL-15 (n=11), i que posteriorment havien estat utilitzades als assajos d'ADCC. Dels 11 donants, 3 van ser homozigots per la valina (V/V), 3 per la fenilalanina (F/F) i la resta van ser heterozigots (V/F). Quan es va intentar trobar una relació entre el genotip i el percentatge de lisi resultant a cada experiment, les dades van indicar una gran variabilitat de la citotoxicitat natural als tres grups, sense observar-se diferències entre els tres grups (Figura 42). A més, els resultats donats per l'activació d'IL-15 no es veien modificats pel genotip del receptor FcγRIIIa-158V/F. Per tant, podem dir que sota les condicions en les que es van realitzar els assajos d'ADCC el polimorfisme del receptor FcγRIIIa no influenciava la resposta citotòxica cel·lular *in vitro*.

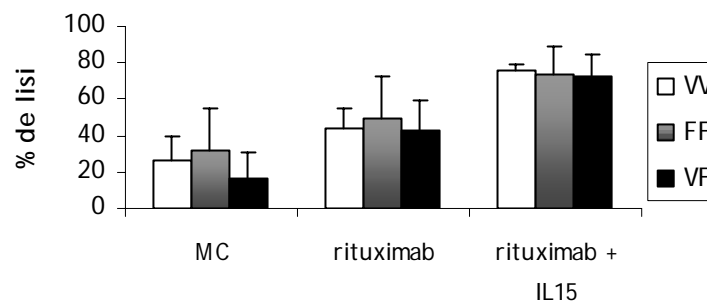


Figura 42. Correlació del polimorfisme FcγRIIIa-158V/F amb el percentatge de lisi resultant als assajos de citotoxicitat.

El genotipatge del polimorfisme es va realitzar a partir del DNA de 11 PBMCs. Anàlisi de la relació de la citotoxicitat natural i de l'ADCC amb PBMCs sense estimular i estimulades amb IL-15, amb cadascú dels genotips (V/V, F/F i V/F).

3. LEUCÈMIES LIMFÀTIQUES CRÒNIQUES

La finalitat dels estudis realitzats amb la línia cel·lular Raji era trobar resultats concloents potenciant l'ADCC per adreçar l'estudi a mostres de Leucèmies Limfàtiques Cròniques (LLC-B) humanes, degut a la resistència que presenten aquestes cèl·lules al tractament amb rituximab.

3.1 RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES PBMCs

3.1.1 EXPERIMENTS PRELIMINARS DE CITOTOXICITAT

En primer lloc va ser necessari establir les condicions idònies pels assajos de citotoxicitat on s'utilitzaven limfòcits de LLC-B com a cèl·lules diana. Dintre d'aquests paràmetres es va haver d'estudiar les concentracions òptimes de rituximab, així com la d'IL-15 i CpG ODN A.

3.1.1.1 Determinació de la concentració saturant de rituximab

Per buscar la concentració òptima de rituximab a utilitzar als experiments d'ADCC amb cèl·lules de LLC, es van valorar concentracions de rituximab progressives que anaven de 0,1 - 100 µg/ml a una ràtio de 30:1 (es varen utilitzar 3×10^5 efectores vs 1×10^4 diana). El percentatge de lisi resultant va demostrar que 10 µg/ml era la concentració de rituximab saturant als assajos d'ADCC utilitzant cèl·lules mononuclears com a efectores i cèl·lules de LLC com a diana (Figura 43).

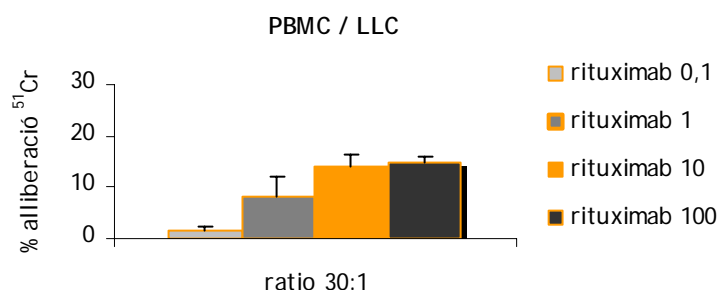


Figura 43. Concentració saturant de rituximab.

Experiment d'ADCC amb una LLC i una PBMC sense estimular i cultivada amb medi complet durant 24 hores. Es van utilitzar 3×10^5 cèl·lules efectores vs 1×10^4 diana. Concentracions de rituximab de 0,1-100 µg/ml. Aquests valors són la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

3.1.1.2 Càlcul de la concentració òptima d'IL-15

Una concentració d'IL-15 de 10 ng/ml va potenciar la citotoxicitat natural i l'ADCC als experiments previs on la línia cel·lular es va utilitzar com a diana. Comprovar si aquesta concentració era igualment eficaç amb cèl·lules de LLC com a diana va ser un requisit pels nostres experiments. De tal manera, vàrem comparar aquesta concentració amb una concentració 10 vegades superior per poder observar petites diferències i analitzar si 100 ng/ml era a la vegada capaç d'incrementar la capacitat citotòxica en la mateixa proporció. Segons el resultat observat a la figura 44, l'increment d'ADCC observat amb la concentració de 100 ng/ml no era suficientment important per justificar un augment de concentració 10 vegades a la utilitzada prèviament amb la línia cel·lular Raji.

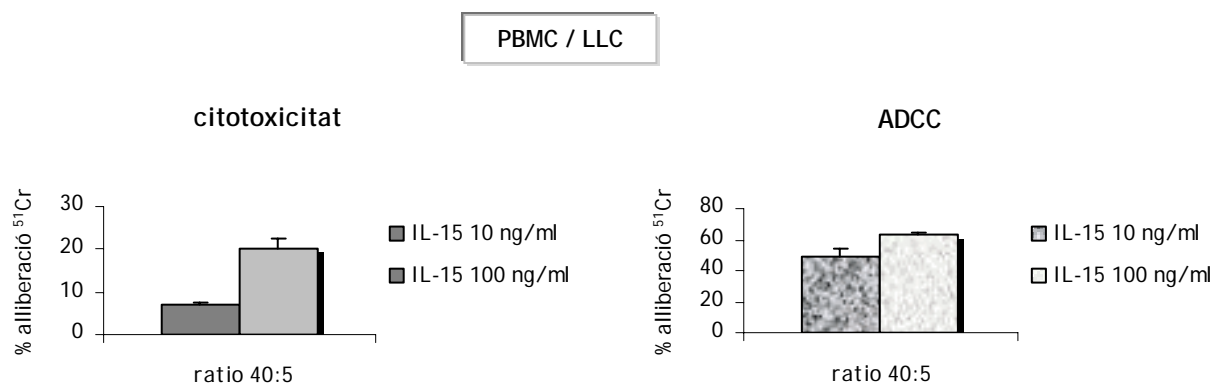


Figura 44. Concentració d'IL-15 10 ng/ml vs 100 ng/ml.

Experiment de citotoxicitat i d'ADCC amb una LLC i una PBMC estimulada amb IL-15 10 vs 100 ng/ml durant 24 hores. Es van utilitzar 4×10^5 cèl·lules efectores vs 5×10^4 dianes. La concentració de rituximab va ésser de 10 μ g/ml. Aquests valors són la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

3.1.1.3 Càlcul de la concentració òptima de CpG ODN A

Basant-nos en la literatura, la concentració utilitzada als experiments amb la línia cel·lular va ser de 5 μ g/ml. No obstant, es va voler valorar si concentracions inferiors podien ser eficaces als assajos amb LLCs. Per la qual cosa, concentracions de 1, 2,5 i 5 μ g/ml van ser analitzades per veure si responien de la mateixa manera potenciant l'ADCC.

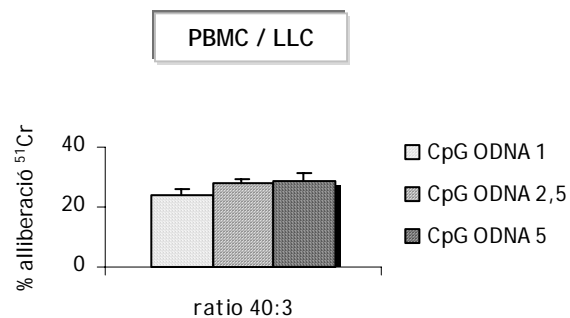


Figura 45. Concentració de CpG ODN A 1, 2,5 i 5 µg/ml.

Experiment d'ADCC amb una LLC i una PBMC estimulada amb diferents concentracions de CpG ODN A durant 24 hores. Es van utilitzar 4×10^5 cèl·lules efectores vs 3×10^4 dianes. La concentració de rituximab va ésser de 10 µg/ml. Aquests valors són la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

Com es veu en la figura 45, una concentració saturant de CpG ODN A es va aconseguir a partir de 2,5 µg/ml. Això va fer que aquesta fos la concentració utilitzada posteriorment als assajos citotòxics per considerar-se la mínima concentració amb màxima capacitat citotòxica.

3.1.2 CITOTOXICITAT DE PBMCS ACTIVADES AMB CpG ODN A I IL-15

Tenint en compte els resultats obtinguts en l'apartat anterior, a la resta d'experiments de citotoxicitat detallats a continuació es va utilitzar una concentració de rituximab de 10 µg/ml amb una ràtio cel·lular de 40:3. De la mateixa manera, les concentracions d'IL-15 i de CpG ODN van ser respectivament de 10 ng/ml i 2,5 µg/ml.

3.1.2.1 Activació amb CpG ODN A vs activació amb IL-15

Citotoxicitat

Es van realitzar experiments activant les PBMCS de manera independent amb cadascun dels estímuls. Tots dos estímuls, tant el CpG ODN A com la IL-15, van potenciar la citotoxicitat de manera significativa. Però cal destacar que l'increment induït per la IL-15 va ser superior a l'obtingut pel CpG ODN A. Així, les mateixes PBMCS

estimulades amb IL-15 van resultar tenir més activitat citotòxica ($33,8\% \pm 3,9\%$) que estimulades amb CpG ODN A ($25,6\% \pm 4,9\%$) ($p=0,01$) (Figura 46).

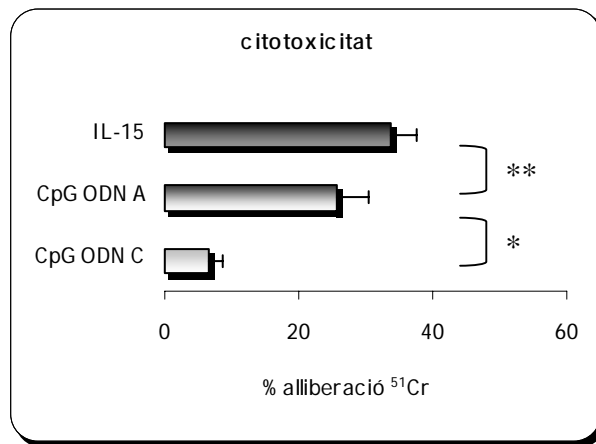


Figura 46. Citotoxicitat de PBMCs activades amb CpG ODN control, CpG ODN A i IL-15.

PBMCs en cultiu amb medi complet, \pm CpG ODN control, \pm CpG ODN A, \pm IL-15 durant 24 hores. CpG ODN control $6,6 \pm 2,1$ vs CpG ODN A $25,6 \pm 4,9$; ratio 40:3 ($*p=0,04$). CpG ODN A $25,6 \pm 4,9$ vs IL-15 $33,8 \pm 3,9$; ratio 40:3 ($**p=0,01$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb 3 donants i 3 LLC diferents.

ADCC

L'observació d'aquests resultats als assajos de citotoxicitat va fer imprescindible valorar el comportament d'aquestes dos molècules en presència de rituximab (Figura 47).

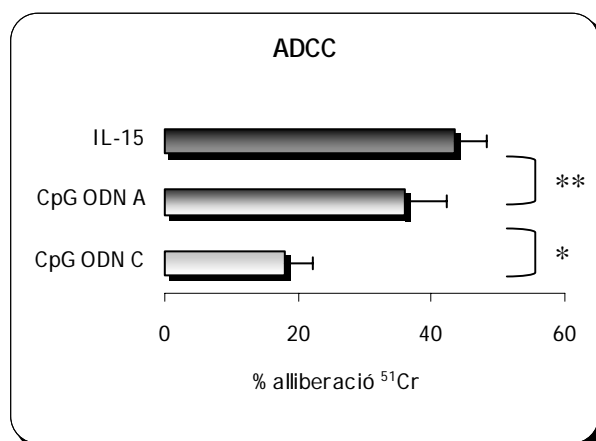


Figura 47. ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN control, CpG ODN A i IL-15.

PBMCs en cultiu amb medi complet, \pm CpG ODN control, \pm CpG ODN A, \pm IL-15 durant 24 hores. CpG ODN control $18 \pm 4,1$ vs CpG ODN A $35,9 \pm 6,3$; ratio 40:3 ($*p=0,006$). CpG ODN A $35,9 \pm 6,3$ vs IL-15 $43,5 \pm 4,8$; ratio 40:3 ($**p=0,02$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 5 experiments independents amb 5 donants i 5 LLC diferents.

En presència de rituximab es va confirmar el mateix, l'ADCC es va potenciar tant amb el CpG ODN A com amb la IL-15. Però, si es comparava el CpG ODN A vs la IL-15, el segon estímul va ser més potent i mantenia la significança estadística respecte el primer ($35,9\% \pm 6,3\%$ vs $43,5\% \pm 4,8\%$; CpG ODN A vs IL-15 respectivament, $p=0,02$).

3.1.2.2 Activació simultània de CpG ODN A i IL-15

El següent punt a analitzar va ser veure si aquests dos estímuls podien tenir un efecte sumatori o sinèrgic. Així, en un mateix experiment es van administrar els dos estímuls per separat i conjuntament. Els resultats van mostrar que l'administració conjunta no aportava cap efecte additiu significatiu potenciant l'ADCC, no obstant vàrem continuar trobant una diferència estadísticament significativa en l'administració dels dos estímuls per separat (Figura 48).

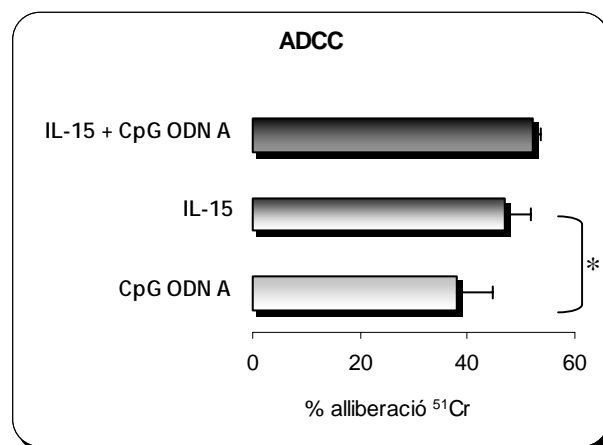


Figura 48. ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN A + IL-15.

PBMCs en cultiu amb medi complet, + CpG ODN A, + IL-15 durant o ambdós estímuls a la vegada durant 24 hores. CpG ODN A $38 \pm 6,7$ vs IL-15 $47 \pm 4,7$; ratio 40:3 ($*p=0,05$). CpG ODN A $38 \pm 6,7$ vs CpG ODN A + IL-15 $52 \pm 1,7$; ratio 40:3 ($p=0,1$). IL-15 $47 \pm 4,7$ vs CpG ODN A + IL-15 $52 \pm 1,7$; ratio 40:3 ($p=0,2$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 3 experiments independents amb 3 donants i 3 LLC diferents.

3.1.2.3 Significança estadística de l'ADCC amb la IL-15

Fins aquest moment, tot i veient que el CpG ODN A era un estímul prou potent per augmentar la citotoxicitat natural ($p=0,008$) i l'ADCC ($p=0,02$) (Figura 49), els resultats van apuntar a la IL-15 com un estímul encara més potent incrementant la capacitat citotòxica cel·lular.

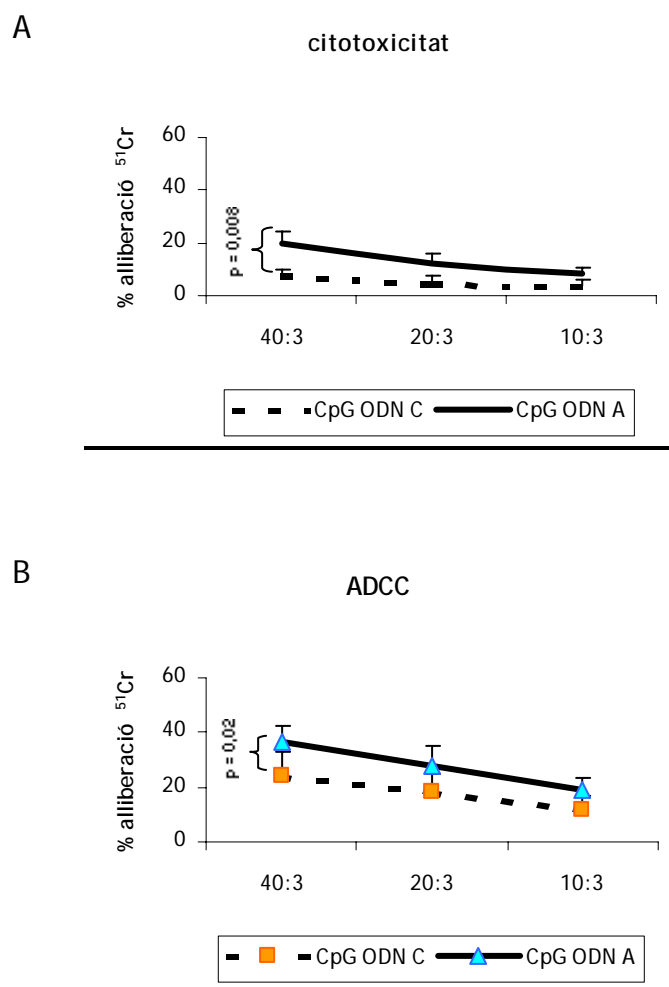


Figura 49. Citotoxicitat natural i ADCC de PBMCs activades amb CpG ODN A.

PBMCs en cultiu amb medi complet i CpG ODN A durant 24 hores. (A) Citotoxicitat natural. CpG ODN C $7,3 \pm 2,7$ vs CpG ODN A $20 \pm 4,2$; ratio 40:3 ($p=0,008$). (B) ADCC. CpG ODN C $24,3 \pm 8,5$ vs CpG ODN A $36,3 \pm 6,5$; ratio 40:3 ($p=0,02$). Els resultats mostren la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents amb 4 donants i 4 LLC diferents.

A l'observar aquestes diferències, el següent objectiu va ser focalitzar l'estudi en l'anàlisi de la IL-15. Per aquest fet, un nombre de 10 PBMCs estimulades amb IL-15 van ser enfrontades amb 10 LLC diferents. La figura 50 ens indica que va ser estadísticament significatiu l'increment en el percentatge de lisi que exerceix la IL-15 sobre les PBMCs. Aquest augment va ser tant en absència de rituximab ($2,7\% \pm 1,5\%$ vs $17,6\% \pm 4,4\%$; control vs IL-15 respectivament, $p=0,002$) com en presència de rituximab

(13,4% ± 2,5% vs 33,2% ± 4,9%; control vs IL-15 respectivament, $p < 0,001$). Resultats que consoliden a aquesta citocina com una important potenciadora de la citotoxicitat natural així com de la citotoxicitat cel·lular depenent del rituximab.

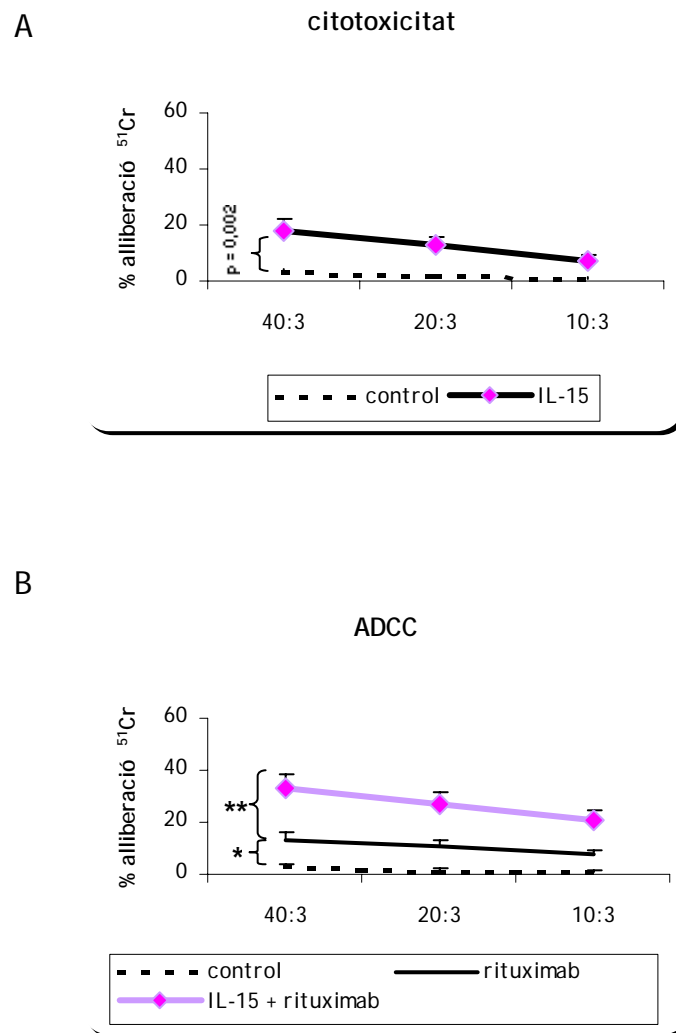


Figura 50. Citotoxicitat natural i ADCC de PBMCs activades amb IL-15.

PBMCs en cultiu amb medi complet i IL-15 durant 24 hores. (A) Citotoxicitat. Control $2,7 \pm 1,5$ vs IL-15 $17,6 \pm 4,4$; ratio 40:3 ($p=0,002$) (B) ADCC. Control $2,7 \pm 1,5$ vs rituximab $13,4 \pm 2,5$; ratio 40:3 ($*p < 0,001$). Rituximab $13,4 \pm 2,5$ vs IL-15 + rituximab $33,2 \pm 4,9$; ratio 40:3 ($**p < 0,001$). Els resultats mostren la mitjana ± SEM de 10 experiments independents amb 10 donants i 10 LLC diferents.

3.1.3 INFLUÈNCIA DE LA LLC I DE LA PBMC A L'ASSAIG CITOTÒXIC

3.1.3.1 Sensibilitat citotòxica de les LLC

Per conèixer l'impacte de la cèl·lula leucèmica a l'assaig citotòxic es van agafar 3 PBMCs diferents i 6 LLCs diferents, de manera que es va enfrontar cadascuna de les PBMCs de manera independent, a 2 LLCs diferents (Figura 51).

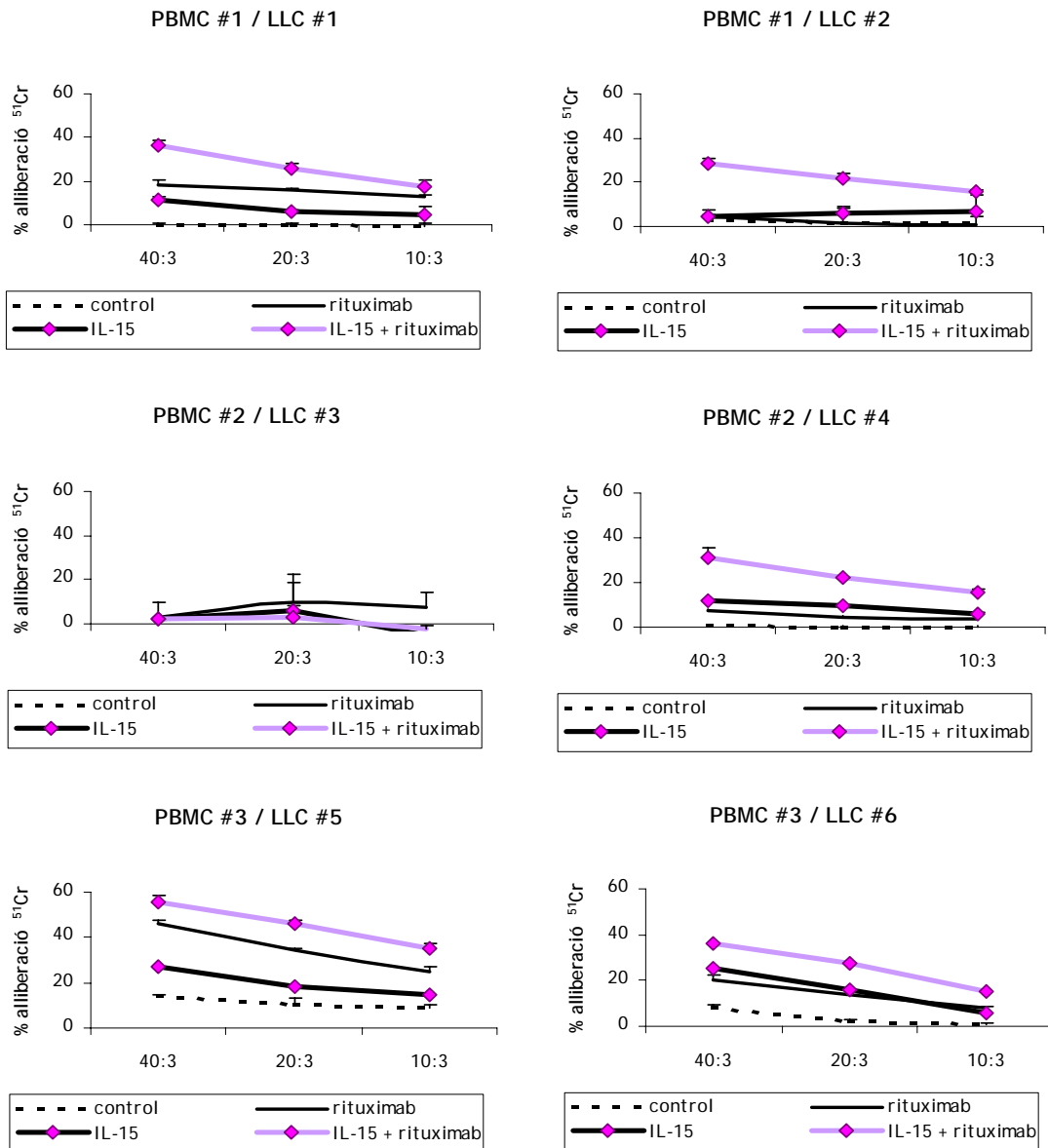


Figura 51. Citotoxicitat natural i ADCC de la mateixa PBMC enfrontada a 2 LLC diferents.

Observant els percentatges de lisi resultants es podria deduir que la cèl·lula tumoral participaria activament a l'assaig citotòxic. Així, la mateixa PBMC mataria més o menys cèl·lules tumorals i per tant el percentatge de lisi seria més o menys alt en

funció de la sensibilitat i/o resistència citotòxica que presentés la cèl·lula tumoral. Aquests valors es veurien afectats tant a la lisi basal com a la lisi induïda per la IL-15, a la vegada que en presència o absència de rituximab.

3.1.3.2 Capacitat citotòxica de les PBMC

Seguidament, també es va valorar si la capacitat citotòxica de les cèl·lules efectores podrien jugar un paper igualment important a l'assaig citotòxic. En aquesta situació es van agafar 3 LLCs diferents i 5 PBMCs diferents, així una mateixa LLC es va enfrontar de manera independent, a 2 PBMCs diferents (Figura 52).

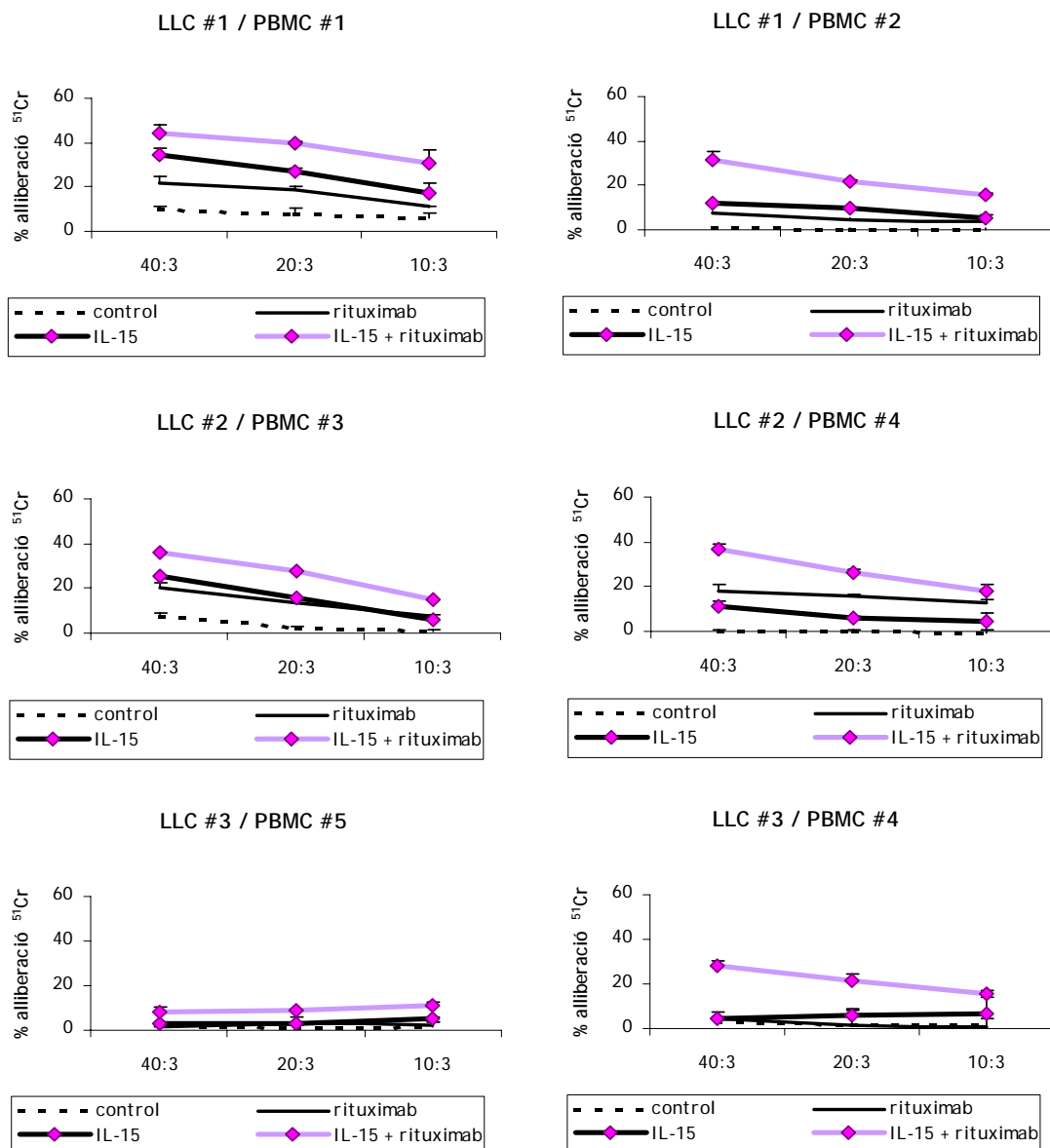


Figura 52. Citotoxicitat natural i ADCC de la mateixa LLC enfrontada a 2 PBMCs diferents.

L'experiment fou similar que a l'apartat anterior. Tres LLCs diferents es van enfrontar de manera independent amb 2 PBMCs diferents. El resultat va mostrar que les cèl·lules efectores també hi participaven en trobar una més alta lisi tumoral. Així, les mateixes cèl·lules tumorals es lisaven, més o menys eficaçment, segons la capacitat citotòxica de la PBMC a la que s'enfrontaven. Aquesta observació es va fer evident tant a nivell basal, és a dir en PBMCs que no van rebre cap estímul, com després de l'activació amb IL-15.

3.1.4 IMPLICACIÓ DEL TGF- β A L'ASSAIG CITOTÒXIC

Amb la utilització de la línia cel·lular CCRF-CEM (línia cel·lular limfoblastoide T) que té una alta expressió de lligands del NKG2D, alguns autors havien demostrat que el TGF- β a concentracions de 3-5 ng/ml disminuïa la citotoxicitat de les cèl·lules NK degut a una disminució en l'expressió del receptor NKG2D [273]. Tenint en compte aquests resultats i sabent que el TGF- β és una citocina que podria actuar com un factor de progressió tumoral pel seu paper immunosupressor, vàrem plantejar la hipòtesi de valorar l'actuació d'aquesta citocina immunosupressora als cultius cel·lulars activats amb IL-15 i la implicació en modular l'ADCC donada pel rituximab de les cèl·lules efectores en presència o absència d'IL-15 quan s'enfronten a cèl·lules de LLC.

3.1.4.1 Citotoxicitat en presència de TGF- β

La primera premissa va ser valorar la citotoxicitat en presència d'aquesta citocina a diferents concentracions als cultius cel·lulars de PBMCs que no havien rebut cap estímul.

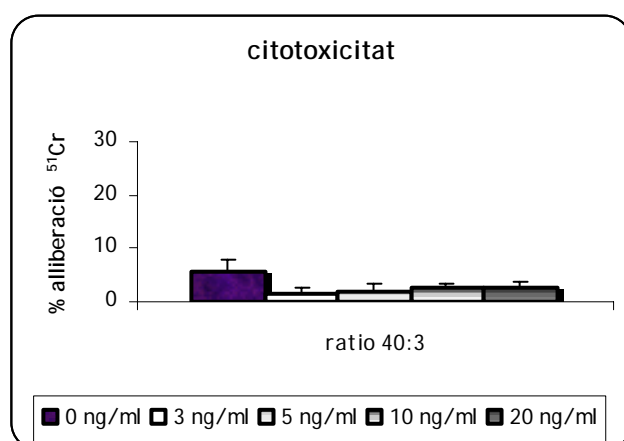


Figura 53. Citotoxicitat de PBMCs sense estimular, cultivades en un gradient de concentració de TGF- β , enfrontades a LLC-B.

PBMCs cultivades amb TGF- β a diferents concentracions (3, 5, 10 i 20 ng/ml) durant 24 hores. El resultat mostra la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

Petites concentracions de TGF- β (3 ng/ml) als cultius cel·lulars de PBMCs sense activar van ser suficients per disminuir la capacitat citotòxica d'aquestes PBMCs. Concentracions superiors no van incrementar aquesta inhibició, observant-se una saturació a partir de 3 ng/ml (Figura 53).

3.1.4.2 ADCC en presència de TGF- β

Veient que la citotoxicitat natural es veia afectada per la presència del TGF- β , el següent pas fou valorar si aquesta disminució es mantenia o es perdia en presència de rituximab. Així, es va valorar l'ADCC de PBMCs sense estimular cultivades a l'igual que l'apartat anterior amb diferents concentracions de TGF- β .

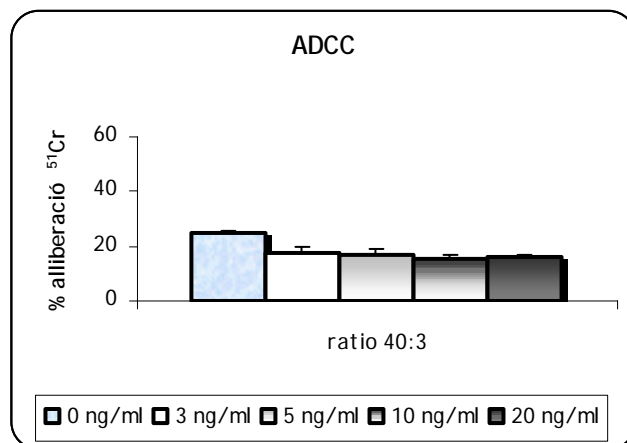


Figura 54. ADCC de PBMCs sense estimular, cultivades en un gradient de concentració de TGF- β , enfrontades a LLC-B.

PBMCs cultivades amb TGF- β a diferents concentracions (3, 5, 10 i 20 ng/ml) durant 24 hores. El resultat mostra la mitjana \pm DS dels pous per triplicat.

La presència de rituximab no va modificar el resultat que s'havia observat prèviament. De la mateixa manera que a la citotoxicitat natural, l'ADCC amb PBMCs no activades com a cèl·lules efectores, es va veure disminuïda en presència de tan sols 3 ng/ml de TGF- β (Figura 54).

3.1.4.3 Citotoxicitat en presència de TGF- β i IL-15

Fins aquest punt, es va confirmar la implicació del TGF- β a l'assaig citotòxic quan les PBMCs no havien rebut cap estímul. Tot seguit es va analitzar si aquest efecte inhibitori també tenia lloc en presència d'IL-15. L'estudi es va realitzar en PBMCs activades amb IL-15 durant 24 hores, cultivades sota les mateixes condicions utilitzades als apartats anteriors.

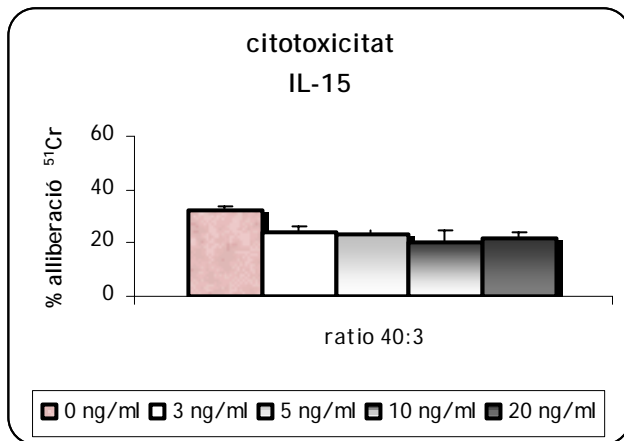


Figura 55. Citotoxicitat de PBMCs estimulades, amb IL-15 i cocultivades en un gradient de concentració de TGF-β, enfrontades a LLC-B.

PBMCs cultivades amb IL-15 10 ng/ml i cocultivades amb TGF-β a diferents concentracions (3, 5, 10 i 20 ng/ml) durant 24 hores. El resultat mostra la mitjana ± DS dels pous per triplicat.

Encara que com ja s’havia demostrat prèviament la IL-15 és una important citocina potenciant la capacitat citotòxica de les PBMCs, tal com indica la figura 55, el TGF-β va ser capaç d’actuar modificant la resposta de les PBMCs activades amb IL-15. Una concentració de 3 ng/ml va ser suficient per disminuir la citotoxicitat natural de PBMCs estimulades amb IL-15 al igual que s’havia vist en PBMCs sense estimular.

3.1.4.4 ADCC en presència de TGF-β i IL-15

Fins ara s’ha vist que el TGF-β juga un paper important com a citocina supressora de la capacitat citotòxica de les PBMCs activades (IL-15) i sense activar. El següent objectiu va ser valorar si aquesta disminució era significativa en presència de rituximab.

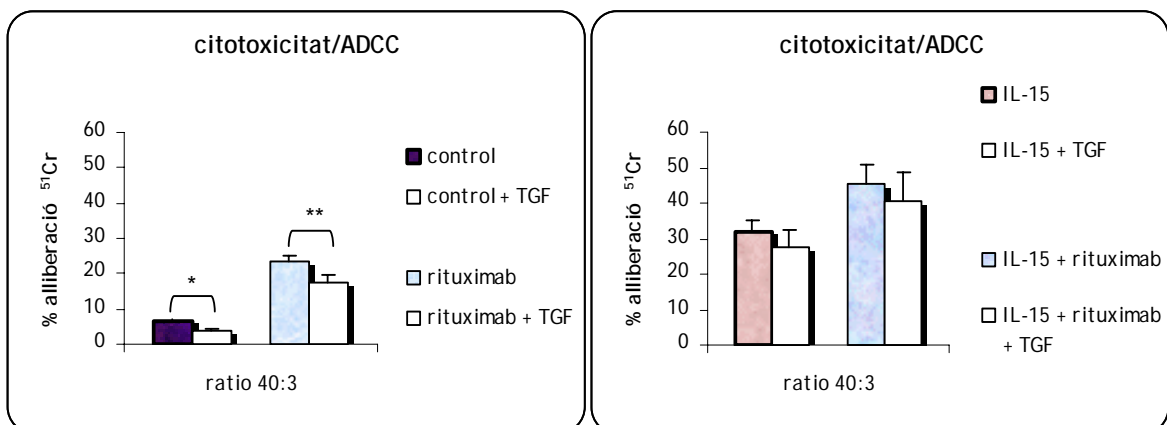


Figura 56. Citotoxicitat i ADCC de PBMCs ± estimulades amb IL-15 i cocultivades amb TGF-β.

PBMCs cultivades amb medi de cultiu complet, IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades amb TGF-β (3 ng/ml) durant 24 hores. Control $6,7 \pm 0,6$ vs control + TGF-β $3,6 \pm 1$ (* p=0,01); rituximab $23,3 \pm 1,7$ vs rituximab + TGF-β $17,6 \pm 1,9$ (** p=0,02); IL-15 $31,8 \pm 3,5$ vs IL-15 + TGF-β $27,8 \pm 4,6$ (p=0,2); IL-15 + rituximab $45,5 \pm 5,1$ vs IL-15 + rituximab + TGF-β $40,7 \pm 7,9$ (p=0,2). Aquests valors són la mitjana ± SEM de 3 experiments independents amb 3 LLC i 3 donants diferents.

Tal com s'indica a la figura 56, l'ambient immunosupressor (TGF- β 3 ng/ml) va disminuir de forma estadísticament significativa la citotoxicitat natural ($6,7\% \pm 0,6\%$ vs $3,6\% \pm 1\%$; control vs control + TGF- β , ràtio 40:3 respectivament; $p=0,01$) i l'ADCC ($23,3\% \pm 1,7\%$ vs $17,6\% \pm 1,9\%$; rituximab vs rituximab + TGF- β , ràtio 40:3 respectivament; $p=0,02$) de PBMCs sense estimular. No obstant, l'estimulació de PBMCs amb IL-15 va compensar l'efecte inhibitori del TGF- β sobre la citotoxicitat natural i sobre l'ADCC perdent-se la significació; IL-15 vs IL-15 + TGF- β ($p=0,2$) i IL-15 + rituximab vs IL-15 + rituximab + TGF- β ($p=0,2$). Aquests resultats posicionen a la IL-15, com una potent citocina estimuladora de la capacitat citotòxica de les PBMCs, en un ambient immunosupressor.

Demostrada la menor supressió de l'ADCC que va induir el TGF- β en presència d'IL-15, es varen realitzar 4 experiments independents per analitzar si la potenciació de l'ADCC en un ambient immunosupressor continuava sent estadísticament significativa.

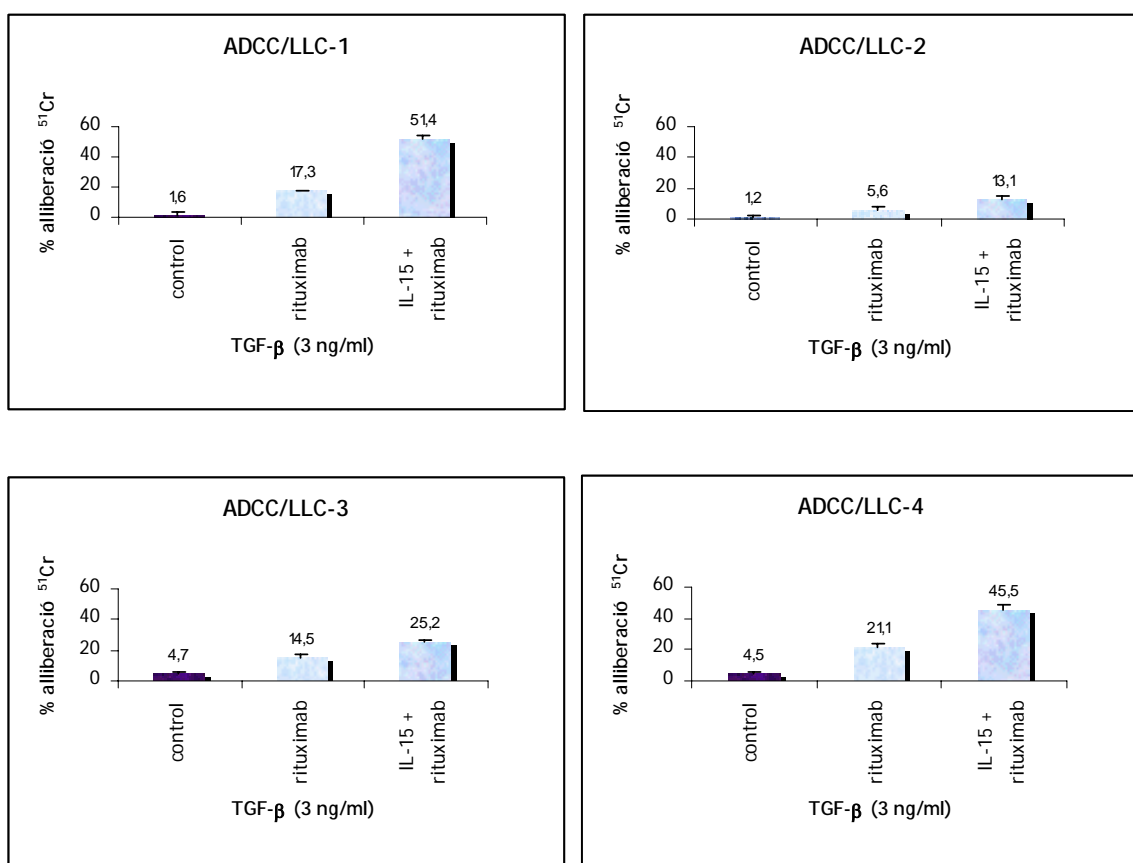


Figura 57. ADCC en presència de TGF- β de 4 LLC i 4 donants diferents.

PBMCs cultivades amb medi de cultiu complet, IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades amb TGF- β (3 ng/ml) durant 24 hores. A cada experiment els resultats mostren la mitjana \pm DS del pou per triplicat.

Dels resultats obtinguts d'aquests 4 experiments, una primera valoració ens mostra que la presència de TGF- β no va impedir que la IL-15 potenciés l'ADCC a cap d'ells (Figura 57). A més, l'anàlisi conjunt de les dades va evidenciar que els resultats eren estadísticament significatius, tant si comparàvem l'ADCC de les PBMCs quan no havien estat estimulades ($3\% \pm 0,9\%$ vs $14,6\% \pm 3,2\%$; control vs rituximab, ràtio 40:3 respectivament; * $p=0,02$), com si comparàvem l'increment de l'ADCC en presència d'IL-15 ($14,6\% \pm 3,2\%$ vs $33,8\% \pm 8,8\%$; rituximab vs rituximab + IL-15, ràtio 40:3 respectivament; ** $p=0,05$) (Figura 58).

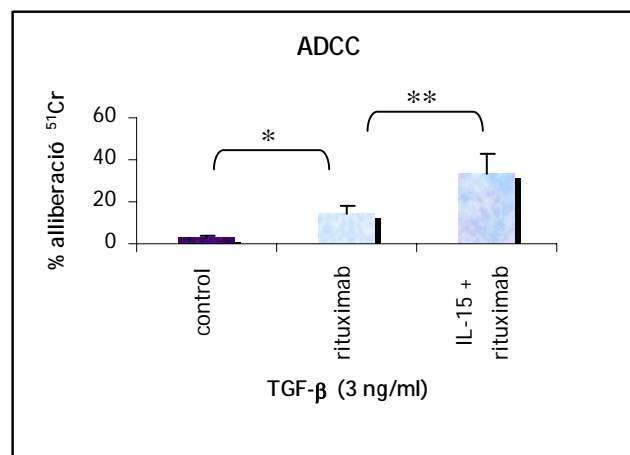


Figura 58. ADCC de PBMCs \pm estimulades amb IL-15 i cocultivades amb TGF- β .

PBMCs cultivades amb medi de cultiu complet, IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades amb TGF- β (3 ng/ml) durant 24 hores. Control + TGF- β $3 \pm 0,9$ vs rituximab + TGF- β $14,6 \pm 3,2$ (* $p=0,02$); rituximab + TGF- β $14,6 \pm 3,2$ vs IL-15 + rituximab + TGF- β $33,8 \pm 8,8$ (** $p=0,05$). Aquests valors són la mitjana \pm SEM de 4 experiments independents amb 4 LLC i 4 donants diferents.

3.1.5 IMPLICACIÓ DE L'IFN- γ A L'ASSAIG CITOTÒXIC

3.1.5.1 Quantificació d'IFN- γ

Una de les principals citocines sintetitzades per les cèl·lules NK i responsable de l'activació de moltes cèl·lules efectores en l'ambient tumoral és l'IFN- γ . Degut a la importància d'aquesta citocina vam prosseguir a la seva quantificació als sobredants dels nostres cultius mitjançant un immunoassaig amb boles fluorescents - Flowcytomix (Materials i mètodes, apartat 9.2).

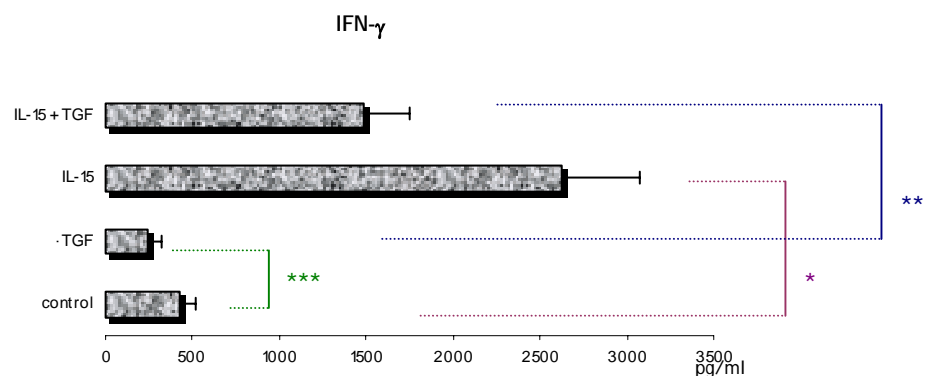


Figura 59. Síntesi d'IFN γ per PBMCs cultivades \pm IL-15 i cocultivades \pm TGF- β .

PBMCs cultivades durant 24 hores \pm IL-15 (10 ng/ml) i \pm TGF- β (3 ng/ml). Control $424,5 \pm 90,6$ vs IL-15 $2625,4 \pm 450,3$ (* $p=0,008$); control + TGF- β $238,2 \pm 85,3$ vs IL-15 + TGF- β $1488,5 \pm 262,3$ (** $p=0,003$); control vs control + TGF- β (** $p=0,01$). Aquests valors són la mitjana \pm SEM de 6 experiments independents.

Les PBMCs cultivades en presència d'IL-15 van secretar molta més quantitat d'IFN- γ que les mateixes PBMCs sense estimular, sent aquesta diferència estadísticament significativa (control vs IL-15; * $p=0,008$). La presència de TGF- β en aquests cultius va modificar la resposta. El TGF- β va disminuir la producció d'IFN- γ de PBMCs tant activades amb IL-15 com sense activar. Però, la diferència va continuar sent significativa (TGF- β vs IL-15 + TGF- β ; ** $p=0,003$). No obstant, la presència d'IL-15 va fer que aquesta disminució de síntesi fos més petita i variable ($p=0,06$), contràriament a la disminució en absència d'IL-15 (** $p=0,01$) (Figura 59). Així, encara que la presència al

medi d'una citocina immunosupressora com és el TGF- β afectaria la producció d'IFN- γ per PBMCs, la capacitat activadora de la IL-15 va superar en gran mesura aquest efecte.

3.1.5.2 Neutralització de l'IFN- γ

Aquest IFN- γ una vegada secretat pot a la vegada actuar sobre les cèl·lules T CD8⁺ citotòxiques potenciant la capacitat citolítica d'aquestes cèl·lules i fent que proliferin; així com actuar sobre els macròfags activant-los. Per controlar el paper que juguen aquestes poblacions cel·lulars en els experiments de citotoxicitat vàrem introduir als nostres cultius (PBMCs sense estimular i estimulades amb IL-15) un anticòs anti-IFN- γ que neutralitzés tot l'IFN- γ secretat al medi. Si el paper d'aquestes cèl·lules fos important, neutralitzant aquesta citocina, s'hauria de veure una disminució en el percentatge de lisi resultant als nostres assajos.

3.1.5.2.1 Neutralització de l'IFN- γ als sobrenedants

Tres concentracions diferents d'anti-IFN- γ (50 ng/ml, 200 ng/ml i 450 ng/ml) es van utilitzar als cultius cel·lulars (mínima, intermèdia i màxima segons informació referenciada a la fitxa tècnica del producte). Una vegada recuperats els sobrenedants d'aquests cultius cel·lulars en presència d'anti-IFN- γ es va procedir a la quantificació d'IFN- γ en aquests sobrenedants mitjançant la realització d'un ELISA (Materials i mètodes, apartat 9.1) per confirmar la neutralització.

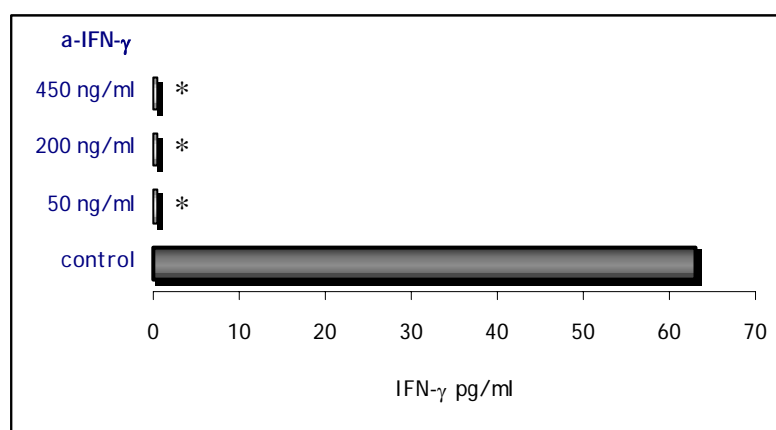


Figura 60. Síntesi d'IFN γ per PBMCs sense estimular i cocultivades en un gradient de concentració d'anti-IFN- γ .

Quantificació d'IFN- γ als sobrenadants de PBMCs sense estimular i cultivades amb diferents concentracions d'anti-IFN- γ (50, 200, i 450 ng/ml) durant 24 hores, mitjançant la tècnica d'ELISA. Aquestes valors són d'un donant i representatius de 2 experiments independents. (* indetectable)

Els resultats van indicar que la presència de tan sols 50 ng/ml d'anti-IFN- γ , als cultius cel·lulars de PBMCs sense estimular, va ser suficient per neutralitzar l'IFN- γ secretat al medi (Figura 60). Posteriorment, es va repetir l'experiment en PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml), per comparar els valors.

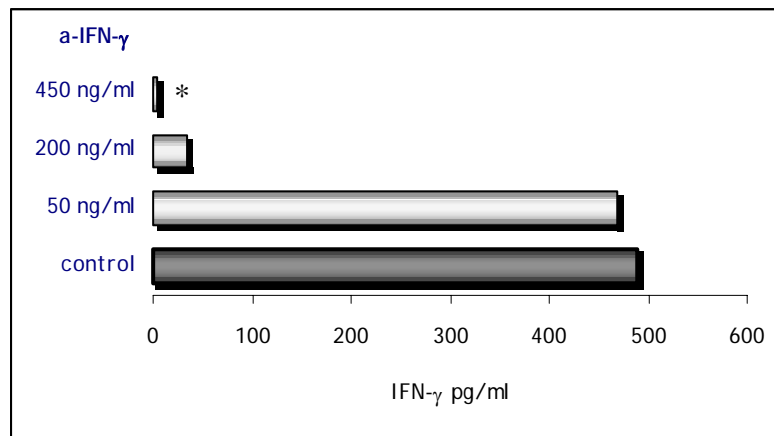


Figura 61. Síntesi d'IFN γ per PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades en un gradient de concentració d'anti-IFN- γ .

Quantificació d'IFN- γ als sobrenadants de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml) i cultivades amb diferents concentracions d'anti-IFN- γ (50, 200, i 450 ng/ml) durant 24 hores, mitjançant la tècnica d'ELISA. Aquestes valors són d'un donant i representatius de 2 experiments independents. (* indetectable)

En el cas de PBMCs estimulades amb IL-15 (10 ng/ml), la quantitat de 50-200 ng/ml va ser insuficient per neutralitzar la totalitat de l'IFN- γ present al medi. No obstant, amb 450 ng/ml, concentració més alta d'anti-IFN- γ utilitzada a l'experiment, no es va detectar la presència d'aquesta citocina als sobrenadants (Figura 61).

3.1.5.2.2 Neutralització de l'IFN- γ a l'assaig citotòxic

Valorar la citotoxicitat de PBMCs, sense estimular o estimulades amb IL-15, quan al medi es neutralitza l'IFN- γ , interferint d'aquesta manera en qualsevol influència d'aquesta citocina al microambient del cultiu cel·lular, va ser el nostre següent objectiu. Tenint en compte els resultats descrits a l'apartat anterior, es va utilitzar una concentració de 450 ng/ml d'anti-IFN- γ per neutralitzar l'IFN- γ dels cultius cel·lulars

durant 24 hores. Posteriorment, es va procedir a realitzar l'assaig citotòxic (Materials i mètodes, apartat 6).

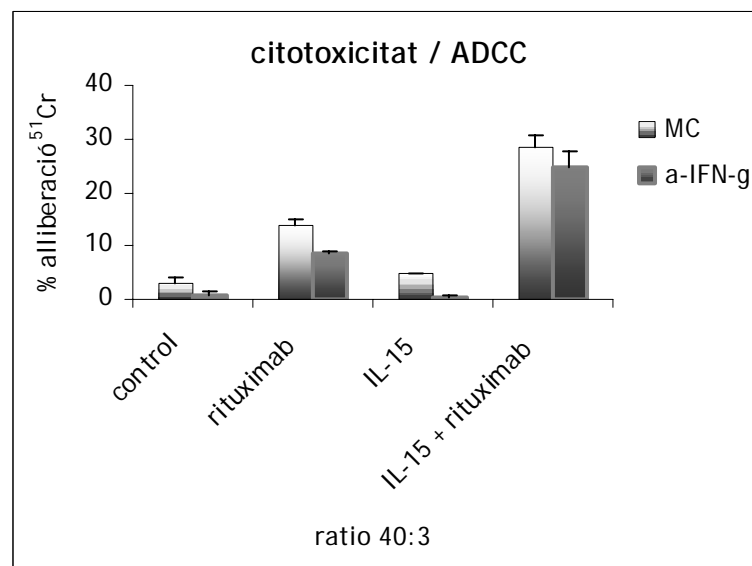


Figura 62. Citotoxicitat i ADCC de PBMCs \pm estimulades amb IL-15 i cocultivades amb a-IFN- γ . PBMCs cultivades amb medi de cultiu complet, IL-15 (10 ng/ml) i cocultivades amb a-IFN- γ (450 ng/ml) durant 24 hores. Aquests valors són la mitjana \pm DS del pou per triplicat d'un donant i representatius de 2 experiments independents.

Com es pot observar a la Figura 62, encara que els resultats no mostren ser significatius, en absència d'IFN- γ al medi s'observa certa tendència a que el percentatge de lisi resultant sigui menor que en presència d'IFN- γ . La qual cosa ens indica que la participació de l'IFN- γ com a activador directe de les cèl·lules NK en aquest context (24 hores d'activació *in vitro*) no és significatiu però a tenir en compte.

3.1.6 ANÀLISI DE CITOCINES I QUIMIOCINES

Prèviament s'ha mostrat com la IL-15 i el TGF- β afecten la producció d'IFN- γ . A part de l'IFN- γ , es va quantificar la producció d'altres citocines i quimiocines involucrades en l'activació de les cèl·lules NK com són el TNF- α , IL-5, IL-13, IL-10, MIP-1 α i MIP-1 β . Per valorar la producció es van recuperar els sobrenedants dels cultius cel·lular i es va procedir a la seva quantificació segons s'indica a Materials i mètodes, apartat 9 (Figura 63).

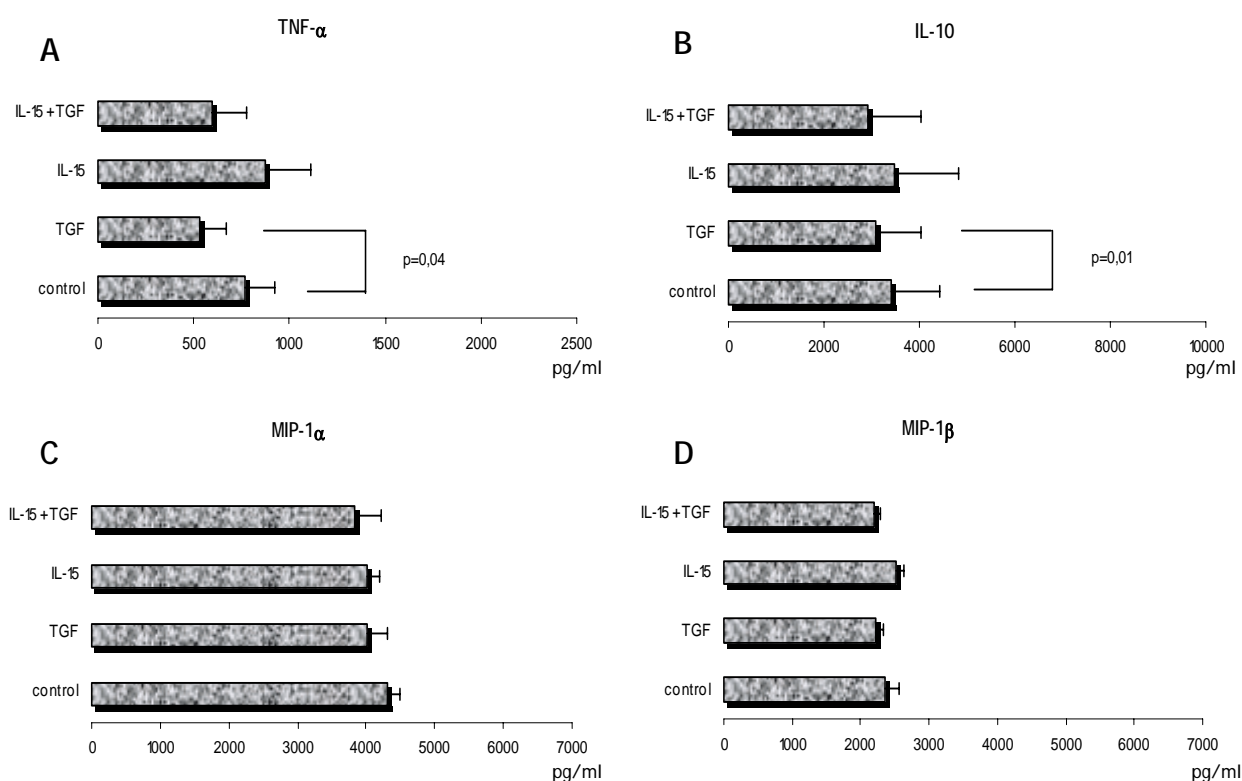


Figura 63. Síntesi TNF- α , IL-10, MIP-1 α i MIP-1 β per PBMCs cultivades \pm IL-15 i cocultivades \pm TGF- β .
 PBMCs cultivades durant 24 hores \pm IL-15 (10 ng/ml) i \pm TGF- β (3 ng/ml). (A) Quantificació TNF- α . Control $768,4 \pm 153,9$ vs TGF- β $532,1 \pm 140,0$ ($p=0,04$). (B) Quantificació IL-10. Control $3418,0 \pm 1012,7$ vs TGF- β $3067,4 \pm 976,6$ ($p=0,01$). (C) Quantificació MIP-1 α . (D) Quantificació MIP-1 β . TGF- β $2221,5 \pm 100,8$ vs IL-15 $2527,3 \pm 101,9$ ($p=0,007$). Aquests valors són la mitjana \pm SEM de 6 experiments independents.

El comportament del TNF- α i la IL-10 en presència de TGF- β va ser similar al del IFN- γ . Així, la producció d'aquestes dues citocines va disminuir en presència de TGF- β , sent estadísticament significativa aquesta davallada només en absència d'IL-15. Però, no es va observar un increment de TNF- α i IL-10 quan les cèl·lules s'activaven amb IL-15. En aquests dos casos, sembla ser que la IL-15 protegiria en certa manera a la cèl·lula de l'efecte supressor del TGF- β . La producció de quimiocines, MIP-1 α i MIP-1 β , no es va modificar en cap situació. Contràriament, la IL-5 i la IL-13 no estaven presents als sobrenedants d'aquests cultius cel·lulars.

3.2 RESPOSTA CITOTÒXICA DE LES CÈL·LULES NK

Ja havíem demostrat que la principal població efectora responsable de la citotoxicitat cel·lular i de l'ADCC front cèl·lules de limfoma B eren les cèl·lules NK. Per corroborar aquest resultat front cèl·lules de LLC-B, vam extreure aquesta població de les PBMCs mitjançant una selecció positiva de cèl·lules CD56⁺ (Materials i mètodes, apartat 3.2). Posteriorment vam enfrontar la PBMC, amb i sense cèl·lules NK, a la mateixa LLC-B utilitzant els mateixos ràtios E:T per valorar la capacitat citotòxica d'ambdues poblacions.

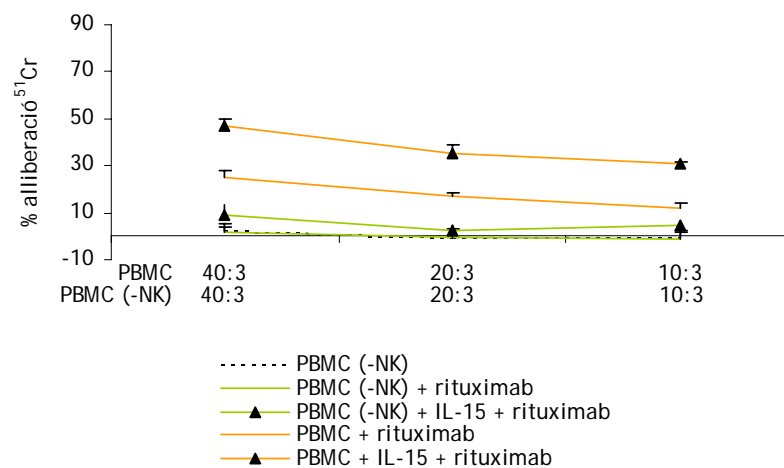


Figura 64. ADCC de PBMCs i PBMCs deplecionades de NK activades amb IL-15.

PBMCs i PBMCs deplecionades de NKs del mateix donant es van activar amb IL-15 (10 ng/ml) durant 24 hores. PBMC (-NK) + IL-15 + rituximab $8,8 \pm 4,2$ vs PBMC + IL-15 + rituximab $47,2 \pm 2,8$. PBMC (-NK) + rituximab $1,5 \pm 2,3$ vs PBMC + rituximab $25,3 \pm 2,5$. Resultat d'un donant mostrant la mitjana \pm DS dels pous per triplicat; i representatiu de 3 experiments independents.

Com era d'esperar, la pèrdua de cèl·lules NK a les PBMCs va fer que es perdés pràcticament la totalitat de la capacitat citotòxica de les PBMCs tant activades com sense activar (Figura 64). Demostrant-se així, la importància d'aquesta població efectora en la lisi de cèl·lules leucèmiques de LLC-B en absència i important pel nostre estudi en presència de rituximab.

3.3 EXPRESSIÓ DE RECEPTORS DE SUPERFÍCIE CEL·LULAR

Tal com s'ha pogut constatar a l'introducció, l'ADCC es veu influenciada no només per la unió de les cèl·lules NK a les cèl·lules diana, si no també pel seu estat d'activació i la seva capacitat de desgranulació. Aquests fets, van fer que un dels objectius fos analitzar, en presència d'IL-15, els dos receptors activadors que estan relacionats en un alt percentatge amb cèl·lules NK en desgranulació, CD69 i NKG2D.

3.3.1 POBLACIÓ CEL·LULAR "PBMCs"

3.3.1.1 Expressió del receptor CD69

En primer lloc es va analitzar l'expressió del receptor CD69 en PBMCs que havien estat prèviament cultivades amb IL-15 durant 24 hores.

Taula 11. Expressió de CD69 en la població CD16⁺ activada ± IL-15.

	CD69 ⁺ (%) en població CD16 ⁺		p
	CONTROL	IL-15	
PBMC 1	7,03	10,18	
PBMC 2	1,17	4,5	
PBMC 3	1,97	6,3	
PBMC 4	4,90	11,18	
	promig ± DS	promig ± DS	
	3,7 ± 2,7	8,0 ± 3,1	0,009

A la taula 11 es mostren els valors analitzats per citometria de flux (Materials i mètodes, apartat 8.1) i expressats en tant per cent, de les cèl·lules CD16⁺ que van ser CD69⁺, marcades amb FITC/PE respectivament, de quatre PBMCs activades o no amb IL-15 (10 ng/ml). A les quatre PBMCs es va observar un increment de l'expressió del CD69 quan les cèl·lules es van cultivar en presència d'IL-15, essent aquest augment estadísticament significatiu (p=0,009).

3.3.1.2 Expressió del receptor NKG2D

De la mateixa manera que es va analitzar l'expressió del CD69, es va procedir a analitzar l'expressió del receptor activador NKG2D (Figura 65).

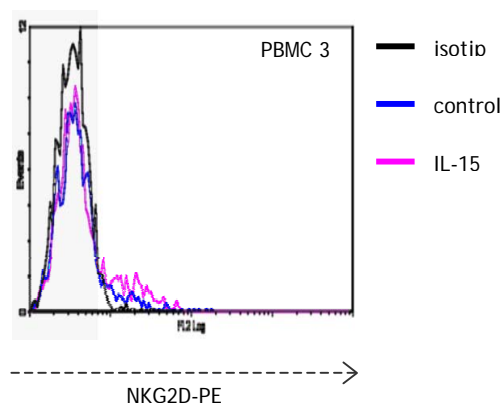


Figura 65. Expressió NKG2D-PE en població CD16⁺. PBMCs activades ± IL-15 (10 ng/ml) durant 24 hores. Imatge representativa PBMC 3.

Taula 12. Expressió del NKG2D en la població CD16⁺ activada ± IL-15.

	NKG2D ⁺ (%) en població CD16 ⁺		p
	CONTROL	IL-15	
	% (MFI)	% (MFI)	
PBMC 1	15,11 (1,67)	18,01 (1,73)	
PBMC 2	9,58 (1,39)	10,67 (1,49)	
PBMC 3	7,6 (1,41)	11,29 (1,78)	
PBMC 4	13,4 (1,32)	17,46 (11,7)	
	promig ± DS	promig ± DS	
	11,4 ± 3,4 (1,4 ± 0,1)	14,3 ± 3,9 (1,6 ± 0,1)	0,02

L'activació amb IL-15 (10 ng/ml) de la població cel·lular CD16⁺ durant 24 hores va provocar un augment discret però estadísticament significatiu (p=0,02) de l'expressió d'aquest receptor a les 4 PBMCs que es van analitzar per citometria de flux amb els fluorocroms CD16/FITC i NKG2D/PE (Taula 12).

3.3.2 POBLACIÓ CEL·LULAR “CÈL·LULES NK PURIFICADES”

Com s’ha comentat a la introducció, sembla ser que perquè els receptors activadors com el CD16 provoquin la desgranulació i desencadenin la citotoxicitat, és necessari l’existència d’una senyal d’adhesió/polarització, donada pel receptor LFA-1, a la cèl·lula diana [198]. Segons aquesta informació, es va voler valorar l’efecte de la IL-15 sobre aquests dos receptors. Degut a que el receptor LFA-1 és un receptor que es troba a tots els leucòcits, pel seu anàlisi es va utilitzar cèl·lules NK purificades. Prèviament al cultiu, es va procedir a purificar cèl·lules NK, per selecció negativa a partir de PBMCs (Materials i mètodes, apartat 3), que posteriorment van ser cultivades durant 24 hores en presència o absència d’IL-15 (10 ng/ml).

3.3.2.1 Efecte de la IL-15 en l’apoptosi espontània

Un dels objectius va ser analitzar l’apoptosi espontània de cèl·lules NK en absència d’estímuls externs i comparar-la amb els valors d’apoptosi obtinguts d’aquestes mateixes cèl·lules cultivades amb IL-15. Per tant, es van realitzar cultius de cèl·lules NK en medi complet i cultius en medi complet més IL-15 a una concentració de 10 ng/ml. Després de 24 hores de cultiu es va determinar el percentatge de cèl·lules apoptòtiques per citometria de flux (Materials i mètodes, apartat 8.2).

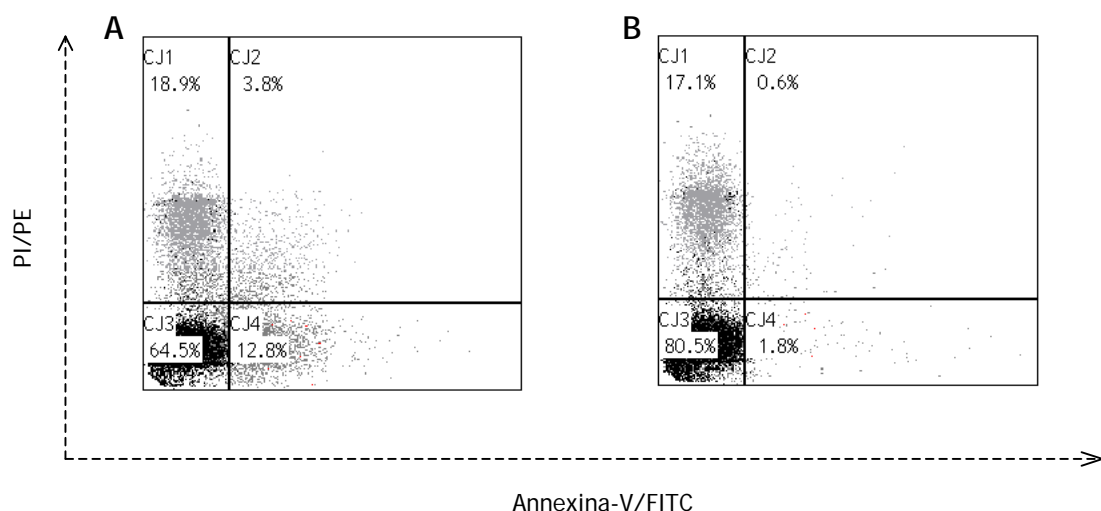


Figura 66. Percentatge d’apoptosi de cèl·lules NK purificades \pm activades amb IL-15.

Cèl·lules NK purificades cultivades amb (A) medi de cultiu complet, (B) IL-15 (10 ng/ml) durant 24 hores. Després de 24 hores de cultiu es van marcar amb Annexina-V i amb iodur de propidi (PI). S’indica el percentatge de cèl·lules NK positives per Annexina-V/FITC i PI/PE. Aquests valors són d’un donant i representatius de 3 experiments independents.

A les 24 hores, s'observà que el percentatge de cèl·lules apoptòtiques era superior als cultius cel·lulars en medi complet que les que havien estat en presència d'IL-15 (Figura 66). Això suggereix, que aquesta citocina a més d'activar i potenciar la capacitat citotòxica, revertirà l'apoptosi espontània que es dona en cèl·lules en cultiu, afavorint la supervivència de les cèl·lules NK.

3.3.2.2 Expressió del receptor LFA-1

Per continuar analitzant el paper de la IL-15 a l'expressió de receptors activadors, es va realitzar el mateix experiment descrit a l'apartat anterior, per valorar com s'afectava l'expressió del receptor CD16 (responsable de l'ADCC via cèl·lules NK) i l'expressió del receptor LFA-1 (receptor heterodimèric integrat per l'associació de CD11a i de CD18 que estableix un lligam d'unió crític entre les cèl·lules NK i les cèl·lules diana) (Figura 67).

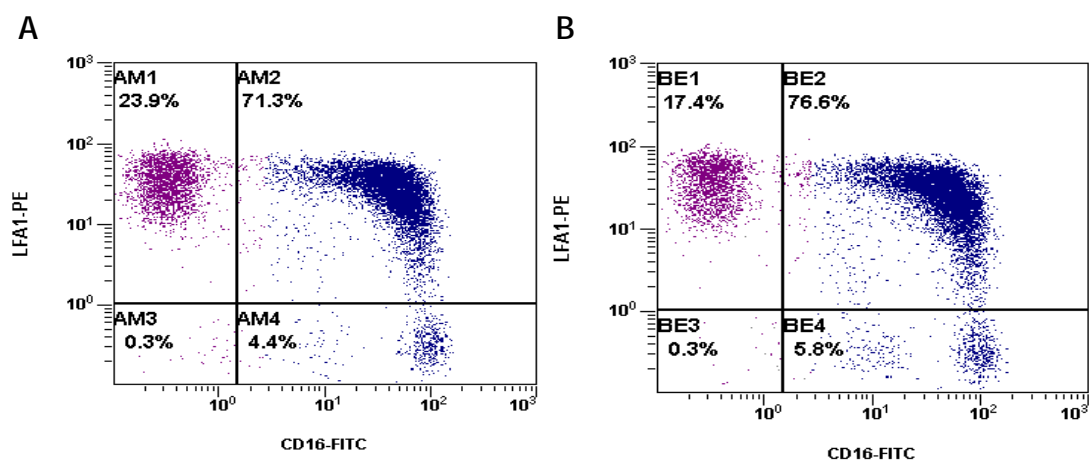


Figura 67. Percentatge d'expressió CD16/LFA-1 en cèl·lules NK purificades ± activades amb IL-15.

Cèl·lules NK purificades cultivades amb (A) medi de cultiu complet, (B) IL-15 (10 ng/ml) durant 24 hores. Després de 24 hores de cultiu es van marcar amb CD16-FITC i amb LFA-1-PE. Aquests valors són d'un donant i representatius de 4 experiments independents.

Vàrem observar, que a les 24 hores d'activació amb la IL-15, les cèl·lules NK incrementàvem el percentatge total de molècules CD16⁺ (P=0,02) (Taula 13), mentre que el percentatge de molècules LFA-1⁺ no es va modificar pràcticament. No obstant, a l'incidir en la població LFA-1⁺, vàrem observar que el percentatge de la població LFA-1⁺/CD16⁻ disminuïa (Taula 15) a la vegada que s'incrementava el percentatge (p=0,05) i

la MFI ($p=0,04$) de la població LFA-1⁺/CD16⁺ (Taula 14). La població CD16⁺ augmentava a partir tant de la població LFA-1⁺ com de la població LFA-1⁻. No obstant, l'increment de la població CD16⁺/LFA-1⁻ no va mostrar tenir significança estadística. Aquest resultat ens va fer sospitar que la IL-15 incrementava la citotoxicitat natural i l'ADCC possiblement afavorint per una banda, l'augment del nombre de molècules CD16⁺ implicades directament en la unió a la porció Fc del rituximab, i per altre banda per l'augment de la coexpressió dels receptors CD16⁺/LFA-1⁺.

Taula 13. Expressió de CD16 en cèl·lules NK purificades activades ± IL-15.

	CD16 ⁺		p
	CONTROL	IL-15	
	% (MFI)	% (MFI)	
NK 1	75,5 (48,1)	82,2 (49,6)	
NK 2	70,2 (53,5)	74,6 (56,2)	
NK 3	66,9 (26,6)	70,8 (27,4)	
	promig ± DS	promig ± DS	
	70,9 ± 4,3 (42,7 ± 14,2)	75,8 ± 5,7 (44,4 ± 15)	0,02 (0,09)

Taula 14. Expressió de LFA-1 en la població CD16⁺ activada ± IL-15.

	CD16 ⁺ / LFA-1 ⁺		p
	CONTROL	IL-15	
	% (MFI)	% (MFI)	
NK 1	71,83 (28,9)	72,61 (31,5)	
NK 2	65,37 (50,4)	69,17 (52,8)	
NK 3	71,31 (45,8)	76,62 (47,3)	
NK 4	58,22 (40,1)	60,34 (40,5)	
	promig ± DS	promig ± DS	
	66,6 ± 6,3 (41,3 ± 9,2)	69,6 ± 6,9 (43 ± 9,1)	0,05 (0,04)

Taula 15. Expressió de LFA-1 en la població CD16⁻ activada ± IL-15.

	CD16 ⁻ / LFA-1 ⁺		
	CONTROL	IL-15	
	% (MFI)	% (MFI)	
NK 1	16,56 (30,7)	15,37 (31,0)	
NK 2	29,36 (47,0)	24,92 (48,3)	
NK 3	23,91 (37,5)	17,47 (40,5)	
NK 4	32,05 (26,5)	33,86 (30,8)	
	promig ± DS	promig ± DS	p
	25,4 ± 6,8 (35,4 ± 8,9)	22,9 ± 8,3 (37,6 ± 8,4)	0,2 (0,08)

3.5 INFLUÈNCIA DEL POLIMORFISME DEL RECEPTOR FcγRIIIA

Prèviament s'ha descrit que, tant la citotoxicitat natural com l'ADCC, es veuen influenciades tant per la capacitat que tenen les cèl·lules efectores d'activar-se com per la sensibilitat que presenten les cèl·lules leucèmiques a la lisi. D'observar que les diferents PBMCs lisen de diferent manera les mateixes cèl·lules tumorals, el nostre següent pas fou analitzar si el polimorfisme del receptor FcγRIIIa tenia alguna implicació. Es va realitzar el genotipatge de les 10 PBMCs utilitzades en els diferents assajos de citotoxicitat on s'havien utilitzat LLCs com a cèl·lules diana. Es va trobar que d'aquestes 10 PBMCs, 5 van ser homozigotes per la fenilalanina i 5 heterozigotes. Malgrat no haver cap PBMC homozigota per la valina es va prosseguir l'estudi, analitzant possibles diferències entre aquests dos grups.

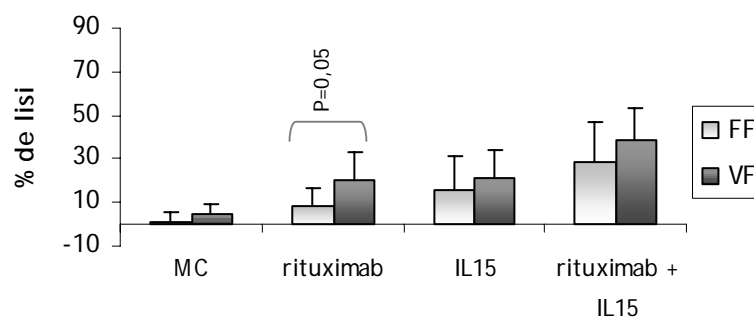


Figura 68. Correlació del polimorfisme FcγRIIIa-158V/F amb el percentatge de lisi resultant als assajos de citotoxicitat amb LLCs.

El genotipatge del polimorfisme es va realitzar a partir del DNA de 10 PBMCs. Anàlisi de la relació de la citotoxicitat natural i de l'ADCC amb PBMCs sense estimular i estimulades amb IL-15, amb cadascú dels genotips (F/F i V/F). Aquests valors són la mitjana ± DS de 7 experiments independents (F/F) i 9 experiments independents (V/F).

Tal com s'observa a la Figura 68, existeix una lleu diferència al percentatge de lisi entre els donants FF i els VF. Les PBMCs FF tendeixen a presentar una menor capacitat citotòxica que les PBMCs VF, no obstant aquesta diferència únicament va ser estadísticament significativa ($p=0,05$) als assajos d'ADCC on les PBMCs no van estar activades amb IL-15.

DISCUSSIÓ

La citotoxicitat cel·lular depenent d'anticossos (ADCC) s'ha definit, en el camp de l'oncologia, com un dels principals mecanismes d'acció en l'eradicació de cèl·lules tumorals. Dintre dels mecanismes d'acció *in vivo* del rituximab, l'ADCC juga un paper molt important amb la unió del seu fragment Fc als receptors Fc γ presents a les cèl·lules efectores (monòcits/macròfags i cèl·lules NK) [98, 115, 116, 274]. Estudis realitzats *in vitro* amb línies cel·lulars de limfoma humà, han demostrat que aquest anticòs monoclonal indueix ADCC. Tant *in vitro* com *in vivo*, s'ha observat la importància de l'expressió d'aquests receptors en el mecanisme d'acció del rituximab. Com en altres sistemes de regulació, els receptors Fc inclouen receptors activadors i inhibidors. En estudis *in vivo* amb ratolins genoanul·lats del receptor activador FC γ RIII (CD16), el rituximab va ser incapaç d'evitar el creixement tumoral [98], de la mateixa manera que va ocórrer amb la utilització d'anticossos neutralitzants vers un Fc γ R murí [275]. Contràriament, l'efecte del rituximab es va potenciar en els ratolins deficients del receptor inhibidor Fc γ RIIb (CD32) [98]. A més a més, la resposta antitumoral dels anticossos també es veu afectada pels diferents productes al·lèlics del gen polimòrfic del receptor Fc, ja que mostren habilitats diferents d'unir-se a les subclasses de les IgGs i donar lloc a l'ADCC. Així s'ha observat que l'al·lel valina (158^{val}) del receptor FC γ RIIIa té major afinitat d'unió per la IgG1 i la IgG3 que l'al·lel fenilalanina (158^{phe}), intervenint més eficaçment en l'ADCC. S'ha publicat que el genotip V/V del receptor FC γ RIIIa prediu una millor resposta clínica al rituximab en pacients afectats de limfoma fol·licular tractats únicament amb rituximab [115, 116] o en combinació amb quimioteràpia que els genotips V/F i F/F [276]. Resultats que recolzen la hipòtesi de que l'ADCC és un dels principals mecanismes d'acció del rituximab.

Les cèl·lules NK han demostrat ser la població efectora de l'ADCC més important implicada en l'eficàcia terapèutica antitumoral dels anticossos monoclonals. Pacients amb càncer han mostrat tenir un nombre menor de cèl·lules NK circulants, a més de tenir compromesa l'ADCC [113]. Pacients diagnosticats de LNH, una hora després de la infusió de 375 mg/m² de rituximab, incrementaven el nombre de cèl·lules NK en fase de desgranulació (CD107a⁺) [277]. Per tant, l'estimulació de cèl·lules NK efectores, portadores del receptor FC γ RIIIa, podria comportar una millor resposta clínica al rituximab. Amb aquesta finalitat vàrem analitzar la capacitat de dues molècules estimuladores de les cèl·lules NK, com són la IL-15 i el CpG ODN A, potenciant l'ADCC donada pel rituximab contra cèl·lules de limfoma B.

1. Implicació de la IL-15 potenciant el mecanisme d'acció del Rituximab

Tant la IL-2 com la IL-15 són citocines que comparteixen funcions, ja que la cadena γ_c i β són comuns, i així activen la proliferació i capacitat citotòxica natural de les cèl·lules NK [223, 278]. La IL-2 ha estat utilitzada en la immunoteràpia contra el càncer associada al rituximab mostrant un augment de l'ADCC en els LNH [272, 279, 280]. Però, tenint en compte la similitud funcional de la IL-15 amb la IL-2 i coneixent que la IL-15 és 6 vegades menys tòxica que la IL-2, ja que el seu índex terapèutic és 2-3 vegades major que el de la IL-2 [281], la IL-15 apunta com un millor agent terapèutic a utilitzar en la immunoteràpia tumoral.

Valorant aquesta informació, va ser de gran interès demostrar als nostres estudis *in vitro* que PBMCs estimulades amb IL-15 potenciaven tant la citotoxicitat natural com l'ADCC donada pel rituximab, quan s'enfrontaven a cèl·lules B d'una línia cel·lular (Resultats Fig. 32). A més, es va trobar una relació directa dosi-resposta per part del rituximab potenciant l'ADCC amb concentracions de 0,1-10 $\mu\text{g/ml}$. Cal remarcar que les concentracions de rituximab mesurades en pacients que havien rebut una dosi estàndard de rituximab de 375 mg/m^2 , es trobaven dins d'aquest rang [57, 89]. Per sobre de 10 $\mu\text{g/ml}$ de rituximab no es van observar increments de l'ADCC, sent molt probable que per sobre d'aquesta concentració el sistema es saturi [120, 124, 272].

1.1 Capacitat citotòxica de la cèl·lula NK enfrontada a una línia cel·lular de Limfoma B

Un gran nombre d'observacions clíniques i experimentals han derivat en la demostració d'una associació entre alteracions en l'activitat de les cèl·lules NK i una progressió tumoral, suggerint que un defecte en aquesta població efectora podria desencadenar defectes immunitaris en una àmplia varietat de càncers [282-286]. En models murins, s'ha observat que la presència de tumors bloqueja la maduració final en medul·la òssia de cèl·lules NK [287]. El potencial paper que jugaria la IL-15 en la immunoteràpia vindria donat per l'efecte directe exercit sobre les cèl·lules NK ja que constitutivament expressen el seu receptor. Diferents estudis han demostrat que aquesta citocina actua promovent el desenvolupament de cèl·lules NK a partir dels seus precursors, proporcionant senyals necessàries per la maduració de les cèl·lules NK i activant la citotoxicitat del subgrup CD56^{dim} ($\text{CD16}^{\text{+++}}$) [227, 237, 288-290]. Així, el ratolí deficient d'IL-15 mostra una disminució dràstica del nombre de cèl·lules NK [241]. A

nivell tumoral, és una citocina que promou més l'acumulació de cèl·lules NK als teixits tumorals quan es compara amb la IL-2 [291]. Una sobreexpressió d'aquesta citocina en models murins és capaç d'induir la maduració de cèl·lules NK bloquejada pels tumors; bloqueig degut possiblement en part a factors anormals presents a medul·la òssia, com seria el cas d'una regulació a la baixa de cèl·lules de l'estroma IL-15R α^+ [287]. A més, aquesta sobreexpressió confereix resistència als ratolins front als tumors [292]. Segons aquesta informació, possiblement la IL-15 a nivell tumoral actuaria desbloquejant la maduració de cèl·lules NK i incrementant el nombre d'aquestes cèl·lules; potenciant paral·lelament l'ADCC per l'efecte directe sobre aquest tipus cel·lular. Ja s'havia suggerit el paper de les cèl·lules NK CD56 $^+$ /CD16 $^+$ com les responsables de l'activitat lítica contra cèl·lules de limfoma, afegint que tant els monòcits com els granulòcits contribuïen mínimament [279].

Per valorar la implicació de les cèl·lules NK estimulades amb IL-15 en la potenciació, tant de la citotoxicitat natural com de l'ADCC donada pel rituximab, es va comparar la seva capacitat citotòxica amb les PBMCs del mateix donant. El nombre de cèl·lules NK utilitzades va ser l'equivalent al de cèl·lules CD16 $^+$ presents a les PBMCs. La IL-15, tal com es va observar a les PBMCs, va potenciar directament la citotoxicitat natural i l'ADCC donada pel rituximab de les cèl·lules NK purificades (Resultats Fig. 36-37). Sorprenentment, en ambdues situacions, l'augment observat per les PBMCs va ser superior que l'observat per les cèl·lules NK purificades. Aquesta diferència en la capacitat citotòxica, va fer que la població efectora que restava una vegada s'havien purificat les cèl·lules NK també fos estimulada amb IL-15 i analitzada citotòxicament. El resultat va ser conclouent; aquesta població restant no presentava capacitat citotòxica ni a nivell basal ni després de l'activació amb IL-15 (Resultats Fig. 38). Per tant, la població cel·lular responsable de la resposta citotòxica, front cèl·lules B tumorals, van ser les cèl·lules NK. Possiblement la major capacitat citotòxica de les cèl·lules NK quan es troben incloses a l'ambient de les PBMCs es derivi de que, en aquest context, les cèl·lules NK rebrien un primer estímul per l'efecte directe de la IL-15 sobre aquesta cèl·lula, i un segon estímul podria venir donat per l'efecte de la IL-15 sobre altres cèl·lules efectores presents a les PBMCs (com per exemple monòcits). Com a conseqüència de l'acció de la IL-15 sobre altres cèl·lules efectores, aquestes últimes produïrien citocines que a la vegada activarien les cèl·lules NK potenciant la seva capacitat citotòxica. De fet, vam observar que les PBMCs activades amb IL-15 en presència de cèl·lules Raji cocultivades amb rituximab, produïen molta més quantitat d'IFN- γ que les cèl·lules NK purificades en les mateixes condicions, fet que recolzaria la

possible presència de més d'una diana cel·lular per l'estímul activador a les PBMCs (Resultats Fig. 41). A més, estudis recents han suggerit que les DCs tenen l'habilitat d'activar les cèl·lules NK a través del contacte cel·lular. L'expressió del receptor IL-15R α a les DCs és crític en aquesta activació, fent probable que a nivell fisiològic la transpresentació de la IL-15 per les DCs activi les cèl·lules NK. No obstant, perquè les cèl·lules NK produeixin una gran quantitat d'IFN- γ es requereix tant de la presència del IL-15R α a les DCs com de la IL-12, mentre que l'activitat citolítica depèn només del IL-15R α i és independent de la IL-12 [223, 293]. El potencial d'aquesta citocina també es constata en el fet que l'activació cel·lular es va donar en un període breu de temps (20 hores) contràriament a altres estudis fets prèviament per altres autors amb la IL-2 on els cultius van ser a 48 hores [279].

1.2 Paper de la cèl·lula activada enfrontada a cèl·lules leucèmiques (LLC-B)

La IL-15 ve ser capaç de potenciar la capacitat citotòxica natural i l'ADCC donada pel rituximab de PBMCs quan s'enfrontaven a cèl·lules tumorals de la línia cel·lular Raji. Però, el nostre següent objectiu era aconseguir els mateixos efectes en cèl·lules leucèmiques de pacients diagnosticats de LLC-B. Aquests pacients tenen una pobre resposta a la teràpia amb rituximab comparativament a altres limfomes de cèl·lules B. Entre les possibles explicacions hi trobem la baixa expressió de CD20 a les cèl·lules leucèmiques i l'existència de CD20 circulant. El CD20 s'expressa en moltes cèl·lules B de limfomes a una densitat de 100000 molècules per cèl·lula, però a la LLC s'expressa a una densitat de 10000 molècules per cèl·lula [294, 295]. Així, poder potenciar l'efecte biològic del rituximab sobre aquestes cèl·lules leucèmiques era de gran importància. La citotoxicitat basal que reflexaven les PBMCs en presència de cèl·lules leucèmiques de LLC-B era 5 vegades menor que la trobada en presència de cèl·lules Raji, indicant que realment les cèl·lules leucèmiques de LLC-B eren molt menys sensibles a la lisi cel·lular. No obstant, l'activació amb IL-15 feia que s'incrementés el percentatge de lisi resultant, a nivell basal i més important en presència de rituximab. L'anàlisi de l'enfrontament d'un nombre de 10 LLCs amb 10 PBMCs activades amb IL-15 va confirmar els resultats anteriors (Resultats Fig. 50). Aquesta citocina era capaç de potenciar les cèl·lules NK suficientment com per incrementar tant la citotoxicitat natural com l'ADCC donada pel rituximab quan les cèl·lules diana eren cèl·lules tumorals leucèmiques de pacients amb LLC-B, però amb una gran variabilitat entre els diferents experiments. Aquesta variabilitat, entre els

percentatges de lisi trobats en els diferents assajos citotòxics, era conseqüència de la sensibilitat i/o resistència de la cèl·lula leucèmica a la lisi i a la capacitat que tenen les cèl·lules NK segons el donant per activar-se amb la IL-15. Així, l'enfrontament d'una mateixa PBMC, activada o no amb IL-15, a diferents LLCs va concloure amb resultats que indicaven que en funció de la sensibilitat a la lisi de la cèl·lula tumoral, les mateixes cèl·lules efectores induïen més o menys mortalitat de cèl·lules leucèmiques (Resultats Fig. 51). La situació inversa, és a dir, quan la mateixa LLC-B era enfrontada a diferents PBMCs, va reflexar que les cèl·lules efectores dels diferents pacients manifesten diferents graus d'activació (capacitat citotòxica) amb la mateixa dosi d'IL-15 (Resultats Fig. 52). Però, independentment de la primera variable, és a dir, de la sensibilitat de la cèl·lula leucèmica, la IL-15 va demostrar exercir una activitat estimuladora sobre les cèl·lules NK suficientment potent com per incrementar l'efecte antitumoral del rituximab en el 90% de les LLCs estudiades (9 LLC-B amb resposta vs 1 LLC-B sense resposta).

1.3 Canvis en l'expressió de receptors presents a les cèl·lules NK en presència d'IL-15

Les cèl·lules NK purificades activades amb IL-15 també van patir canvis a nivell de l'expressió d'un receptor implicat en l'adhesió cel·lular com és l'LFA-1. La presència d'un augment en el percentatge de cèl·lules NK que són CD16⁺/LFA-1⁺ fa pensar que aquesta citocina també prepararia a la cèl·lula NK per realitzar una bona execució funcional (Resultats Fig. 67). L'LFA-1 és un receptor heterodimèric format per l'associació del CD11a (cadena α_L de les integrines) i del CD18 (cadena β_2 de les integrines) que s'expressa a tots els leucòcits [296]. Les cèl·lules NK, una vegada s'han trobat amb la cèl·lula diana, pateixen canvis moleculars que condueixen a l'adhesió, polarització de grànuls, desgranulació i producció de citocines [195]. Les dades suggereixen que la interacció LFA-1/ICAM-1,2 pot proporcionar senyals autònomes per l'adhesió de cèl·lules NK en repòs [196]; i que l'adhesió s'acompanya de la polarització del citoesquelet d'actina, aparell de Golgi i dels microtúbuls cap a la interfase de la cèl·lula diana (Sinapsi NK). Però, malgrat l'LFA-1 s'ha implicat en la senyalització de la citotoxicitat, aquesta interacció LFA-1/ICAM-1,2 no és suficient per la desgranulació, contràriament a la desgranulació que es produeix amb la lligació del CD16 per anticossos, com s'ha vist en estudis realitzats en cèl·lules d'insecte [199]. No obstant s'ha descrit que un bloqueig de l'LFA-1 per anticossos inhibeix la citotoxicitat de cèl·lules NK [297, 298] i per altre banda cèl·lules NK que provenen de ratolins deficients

en aquest receptor perden la capacitat de matar cèl·lules diana [188, 299]. El conjunt d'aquestes observacions ens indicaria que les senyals que regulen la polarització de grànuls a les cèl·lules NK estan encara per definir amb claredat. El que semblaria és que l'LFA-1 estaria jugant un paper a tenir en compte en el mecanisme efector citotòxic; i la IL-15 augmentant el percentatge de cèl·lules LFA-1⁺ dintre de la població CD16⁺, incrementaria el nombre de cèl·lules NK preparades per: (a) contactar de manera estable amb la cèl·lula efectora i donar lloc a la formació d'una sinapsi immunològica, i (b) polaritzar els grànuls citotòxics i donar lloc a la desgranulació.

Un altre fet important a valorar en aquest context és que el grau de resposta de les cèl·lules NK, com per exemple la citotoxicitat i la producció d'IFN- γ , queda determinat per la quantitat de receptors activadors i inhibidors presents en les cèl·lules NK, la quantitat de lligands presents en les cèl·lules diana, així com les diferències qualitatives en les senyals transduïdes [300]. La majoria de cèl·lules NK en fase de desgranulació expressen el fenotip activador CD56^{dim}, CD69⁺, NKG2D⁺, NKp30⁻, NKp46⁻ i CD94⁻ [277]. En presència d'IL-15 es va veure incrementat tant el percentatge d'expressió del receptor CD16 (Resultats Taula 13), la presència del qual anteriorment s'havia correlacionat amb la capacitat que exhibien les cèl·lules NK matant cèl·lules en reaccions d'ADCC [113], com el percentatge de cèl·lules NKG2D⁺ en la població CD16⁺ (Resultats Taula 12). Senyals activadores procedents del receptor activador NKG2D, expressat de forma ubiqua a les cèl·lules NK i a les etapes primerenques del desenvolupament d'aquestes cèl·lules [301, 302], poden induir la mort de cèl·lules canceroses, tant *in vitro* com *in vivo*, al desencadenar el mecanisme de citotoxicitat cel·lular i en alguns casos la inducció de secreció de citocines i quimiocines. Un dels estímuls inductors de l'expressió de lligands del NKG2D és la tumorigènesi, on l'estrès genotòxic present als tumors indueix l'expressió de tots els lligands del NKG2D que s'han examinat [303]. Quan s'estimulen les cèl·lules NK de sang perifèrica amb lligands solubles recombinants del NKG2D es provoca una activació de les vies de senyalització PI3K i AKT, però també una fosforilació de JAK2, STAT5, ERK1/2 i MEK1/2 [304]. La IL-15, incrementant aquest receptor, possiblement a part d'augmentar directament la capacitat lítica de la cèl·lula, la prepara per tenir un nombre més alt de punts d'unió a lligands anomenats d'estrès cel·lular expressats en un alt nivell als tumors, com són MIC-A, MIC-B, ULBPs, etc. Per exemple, els lligands ULBPs es troben expressats en diferents tumors inclosos neuroblastomes [305], gliomes malignes [306], leucèmies [307] i carcinomes ovàrics [308], observant-se correlacions entre la seva expressió i un millor pronòstic [307, 308]. S'ha de fer èmfasi en el fet que aquest receptor activador és

excepcional, per tenir una gran varietat de lligands, a diferència de la resta de receptors activadors que normalment tenen 1 o com a màxim 2 lligands. La importància d'aquest receptor ve donada per aquesta diversitat de lligands, que poden estar expressats en cèl·lules tumorals, ja que dificulta al tumor que es pugui evadir d'una resposta immunològica donada pel NKG2D [309]. S'han observat tumors que es poden evadir de la resposta donada pel NKG2D modulant a la baixa aquest receptor [185]. Així, la IL-15 està afectant directament dos receptors afavoridors de la citotoxicitat, incrementant d'aquesta manera el potencial citotòxic de les cèl·lules NK, ja que: (1) és una citocina requerida pel desenvolupament de la resposta citotòxica induïda pel receptor NKG2D com a conseqüència d'un acoblament de les senyalitzacions d'ambdós receptors [310], i és capaç de potenciar la resposta immune dirigida contra tumors que expressen lligands del NKG2D [185]; i (2) provoca un augment significatiu d'aquest receptor en la població CD16⁺. En consonància amb el fenotip activador de cèl·lules NK en desgranulació, la IL-15 també va afectar a l'alça l'expressió del receptor activador CD69 en cèl·lules NK CD16⁺ (Resultats Taula 11). Per tant, aquesta citocina potenciarà l'ADCC donada pel rituximab contra cèl·lules leucèmiques per la suma de diferents factors. En resum, és important l'efecte directe que fa la IL-15 sobre cèl·lules efectores i no menys important és el paper que fa sobre els receptors. Afavoreix l'expressió en cèl·lules NK del receptor CD16, i dintre de la subpoblació CD16⁺ l'expressió del receptor LFA-1 implicat en fases inicials de contacte i adhesió cel·lular, a més d'afavorir l'expressió de receptors lligats directament al fenotip desgranulador CD69⁺ i NKG2D⁺.

1.4 Implicació de la presència d'una citocina immunosupressora, com és el TGF- β

Un altre qüestió a tenir en compte en els pacients amb càncer és que normalment estan immunodeprimits, fenomen parcialment relacionat amb un augment en la producció de certs factors solubles immunosupressors com són el TGF- β i la IL-10. El TGF- β va ser la primera citocina identificada al sobrenedant d'un cultiu cel·lular i funcionalment inhibeix la resposta inflamatòria de cèl·lules T i la immunitat cel·lular, necessàries per controlar el creixement tumoral. La IL-10 produïda en diferents teixits tumorals (melanoma, carcinoma ovàric i limfoma B) disminueix el desenvolupament i l'activitat tant de les DCs com d'altres cèl·lules del sistema immunològic [1]. Concentracions elevades d'aquests mediadors a sang perifèrica de pacients amb càncer, alteren la funcionalitat de les cèl·lules NK, disminuint la seva capacitat citotòxica i la producció d'IFN- γ [113]. Efectivament, la presència de TGF- β va fer que la capacitat

citotòxica de les PBMCs quan s'enfrontaven a cèl·lules leucèmiques de LLCs *in vitro* es veíes afectada, observant-se una disminució significativa tant de la citotoxicitat natural com de l'ADCC donada pel rituximab. Però, l'activació cel·lular de PBMCs produïda per la IL-15 va contrarestar l'efecte negatiu del TGF- β en la capacitat citotòxica (Resultats Fig. 56). Quan als cultius en presència de TGF- β s'afegia IL-15, es continuava potenciant significativament l'ADCC donada pel rituximab (Resultats Fig. 58). D'acord amb el que s'havia postulat [311], aquests resultats tenen una transcendència en el camp de la immunoteràpia. L'efecte de la IL-15 a nivell de la citotoxicitat natural i sobretot de l'ADCC donada pel rituximab es va veure mínimament afectat pel TGF- β . En presència d'IL-15 es va percebre una molt lleu davallada de la capacitat citotòxica que no té cap significança estadística.

Va ser important conèixer que l'activació cel·lular produïda per la IL-15 en presència de TGF- β , no va afectar la potenciació de la citotoxicitat natural ni de l'ADCC front cèl·lules leucèmiques de LLC-B. Els tumors que, tant per part de les cèl·lules tumorals com de les cèl·lules de l'estroma, produeixen grans quantitats de TGF- β , no només progressen si no que permeten al tumor evadir-se del sistema de vigilància immunitària [312-314]. En aquesta vigilància tumoral, com s'ha mencionat anteriorment, s'ha de fer èmfasi en el paper que juga el receptor NKG2D, ja que el dany al DNA de les cèl·lules tumorals ajuda a la inducció de lligands del NKG2D i augmenta la sensibilitat de les cèl·lules lesionades a ser destruïdes per cèl·lules NK o cèl·lules T, possiblement imposant una barrera immune front la tumorigènesi [315, 316]. Un increment dels nivells de TGF- β en sèrum o l'alliberació per cèl·lules tumorals de lligands del NKG2D a sèrum s'ha relacionat en una regulació a la baixa del receptor NKG2D. A la vegada, una expressió disminuïda del receptor NKG2D en cèl·lules NK, d'una fracció de pacients amb carcinoma de còlon i pròstata, s'ha traduït en factor de mal pronòstic [317, 318]. Per tant, semblaria que el TGF- β estaria disminuint aquest receptor com un mecanisme d'evasió tumoral. A més, el TGF- β és una citocina que té efectes negatius en l'expressió de la cadena β del receptor de la IL-15 i aquest fet s'havia traduït en una afectació de la proliferació de cèl·lules T CD8⁺ induïda per la IL-15 [319].

1.5 Canvis en la síntesi de citocines i quimiocines en presència d'IL-15 i TGF- β

L'activitat invasiva dels tumors fomenta un ambient inflamatori que potencia respostes immunes antitumorals on estan implicades tant la resposta innata (cèl·lules NK, polimorfonuclears, monòcits) com la resposta adaptativa (cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺) del sistema immunològic. Posteriorment a l'activació de les cèl·lules NK, aquestes cèl·lules secreten citocines i quimiocines que poden afectar directament la supervivència dels patògens (per exemple IFN- γ), el creixement i disseminació dels tumors (per exemple, IFN- γ i TNF), la regulació de la diferenciació de cèl·lules hematopoètiques, i la posada a punt d'efectors immunes que són crucials per la subsegüent resposta immune adaptativa. Per tant, les cèl·lules NK juguen un paper primordial al sistema dinàmic que es crea als microambients immunològics, on es donen múltiples interaccions i es porta a terme la resposta immune. L'IFN- γ , proteïna homodimèrica, produïda per les cèl·lules NK, és la principal citocina activadora dels macròfags. Actua sobre les cèl·lules T naïf, generant una resposta Th1 i activant CTLs. A més, activa neutròfils i té certa capacitat d'estimular l'activitat citolítica dels limfòcits NK [1, 204]. Fins i tot, pot incrementar l'expressió de receptors Fc activadors en cèl·lules del sistema immune innat [186]. Al nostre estudi la producció d'IFN- γ va seguir un comportament paral·lel a la funció citotòxica. La IL-15, com va ocórrer a nivell citotòxic, va incrementar la producció d'IFN- γ de manera significativa; i la presència de TGF- β també va modificar a la baixa la producció d'IFN- γ en PBMCs activades amb IL-15 i sense activar, encara que aquest descens només va ser significatiu quan les PBMCs no estaven activades amb IL-15. Així, la capacitat activadora d'aquesta citocina va contrarestar en gran mesura l'efecte supressor del TGF- β (Resultats Fig. 59). L'afectació mínima que provoca el TGF- β en presència d'IL-15 en la síntesi d'IFN- γ , té un pes important en la vigilància immunitària ja que l'IFN- γ , produït per les cèl·lules NK, T $\gamma\delta$ o T CD8 activades, es considera una molècula clau en aquest punt. Les cèl·lules NK són les principals cèl·lules efectores en la resposta innata contra infeccions virals i tumors, de la mateixa manera que en la resposta adaptativa ho són els limfòcits T citotòxics, que es generen després d'una estimulació antigènica. L'IFN- γ potencia directament l'immunogenicitat de les cèl·lules tumorals i estimula la resposta immune contra cèl·lules transformades [320, 321]. S'ha observat que els ratolins deficients en IFN- γ , en el seu receptor o en components de la seva cascada de senyalització, com seria el cas de STAT1, tenen una incidència molt més alta de tumors que els ratolins normals [1]. En consonància amb això, un possible mecanisme d'evasió de la resposta

immune innata per part dels tumors podria ser el bloqueig que provoquen de la maduració de les cèl·lules NK en medul·la òssia, ja que indirectament es disminuiria la producció d'IFN- γ [287]. Amb aquestes dades no es pot posar en dubte la importància de l'IFN- γ en la immunovigilància tumoral, pel seu paper tant en la immunitat innata com en l'adaptativa. No obstant, la seva neutralització als cultius cel·lulars va afectar lleugerament la capacitat citotòxica de les PBMCs, del que es dedueix que encara que té un efecte directe activador sobre les cèl·lules NK, la rellevància d'aquesta citocina a les PBMCs va més enllà del paper que exerceix sobre la capacitat citotòxica d'aquestes cèl·lules.

La producció de citocines activadores i supressores, així com de quimiocines que actuen com a factors quimioattractants, sabem que és un procés regulat i ben orquestrat on s'entrecreuen diferents components del sistema immune innat i adaptatiu. La literatura ha descrit una sèrie de citocines i quimiocines que poden estar sintetitzades per les cèl·lules NK com a conseqüència de la seva activació [322]. D'acord amb observacions fetes per altres autors, la implicació directe de les cèl·lules NK en l'activitat d'algunes malalties inflamatòries, vindria donada per una correlació directe en la producció de citocines per aquestes cèl·lules [186]. Hem pogut constatar com la IL-15 principalment per una activació directa i indirecta de les cèl·lules NK, potencia la citotoxicitat cel·lular així com la producció d'IFN- γ a les 24 hores de la seva administració, i com la presència del TGF- β ho modifica. En aquest context vàrem quantificar algunes d'aquestes citocines i quimiocines descrites a la literatura, per analitzar una possible relació entre els fets detallats anteriorment i la seva presència (Resultats Fig. 63). El TNF- α , la IL-10, el MIP-1 α i el MIP-1 β estaven presents a les 24 hores de cultiu, a diferència de la IL-5 i la IL-13. Només es va observar una inducció moderada de TNF- α en presència d'IL-15. Amb aquests resultats podríem dir que la resposta cel·lular a curt terme fruit de la presència d'IL-15 és especialment conseqüència de la producció d'IFN- γ amb contribució menor del TNF- α . Per altre banda, la influència del TGF- β com a citocina inhibidora de la proliferació i de funcions efectores cel·lulars es va traduir en menor presència de TNF- α i IL-10 als cultius cel·lulars. Segurament, són necessaris cultius a llarg terme per poder valorar modificacions més significatives en aquest microambient, de citocines i quimiocines, alterat per la presència d'IL-15 i TGF- β [237].

1.6 Consideracions a tenir en compte vers la IL-2

Un grup cel·lular de gran rellevància per la seva implicació directe en promoure la tumorigènesi són les cèl·lules TregCD4⁺CD25⁺ [323]. Ha estat de gran interès observar com l'eliminació d'aquestes cèl·lules provoca una potenciació de la immunitat antitumoral [324-326]. En aquest sentit el TGF- β produït per les cèl·lules tumorals també s'ha vist que indueix la diferenciació d'aquestes cèl·lules Treg. Pacients portadors de tumors presenten un augment de cèl·lules Treg Foxp3⁺ a sang perifèrica [327], nivells que disminueixen després del tractament [328]. Anteriorment s'ha mencionat que el receptor funcional, tant de la IL-2 com de la IL-15, consta d'una cadena α que defineix l'especificitat d'unió i unes cadenes β i γ_c compartides per on aquestes citocines comparteixen les activitats biològiques. La IL-2 ha estat provada com a tractament en la immunoteràpia tumoral amb respostes que no han arribat a les expectatives. En pacients amb LNH la IL-2 s'ha associat al tractament amb rituximab [329-331], i actualment està aprovada com a tractament en alguns tumors com és el cas del carcinoma renal metastàtic i melanoma maligne [332]. Però entre les funcions efectores d'aquesta citocina n'hi ha que es consideren un inconvenient pel tractament de tumors. La IL-2 afavoreix la generació de CTLs que reconeixen el tumor i pateixen AICD, o per altre banda pot inhibir la resposta immune que indueix ja que pot activar un grup de cèl·lules Treg que depenen d'aquesta citocina. A més, també hem mencionat que la IL-2 és una citocina essencial en la diferenciació de TregCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ induïda pel TGF- β , així com per la seva expansió [333]. És a dir, si a l'ambient tumoral on el TGF- β estaria present afegim la IL-2, afavorirem la diferenciació i expansió d'aquest grup cel·lular regulador implicat en la tumorigènesi. Contràriament, la IL-15 amb la seva capacitat d'activar cèl·lules NK i cèl·lules T, d'inhibir la AICD, i de mantenir les cèl·lules T memòria CD8⁺, podria ser una millor opció terapèutica pel tractament del càncer i com a adjuvant de vacunes [227, 235, 243]. Més dades a favor arriben del fet que cèl·lules NK activades amb IL-15 adquireixen la capacitat de lisar cèl·lules Treg amb implicació directe del receptor NKG2D [334]. Amb tot això, ha estat important comprovar que l'efecte activador de la IL-15 incrementant la citotoxicitat cel·lular, la producció d'IFN- γ i l'expressió de receptors activadors, es veu mínimament afectat en presència de TGF- β , citocina alliberada per molts tipus tumorals i com a conseqüència present a l'ambient tumoral on han d'actuar les teràpies immunològiques.

1.7 LLC i altres citocines

En aquest punt és important mencionar una citocina recentment identificada que pertany a la família de receptors que tenen en comú la cadena γ , com és la IL-21. La importància d'aquesta citocina a la LLC radica en el paper que juga induint apoptosi directa sobre cèl·lules leucèmiques. Aquesta apoptosi depèn directament del nivell d'expressió del receptor IL-21R α a les cèl·lules de LLC, encara que aquesta expressió es baixa i variable. Contràriament, altres citocines d'aquesta família com la IL-2 i la IL-15, o també la IL-12 estudiades per la seva capacitat d'estimular les cèl·lules NK i activar el sistema immune innat, presenten l'inconvenient d'afavorir la proliferació de cèl·lules de LLC. Per altre banda, també incrementa l'ADCC en presència de rituximab. Això, ha conduït a que actualment s'estigui portant a terme un fase I en neoplàsies de cèl·lules B CD20⁺ amb IL-21 i rituximab [335, 336]. Encara que no ens hem d'oblidar que existeixen moltes evidències que suggereixen que la IL-21 actua com una citocina supressora de l'activació de les cèl·lules NK i de moltes altres funcions d'aquestes cèl·lules [337].

No obstant, la complexitat del sistema immunològic fa que qualsevol molècula que intervingui en aquest sistema, no es pugui valorar en termes del tot o res. Les teràpies combinades, les dosis mínimes i els intervals adequats poden ajudar en gran mesura a trobar l'equilibri d'actuació. Així per exemple, s'ha observat *in vitro* que sobre les cèl·lules de LLC, la IL-21 combinada amb la IL-15, inhibeix la proliferació induïda per la IL-15 i disminueix la fosforilació de ERK1/2 responsables possiblement dels efectes antiapoptòtics d'aquesta citocina. A més, coopera incrementant la proliferació i funció de cèl·lules T CD8⁺ [338]. Si a aquesta combinació afegim rituximab, inhibidor de ERK1/2, també es contraresta l'efecte antiapoptòtic [339].

No ens hem d'oblidar de la contribució d'altres poblacions cel·lulars en l'activitat antitumoral. A part de produir diferents mediadors citotòxics, els neutròfils expressen receptors Fc (Fc γ RIIa i Fc γ RIIIb) capaços d'induir ADCC. S'ha observat que l'ADCC induïda pels neutròfils també contribueix *in vivo* en l'activitat antitumoral del rituximab [340]. Així, l'administració de GM-CSF potencia l'activitat biològica del rituximab en un model de limfoma (ratolins SCID deplecionats de cèl·lules NK). Encara que aquesta citocina per si sola no va mostrar activitat antitumoral [341]. Per altra banda, sembla ser que en pacients amb LLC en recaiguda, la presència de GM-CSF combinada amb fludarabina i ciclofosfamida incrementa el nombre de respostes parcials i complertes sense disminuir l'incidència de neutropènia febril [342].

1.8 Paper del polimorfisme del receptor FcγRIIIa en la citotoxicitat

Quan vàrem analitzar el resultat dels assajos citotòxics en funció del polimorfisme del receptor FcγRIIIa vàrem observar resultats diferents segons si la cèl·lula diana fos la línia cel·lular Raji o les cèl·lules leucèmiques de LLCs. No es va trobar cap diferència entre els tres genotips quan es van enfrontar les cèl·lules a la línia cel·lular tumoral (Resultats Fig. 42). Aquesta falta d'associació podria ser deguda a un nombre baix de PBMCs per grup i a l'utilització de concentracions saturants de rituximab [274]. Però, sí es van trobar diferències quan les cèl·lules diana van ser cèl·lules de LLCs. Malgrat existir una més o menys sensibilitat a la mort cel·lular segons la LLC analitzada, el genotip VF en general presentava valors de lisi lleugerament més alts que el genotip FF. En aquesta situació no es va poder valorar el genotip VV ja que no va haver-hi cap en aquest grup. A més, quan vàrem utilitzar PBMCs sense activar, la diferència en l'ADCC entre aquests dos genotips va ser estadísticament significativa (Resultat Fig. 68). Aquestes dades estan en consonància amb observacions fetes per altres autors. Les cèl·lules NK d'individus sans que són VV i VF, és a dir, expressen almenys una valina al FcγRIIIa^{158val}, tenen augmentada l'expressió de CD16, la unió al rituximab i l'ADCC donada pel rituximab [343]. Això podria explicar en part la millor resposta clínica al rituximab que tenen els pacients amb aquests genotips. Així per exemple, pacients amb limfoma B de cèl·lules grans difús (DLBCL) tractats amb R-CHOP van respondre millor al tractament si eren VV (88%) vs VF (79%) i FF (50%) [276]. Encara que hi ha dades publicades en pacients amb LLC que no recolzen aquests resultats. Els mateixos autors troben que aquest polimorfisme no prediu el grau de resposta en pacients amb LLC tractats amb rituximab ni amb alemtuzumab [344, 345].

2. Implicació del CpG ODN A potenciant el mecanisme d'acció del Rituximab

Un altre via d'activació del sistema immune innat, que inclou l'activació de cèl·lules NK, és l'activació de receptors pel reconeixement de patrons (PRR). Aquests receptors es troben a la superfície, vesícules endosòmiques i citoplasma cel·lular preparats per reconèixer als microorganismes a qualsevol d'aquestes localitzacions. A més, es troben vinculats a les vies de senyalització intracel·lular activadores de respostes que afavoreixen la inflamació i la defensa de l'hoste front microorganismes. Dintre d'aquests receptors pel reconeixement de patrons es troba la família Toll, que ocupa un lloc fonamental a la immunitat innata. Entre els productes microbians que estimulen les seves senyals tenim les seqüències d'oligodesoxinucleòtids amb guanosines-citosines no metilades amb certs nucleòsids que les flanquegen, que indueixen respostes immunològiques a través del receptor TLR9. La localització endosòmica d'aquest receptor permet una detecció eficient, prevenint possibles estimulacions accidentals per motius CpG inclosos al propi DNA [346], encara que s'ha de tenir present l'existència d'una via citosòlica de detecció del DNA independent del TLR9 [347, 348]. Aquests fets indiquen possiblement la importància que té aquesta resposta a la immunitat innata.

Degut a que les unions fosfodièsters presents al DNA natiu són ràpidament degradades per endonucleases, els CpG ODN d'aplicació terapèutica estan sintetitzats parcialment amb bases modificades (fosforotioats) que proporcionen resistència a les nucleases incrementant així la vida mitjana dels CpG ODN (de pocs minuts el DNA natiu no modificat a aproximadament 48 hores el modificat), i provocant normalment efectes immunes estimuladors molt més potents [349]. Hi ha almenys tres classes de CpG ODN estimuladors amb diferents característiques estructurals i biològiques; funcions algunes d'elles divergents però que sorprenentment sembla ser que totes són resultat de l'activació del TLR9 [350, 351]. El perquè diferents agonistes del TLR9 donen lloc a activacions diferents segueix sent un fet desconegut. Una de les activitats més importants, especialment del CpG ODN A és l'estimulació de cèl·lules NK [254]. Cèl·lules mononuclears de sang perifèrica activades amb CpG ODN A van potenciar la citotoxicitat cel·lular depenent del rituximab contra cèl·lules de limfoma B de la línia cel·lular Raji al mateix nivell que la IL-15 (Resultats Fig. 34). Les cèl·lules NK i altres cèl·lules del sistema immune innat s'activen amb els CpG ODN secundàriament per les

pDCs a través de vies tant dependents de l'IFN com independents. S'ha descrit una activació directa de cèl·lules NK a través del TLR9 [352]. No obstant, el CpG ODN A no va incrementar ni la citotoxicitat natural ni la citotoxicitat en presència de rituximab de cèl·lules NK purificades, comportant-se exactament igual que un CpG ODN control no estimulador (Resultats Fig. 39). Per tant, es requereixen senyals addicionals procedents d'altres tipus cel·lulars, activats amb CpG ODN A, presents a les PBMCs perquè la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK es potenciï. Tot i així les principals cèl·lules efectores responsables de la potenciació de la citotoxicitat van ser les cèl·lules NK. La resta de poblacions van participar mínimament ja que la capacitat citotòxica tant natural com en presència de rituximab de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica deplecionades de cèl·lules NK i activades amb CpG ODN A va ser pràcticament nul·la (Resultats Fig. 40). De la mateixa manera, les PBMCs activades amb CpG ODN A van produir una molt més gran quantitat d'IFN- γ que les cèl·lules NK purificades activades (Resultats Fig. 41). De fet, les cèl·lules NK purificades i activades van produir poca quantitat d'IFN- γ , a diferència de l'observat per altres autors [352, 353]. Aquesta discrepància es podria donar com a conseqüència de condicions de cultius diferents, com van ser un nombre més alt de cèl·lules NK i un més perllongat temps de cultiu utilitzat per aquests autors.

Els efectes immunològics deguts a l'administració de CpG ODNs en humans esdevenen com a conseqüència de l'activació (directa i indirecta) de cèl·lules que constitutivament expressen el TLR9 (cèl·lules B, pDCs, NKs) [354]. Però, l'activació cel·lular indueix l'expressió d'aquest receptor en neutròfils, monòcits (així com cèl·lules derivades de monòcits) i cèl·lules T CD4⁺; de la mateixa manera que en cèl·lules no hematopoètiques com són cèl·lules epitelials pulmonars, càncers pulmonars, queratinòcits i epiteli intestinal, sense conèixer del cert el paper biològic que exerceix [355]. L'estimulació del TLR9 per qualsevol dels 3 tipus de CpG ODN provoca una activació de la immunitat innata amb una secreció de citocines i quimiocines per cèl·lules B i pDCs (i altres cèl·lules que s'activen secundàriament) que tenen un perfil predominantment Th1. L'activació Th1 és una resposta òptima per lluitar contra infeccions intracel·lulars i en ella participen CTLs i cèl·lules NK activades amb capacitat de lisar les cèl·lules infectades. Aquest tipus d'activació immune és la més desitjada a les teràpies tumorals, ja que les mateixes defenses es poden redirigir perquè destrueixin a les cèl·lules tumorals. La immunitat innata per l'activació del TLR9 pot promoure la regressió tumoral, a través de l'activitat antitumoral de factors com són el IFN- α i el TRAIL, o indirectament per l'activació de cèl·lules NK [349].

Posteriorment a l'activació de la immunitat innata, es produirà una resposta adaptativa antígen-específica. Les pDCs activades a través del TLR9 es transformen en cèl·lules competents per induir respostes en cèl·lules T CD4⁺ i CD8⁺ [356]. Tant la classe A com la B augmenten l'habilitat que tenen les pDCs de induir cèl·lules T CD8⁺ antígen-específiques amb fenotip memòria [357]. A més, les cèl·lules B reben una forta coestimulació quan estan unides a un antígen específic a la vegada que s'estimulen pel TLR9 [349]. De manera que es potencia el desenvolupament d'anticossos antígen-específics. Això invita a utilitzar als CpG ODN com a adjuvants en vacunes, especialment per induir respostes Th1. Amb tot això, no es d'estranyar que l'estimulació repetida amb agonistes específics d'aquest TLR, sigui l'única que estigui evidenciant activitats antitumorals en fases inicials de desenvolupament clínic.

Ja s'ha mencionat prèviament que la citotoxicitat basal que resulta de l'enfrontament de cèl·lules mononuclears de sang perifèrica amb cèl·lules de LLC-B va ser 5 vegades menor que la trobada amb la línia cel·lular de limfoma B (Resultats Fig. 50A). Aquesta menor capacitat lítica, com s'ha pogut observar en els experiments portats a terme amb la IL-15, es deu tant a la sensibilitat i/o resistència de les cèl·lules leucèmiques a la lisi, com a la capacitat d'activar-se que presenten les cèl·lules efectores a un determinat estímul. El CpG ODN A va resultar ser un estímul activador de les PBMCs prou potent com per incrementar la citotoxicitat basal i l'ADCC de manera significativa (Resultats Fig.49). No obstant, comparativament amb la IL-15, aquesta última va potenciar molt més la capacitat citotòxica de les cèl·lules efectores, trobant-se diferències significatives entre la menor activació donada pel CpG ODN A i la major activació de la IL-15 (Resultats Fig. 46-47). A més, la IL-15 va resultar ser un estímul suficientment potent com perquè la suma dels 2 estímuls no provoqués cap efecte, ni sinèrgic ni molt menys additiu (Resultats Fig.48).

Dintre de les tres classes de CpG ODN descrites fins aquest moment cal destacar les diferències funcionals entre la classe B (utilitzada actualment als assajos clínics) [355] i la classe A (utilitzada al nostre estudi). La classe B indueix una forta diferenciació i proliferació de cèl·lules B amb una inducció d'expressió de molècules coestimuladores a les pDCs, i modesta secreció d'IFN- α . Contràriament, la classe A indueix una forta secreció d'IFN- α per pDCs amb moderada expressió de molècules coestimuladores, i una molt petita activació de cèl·lules B [356]. Hi ha dades *in vitro* indicant que en cèl·lules leucèmiques de pacients amb LLC de mal pronòstic (V_H no mutats), el CpG ODN B no afecta la supervivència de les cèl·lules leucèmiques o fins i

tot pot disminuir l'apoptosi espontània, a diferència de les cèl·lules leucèmiques de pacients amb bon pronòstic (V_H mutats) on sembla ser que provoca un arrest del cicle cel·lular i una inducció de l'apoptosi [358]. Per la qual cosa, el tractament amb CpG ODN B de pacients amb LLC-B (V_H no mutats) es troba en discussió [359]. Tenint en compte que el CpG ODN A sembla ser que actua dèbilment sobre les cèl·lules B, però que contràriament provoca una forta activació de cèl·lules NK i resposta via IFN, postulem que aquest CpG ODN podria ser considerat una millor opció terapèutica en aquests pacients. Actualment s'està portant a terme un assaig clínic Fase I amb el CpG ODN B en pacients diagnosticats de LLC-B sense tenir en compte l'estat mutacional, on caldrà valorar atentament els resultats.

CONCLUSIONS

1. La IL-15 i el CpG ODN A són 2 molècules estimuladores que potencien significativament la capacitat citotòxica de PBMCs enfrontades a una línia cel·lular de limfoma B humà tant en presència (ADCC) com en absència (citotoxicitat natural) de rituximab.
2. Tant la IL-15 com el CpG ODN A són molècules amb capacitat de potenciar significativament la citotoxicitat natural i l'ADCC de PBMCs enfrontades a cèl·lules leucèmiques de LLC-B.
3. La principal població efectora responsable de potenciar la capacitat citotòxica de PBMCs estimulades amb CpG ODN A i IL-15 són les cèl·lules NK.
4. La IL-15 incrementa la capacitat citotòxica de la cèl·lula NK tant directament com indirectament, mentre que el CpG ODN A ho fa només indirectament. Requereix de senyals addicionals presents a les PBMCs per incrementar la capacitat citotòxica de la cèl·lula NK.
5. Les PBMCs activades amb CpG ODN A potencien l'ADCC contra cèl·lules de limfoma B d'una línia cel·lular, al mateix nivell que la IL-15. Però, quan les PBMCs s'enfronten a cèl·lules leucèmiques de LLC, la IL-15 és un estímul significativament més potent que el CpG ODN A incrementant la citotoxicitat natural i l'ADCC.
6. La IL-15 incrementa l'expressió de receptors relacionats amb cèl·lules NK en fase de desgranulació com són el CD16, CD69 i NKG2D. A l'igual que el receptor LFA-1 implicat en la senyalització de la citotoxicitat (adhesió cel·lular).
7. A les 24 hores d'estimular les PBMCs amb IL-15 només es produeix un augment significatiu d'IFN- γ . La producció d'altres citocines com TNF- α , IL-10, MIP-1 α i MIP-1 β no s'afecta o és mínima. Però aquest IFN- γ present als cultius en aquest moment afecta poc la capacitat citotòxica de les PBMCs.
8. El TGF- β disminueix de manera significativa la citotoxicitat natural i l'ADCC de PBMCs enfrontades a cèl·lules leucèmiques de LLC.

9. La IL-15 és un estímul prou potent incrementant la capacitat citotòxica de PBMCs per poder contrarestar l'efecte supressor del TGF- β en la citotoxicitat natural i en l'ADCC.
10. La presència durant 24 hores de TGF- β als cultius de PBMCs sense estimular disminueix de manera significativa la producció d'IFN- γ , TNF- α i IL-10. Però aquesta disminució, en presència d'IL-15 és menor i més variable no sent significativa.
11. L'ADCC de PBMCs de donants amb el genotip VF és major que la de donants FF. Sembla ser que la presència d'un al·lel val158 confereix a les PBMCs més capacitat citotòxica front cèl·lules de LLC. No obstant, quan les PBMCs estan estimulades amb IL-15 aquesta diferència no s'observa.

BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K. and Lichtman, *Cellular and Molecular Immunology*. 2007. 6E edition.
2. Blom, B. and H. Spits, *Development of human lymphoid cells*. Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 287-320.
3. Hennessy, B.T., E.O. Hanrahan, and P.A. Daly, *Non-Hodgkin lymphoma: an update*. Lancet Oncol, 2004. 5(6): p. 341-53.
4. Matutes, E., *The classification of lymphoid leukaemias*. Leuk Lymphoma, 1991. 5(suppl): p. 153-155.
5. Inamdar, K.V. and C.E. Bueso-Ramos, *Pathology of chronic lymphocytic leukemia: an update*. Ann Diagn Pathol, 2007. 11(5): p. 363-89.
6. Montserrat, E., et al., *Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults*. Blood, 1991. 78(6): p. 1545-51.
7. Hudson, R.P. and S.J. Wilson, *Hypogammaglobulinemia and chronic lymphatic leukemia*. Cancer, 1960. 13: p. 200-4.
8. Bichi, R., et al., *Human chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted *TCL1* expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(10): p. 6955-60.
9. Vuillier, F., et al., *Lower levels of surface B-cell-receptor expression in chronic lymphocytic leukemia are associated with glycosylation and folding defects of the mu and CD79a chains*. Blood, 2005. 105(7): p. 2933-40.
10. Payelle-Brogard, B., et al., *Analysis of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in familial chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(10): p. 3516-22.
11. Alfarano, A., et al., *An alternatively spliced form of CD79b gene may account for altered B-cell receptor expression in B-chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 93(7): p. 2327-35.
12. Thompson, A.A., et al., *Aberrations of the B-cell receptor B29 (CD79b) gene in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1997. 90(4): p. 1387-94.
13. Payelle-Brogard, B., et al., *Defective assembly of the B-cell receptor chains accounts for its low expression in B-chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol, 2002. 118(4): p. 976-85.
14. Payelle-Brogard, B., et al., *Abnormal levels of the alpha chain of the CD22 adhesion molecule may account for low CD22 surface expression in chronic lymphocytic leukemia*. Leukemia, 2006. 20(5): p. 877-8.
15. Michel, F., et al., *Defective calcium response in B-chronic lymphocytic leukemia cells. Alteration of early protein tyrosine phosphorylation and of the mechanism responsible for cell calcium influx*. J Immunol, 1993. 150(8 Pt 1): p. 3624-33.
16. Lanham, S., et al., *Differential signaling via surface IgM is associated with *VH* gene mutational status and CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2003. 101(3): p. 1087-93.
17. Rosenwald, A., et al., *Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia*. J Exp Med, 2001. 194(11): p. 1639-47.
18. Chen, L., et al., *ZAP-70 directly enhances IgM signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2005. 105(5): p. 2036-41.
19. Gobessi, S., et al., *ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells*. Blood, 2007. 109(5): p. 2032-9.
20. Richardson, S.J., et al., *ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL)*. Blood, 2006. 107(9): p. 3584-92.
21. Castro, J.E., et al., *ZAP-70 is a novel conditional heat shock protein 90 (Hsp90) client: inhibition of Hsp90 leads to ZAP-70 degradation, apoptosis, and impaired signaling in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2005. 106(7): p. 2506-12.
22. Boelens, J., J. Philippe, and F. Offner, *B-CLL cells from lymph nodes express higher ZAP-70 levels than B-CLL cells from peripheral blood*. Leuk Res, 2007. 31(5): p. 719-20.
23. Damle, R.N., et al., *Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1999. 94(6): p. 1840-7.
24. Dighiero, G. and T.J. Hamblin, *Chronic lymphocytic leukaemia*. Lancet, 2008. 371(9617): p. 1017-29.
25. Lin, K., et al., *Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2002. 100(4): p. 1404-9.
26. Dyer, M.J., et al., *BCL2 translocations in leukemias of mature B cells*. Blood, 1994. 83(12): p. 3682-8.
27. Caligaris-Cappio, F. and T.J. Hamblin, *B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather*. J Clin Oncol, 1999. 17(1): p. 399-408.
28. Vrhovac, R., et al., *Prognostic significance of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in chronic B-cell lymphocytic leukemia*. Blood, 1998. 91(12): p. 4694-700.
29. Stevenson, F.K. and F. Caligaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor*. Blood, 2004. 103(12): p. 4389-95.

30. Cheson, B.D., et al., *National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment*. Blood, 1996. 87(12): p. 4990-7.
31. Hamblin, T., *Chronic lymphocytic leukaemia: one disease or two?* Ann Hematol, 2002. 81(6): p. 299-303.
32. Ghia, P., A.M. Ferreri, and F. Galigaris-Cappio, *Chronic lymphocytic leukemia*. Crit Rev Oncol Hematol, 2007. 64(3): p. 234-46.
33. Rai, K.R., et al., *Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 1975. 46(2): p. 219-34.
34. Binet, J.L., et al., *A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis*. Cancer, 1981. 48(1): p. 198-206.
35. Moreno, C. and E. Montserrat, *New prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia*. Blood Rev, 2008. 22(4): p. 211-9.
36. Robak, T., *Recent progress in the management of chronic lymphocytic leukemia*. Cancer Treat Rev, 2007. 33(8): p. 710-28.
37. Kohler, G. and C. Milstein, *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature, 1975. 256(5517): p. 495-7.
38. Glennie, M.J. and J.G. van de Winkel, *Renaissance of cancer therapeutic antibodies*. Drug Discov Today, 2003. 8(11): p. 503-10.
39. Qu, Z., et al., *Development of humanized antibodies as cancer therapeutics*. Methods, 2005. 36(1): p. 84-95.
40. Bakr, M.A., *Induction therapy*. Exp Clin Transplant, 2005. 3(1): p. 320-8.
41. Maloney, D.G., *Concepts in radiotherapy and immunotherapy: anti-CD20 mechanisms of action and targets*. Semin Oncol, 2005. 32(1 Suppl 1): p. S19-26.
42. Reff, M.E., et al., *Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20*. Blood, 1994. 83(2): p. 435-45.
43. Grillo-Lopez, A.J., *Monoclonal antibody therapy for B-cell lymphoma*. Int J Hematol, 2002. 76(5): p. 385-93.
44. Kehrl, J.H., et al., *Molecular mechanisms regulating CD19, CD20 and CD22 gene expression*. Immunol Today, 1994. 15(9): p. 432-6.
45. Tedder, T.F. and P. Engel, *CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes*. Immunol Today, 1994. 15(9): p. 450-4.
46. Tedder, T.F., et al., *The gene that encodes the human CD20 (B1) differentiation antigen is located on chromosome 11 near the t(11;14)(q13;q32) translocation site*. J Immunol, 1989. 142(7): p. 2555-9.
47. Hultin, L.E., et al., *CD20 (pan-B cell) antigen is expressed at a low level on a subpopulation of human T lymphocytes*. Cytometry, 1993. 14(2): p. 196-204.
48. Johnson, P. and M. Glennie, *The mechanisms of action of rituximab in the elimination of tumor cells*. Semin Oncol, 2003. 30(1 Suppl 2): p. 3-8.
49. Tedder, T.F., et al., *Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. 85(1): p. 208-12.
50. Einfeld, D.A., et al., *Molecular cloning of the human B cell CD20 receptor predicts a hydrophobic protein with multiple transmembrane domains*. Embo J, 1988. 7(3): p. 711-7.
51. Tedder, T.F., G. McIntyre, and S.F. Schlossman, *Heterogeneity in the B1 (CD20) cell surface molecule expressed by human B-lymphocytes*. Mol Immunol, 1988. 25(12): p. 1321-30.
52. Tedder, T.F., et al., *Structure of the gene encoding the human B lymphocyte differentiation antigen CD20 (B1)*. J Immunol, 1989. 142(7): p. 2560-8.
53. Polyak, M.J. and J.P. Deans, *Alanine-170 and proline-172 are critical determinants for extracellular CD20 epitopes; heterogeneity in the fine specificity of CD20 monoclonal antibodies is defined by additional requirements imposed by both amino acid sequence and quaternary structure*. Blood, 2002. 99(9): p. 3256-62.
54. Deans, J.P., et al., *Association of 75/80-kDa phosphoproteins and the tyrosine kinases Lyn, Fyn, and Lck with the B cell molecule CD20. Evidence against involvement of the cytoplasmic regions of CD20*. J Biol Chem, 1995. 270(38): p. 22632-8.
55. Deans, J.P., H. Li, and M.J. Polyak, *CD20-mediated apoptosis: signalling through lipid rafts*. Immunology, 2002. 107(2): p. 176-82.
56. Leveille, C., A.L.-D. R, and W. Mourad, *CD20 is physically and functionally coupled to MHC class II and CD40 on human B cell lines*. Eur J Immunol, 1999. 29(1): p. 65-74.
57. Carton, G., et al., *From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy*. Blood, 2004. 104(9): p. 2635-42.
58. Cragg, M.S., et al., *Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts*. Blood, 2003. 101(3): p. 1045-52.
59. Polyak, M.J., S.H. Taylor, and J.P. Deans, *Identification of a cytoplasmic region of CD20 required for its redistribution to a detergent-insoluble membrane compartment*. J Immunol, 1998. 161(7): p. 3242-8.
60. Deans, J.P., et al., *Association of tyrosine and serine kinases with the B cell surface antigen CD20. Induction via CD20 of tyrosine phosphorylation and activation of phospholipase C-gamma 1 and PLC phospholipase C-gamma 2*. J Immunol, 1993. 151(9): p. 4494-504.

61. White, M.W., et al., *Activation of dense human tonsilar B cells. Induction of c-myc gene expression via two distinct signal transduction pathways.* J Immunol, 1991. 146(3): p. 846-53.
62. Semac, I., et al., *Anti-CD20 therapeutic antibody rituximab modifies the functional organization of rafts/microdomains of B lymphoma cells.* Cancer Res, 2003. 63(2): p. 534-40.
63. Hofmeister, J.K., D. Cooney, and K.M. Coggeshall, *Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis.* Blood Cells Mol Dis, 2000. 26(2): p. 133-43.
64. Bezombes, C., et al., *Rituximab antiproliferative effect in B-lymphoma cells is associated with acid-sphingomyelinase activation in raft microdomains.* Blood, 2004. 104(4): p. 1166-73.
65. O'Keefe, T.L., et al., *Mice carrying a CD20 gene disruption.* Immunogenetics, 1998. 48(2): p. 125-32.
66. Li, H., et al., *Store-operated cation entry mediated by CD20 in membrane rafts.* J Biol Chem, 2003. 278(43): p. 42427-34.
67. Bourget, I., et al., *CD20 monoclonal antibodies stimulate extracellular cleavage of the low affinity receptor for IgE (Fc epsilon RII/CD23) in Epstein-Barr-transformed B cells.* J Biol Chem, 1994. 269(9): p. 6927-30.
68. Bourget, I., et al., *CD20 monoclonal antibodies down-regulate IgM at the surface of B cells.* Eur J Immunol, 1993. 23(3): p. 768-71.
69. Valentine, M.A. and K.A. Licciardi, *Rescue from anti-IgM-induced programmed cell death by the B cell surface proteins CD20 and CD40.* Eur J Immunol, 1992. 22(12): p. 3141-8.
70. Dancescu, M., et al., *IL-4 induces conformational change of CD20 antigen via a protein kinase C-independent pathway. Antagonistic effect of anti-CD40 monoclonal antibody.* J Immunol, 1992. 148(8): p. 2411-6.
71. Venugopal, P., et al., *Effects of cytokines on CD20 antigen expression on tumor cells from patients with chronic lymphocytic leukemia.* Leuk Res, 2000. 24(5): p. 411-5.
72. Sivaraman, S., et al., *Effect of interferon-alpha on CD20 antigen expression of B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Cytokines Cell Mol Ther, 2000. 6(2): p. 81-7.
73. Murayama, Y., et al., *Transient expression of CD20 antigen (pan B cell marker) in activated lymph node T cells.* Microbiol Immunol, 1996. 40(6): p. 467-71.
74. Treon, S.P., et al., *Tumor cell expression of CD59 is associated with resistance to CD20 serotherapy in patients with B-cell malignancies.* J Immunother, 2001. 24(3): p. 263-71.
75. Kunala, S. and R.M. Macklis, *Ionizing radiation induces CD20 surface expression on human B cells.* Int J Cancer, 2001. 96(3): p. 178-81.
76. Anderson, K.C., et al., *Expression of human B cell-associated antigens on leukemias and lymphomas: a model of human B cell differentiation.* Blood, 1984. 63(6): p. 1424-33.
77. Ginaldi, L., et al., *Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukaemias.* J Clin Pathol, 1998. 51(5): p. 364-9.
78. Press, O.W., et al., *Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) serotherapy of human B cell lymphomas.* Blood, 1987. 69(2): p. 584-91.
79. Maloney, D.G., *Mechanism of action of rituximab.* Anticancer Drugs, 2001. 12 Suppl 2: p. S1-4.
80. Cerny, T., et al., *Mechanism of action of rituximab.* Anticancer Drugs, 2002. 13 Suppl 2: p. S3-10.
81. Vugmeyster, Y., et al., *Depletion of B cells by a humanized anti-CD20 antibody PRO70769 in Macaca fascicularis.* J Immunother (1997), 2005. 28(3): p. 212-9.
82. McLaughlin, P., F.B. Hagemeister, and A.J. Grillo-Lopez, *Rituximab in indolent lymphoma: the single-agent pivotal trial.* Semin Oncol, 1999. 26(5 Suppl 14): p. 79-87.
83. Edwards, J.C., M.J. Leandro, and G. Cambridge, *B lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: targeting of CD20.* Curr Dir Autoimmun, 2005. 8: p. 175-92.
84. Plosker, G.L. and D.P. Figgitt, *Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia.* Drugs, 2003. 63(8): p. 803-43.
85. Davies, B. and T. Shaw, *Rituximab pharmacokinetic characteristics are not influenced by combination with methotrexate or cyclophosphamide.* Presented at EULAR, 2004.
86. Berinstein, N.L., *Principles of maintenance therapy.* Leuk Res, 2006. 30 Suppl 1: p. S3-10.
87. McLaughlin, P., et al., *Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program.* J Clin Oncol, 1998. 16(8): p. 2825-33.
88. Maloney, D.G., et al., *IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma.* Blood, 1997. 90(6): p. 2188-95.
89. Berinstein, N.L., et al., *Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma.* Ann Oncol, 1998. 9(9): p. 995-1001.
90. Anolik, J.H., et al., *The relationship of Fc gamma RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2003. 48(2): p. 455-9.
91. Maloney, D.G., B. Smith, and A. Rose, *Rituximab: mechanism of action and resistance.* Semin Oncol, 2002. 29(1 Suppl 2): p. 2-9.
92. Davis, T.A., et al., *Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment.* J Clin Oncol, 2000. 18(17): p. 3135-43.

93. Maeda, T., et al., *Successful treatment with a chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8, rituximab) for a patient with relapsed mantle cell lymphoma who developed a human anti-chimeric antibody*. *Int J Hematol*, 2001. **74**(1): p. 70-5.
94. Looney, R.J., et al., *B cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalation trial of rituximab*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(8): p. 2580-9.
95. Anderson, D.R., et al., *Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma*. *Biochem Soc Trans*, 1997. **25**(2): p. 705-8.
96. Golay, J., et al., *Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis*. *Blood*, 2000. **95**(12): p. 3900-8.
97. Takai, T., *Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity*. *J Clin Immunol*, 2005. **25**(1): p. 1-18.
98. Clynes, R.A., et al., *Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets*. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 443-6.
99. Clynes, R., et al., *Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(2): p. 652-6.
100. Ravetch, J.V., *Fc receptors*. In "Fundamental Immunology" (W.E. Paul, Ed.), 2003. pp.685-700: p. Lippincott-Raven, Philadelphia, PA.
101. Ravetch, J.V. and S. Bolland, *IgG Fc receptors*. *Annu Rev Immunol*, 2001. **19**: p. 275-90.
102. Sarmay, G., G. Koncz, and J. Gergely, *Integration of activatory and inhibitory signals in human B-cells*. *Immunol Lett*, 1996. **54**(2-3): p. 93-100.
103. Stefanescu, R.N., et al., *Inhibitory Fc gamma receptors: from gene to disease*. *J Clin Immunol*, 2004. **24**(4): p. 315-26.
104. Torigoe, C., J.K. Inman, and H. Metzger, *An unusual mechanism for ligand antagonism*. *Science*, 1998. **281**(5376): p. 568-72.
105. Mechetina, L.V., et al., *Identification of CD16-2, a novel mouse receptor homologous to CD16/Fc gamma RIII*. *Immunogenetics*, 2002. **54**(7): p. 463-8.
106. Nimmerjahn, F., et al., *FcgammaRIV: a novel FcR with distinct IgG subclass specificity*. *Immunity*, 2005. **23**(1): p. 41-51.
107. Morel, P.A., L.K. Ernst, and D. Metes, *Functional CD32 molecules on human NK cells*. *Leuk Lymphoma*, 1999. **35**(1-2): p. 47-56.
108. Ernst, L.K., et al., *Allelic polymorphisms in the FcgammaRIIC gene can influence its function on normal human natural killer cells*. *J Mol Med*, 2002. **80**(4): p. 248-57.
109. Metes, D., et al., *Identification of the CD32/FcgammaRIIC-Q13/STP13 polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion assay*. *J Immunol Methods*, 2001. **258**(1-2): p. 85-95.
110. Boyle, J.J., *Human macrophages kill human mesangial cells by Fas-L-induced apoptosis when triggered by antibody via CD16*. *Clin Exp Immunol*, 2004. **137**(3): p. 529-37.
111. Stockmeyer, B., et al., *Polymorphonuclear granulocytes induce antibody-dependent apoptosis in human breast cancer cells*. *J Immunol*, 2003. **171**(10): p. 5124-9.
112. Otten, M.A., et al., *Immature neutrophils mediate tumor cell killing via IgA but not IgG Fc receptors*. *J Immunol*, 2005. **174**(9): p. 5472-80.
113. Iannello, A. and A. Ahmad, *Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies*. *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(4): p. 487-99.
114. Uchida, J., et al., *The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy*. *J Exp Med*, 2004. **199**(12): p. 1659-69.
115. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcgammaRIIIa gene*. *Blood*, 2002. **99**(3): p. 754-8.
116. Weng, W.K. and R. Levy, *Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma*. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(21): p. 3940-7.
117. Golay, J., et al., *CD20 levels determine the in vitro susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59*. *Blood*, 2001. **98**(12): p. 3383-9.
118. Bellosillo, B., et al., *Complement-mediated cell death induced by rituximab in B-cell lymphoproliferative disorders is mediated in vitro by a caspase-independent mechanism involving the generation of reactive oxygen species*. *Blood*, 2001. **98**(9): p. 2771-7.
119. Weng, W.K. and R. Levy, *Expression of complement inhibitors CD46, CD55, and CD59 on tumor cells does not predict clinical outcome after rituximab treatment in follicular non-Hodgkin lymphoma*. *Blood*, 2001. **98**(5): p. 1352-7.
120. Manches, O., et al., *In vitro mechanisms of action of rituximab on primary non-Hodgkin lymphomas*. *Blood*, 2003. **101**(3): p. 949-54.
121. van der Kolk, L.E., et al., *Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment*. *Br J Haematol*, 2001. **115**(4): p. 807-11.
122. Di Gaetano, N., et al., *Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo*. *J Immunol*, 2003. **171**(3): p. 1581-7.

123. Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents*. Blood, 2004. 103(7): p. 2738-43.
124. Flieger, D., et al., *Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric mouse human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines*. Cell Immunol, 2000. 204(1): p. 55-63.
125. Harjunpaa, A., S. Junnikkala, and S. Meri, *Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms*. Scand J Immunol, 2000. 51(6): p. 634-41.
126. Ellis, R.E., J.Y. Yuan, and H.R. Horvitz, *Mechanisms and functions of cell death*. Annu Rev Cell Biol, 1991. 7: p. 663-98.
127. Williams, M.S. and P.A. Henkart, *Apoptotic cell death induced by intracellular proteolysis*. J Immunol, 1994. 153(9): p. 4247-55.
128. Kumar, S. and N.L. Harvey, *Role of multiple cellular proteases in the execution of programmed cell death*. FEBS Lett, 1995. 375(3): p. 169-73.
129. Chinnaiyan, A.M. and V.M. Dixit, *The cell-death machine*. Curr Biol, 1996. 6(5): p. 555-62.
130. Golstein, P., *Controlling cell death*. Science, 1997. 275(5303): p. 1081-2.
131. Castedo, M., et al., *Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis*. J Immunol, 1996. 157(2): p. 512-21.
132. Zamzami, N., et al., *Mitochondrial control of nuclear apoptosis*. J Exp Med, 1996. 183(4): p. 1533-44.
133. Shan, D., J.A. Ledbetter, and O.W. Press, *Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies*. Blood, 1998. 91(5): p. 1644-52.
134. Shan, D., J.A. Ledbetter, and O.W. Press, *Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells*. Cancer Immunol Immunother, 2000. 48(12): p. 673-83.
135. Mathas, S., et al., *Anti-CD20- and B-cell receptor-mediated apoptosis: evidence for shared intracellular signaling pathways*. Cancer Res, 2000. 60(24): p. 7170-6.
136. Genestier, L., et al., *Tumor necrosis factor-alpha up-regulates Bcl-2 expression and decreases calcium-dependent apoptosis in human B cell lines*. Int Immunol, 1995. 7(4): p. 533-40.
137. Hockenbery, D.M., et al., *Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis*. Cell, 1993. 75(2): p. 241-51.
138. Baffy, G., et al., *Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production*. J Biol Chem, 1993. 268(9): p. 6511-9.
139. Shan, D., A.K. Gopal, and O.W. Press, *Synergistic effects of the fenretinide (4-HPR) and anti-CD20 monoclonal antibodies on apoptosis induction of malignant human B cells*. Clin Cancer Res, 2001. 7(8): p. 2490-5.
140. Alas, S., C.P. Ng, and B. Bonavida, *Rituximab modifies the cisplatin-mitochondrial signaling pathway, resulting in apoptosis in cisplatin-resistant non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res, 2002. 8(3): p. 836-45.
141. Alas, S., C. Emmanouilides, and B. Bonavida, *Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis*. Clin Cancer Res, 2001. 7(3): p. 709-23.
142. Alas, S. and B. Bonavida, *Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs*. Cancer Res, 2001. 61(13): p. 5137-44.
143. Mounier, N., et al., *Rituximab plus CHOP (R-CHOP) overcomes bcl-2--associated resistance to chemotherapy in elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)*. Blood, 2003. 101(11): p. 4279-84.
144. Maloney, D.G., *Rituximab for follicular lymphoma*. Curr Hematol Rep, 2003. 2(1): p. 13-22.
145. Cheung, M.C., et al., *Rituximab in lymphoma: a systematic review and consensus practice guideline from Cancer Care Ontario*. Cancer Treat Rev, 2007. 33(2): p. 161-76.
146. Feugier, P., et al., *Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte*. J Clin Oncol, 2005. 23(18): p. 4117-26.
147. Winkler, U., et al., *Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8)*. Blood, 1999. 94(7): p. 2217-24.
148. Buysmann, S., et al., *Administration of OKT3 as a two-hour infusion attenuates first-dose side effects*. Transplantation, 1997. 64(11): p. 1620-3.
149. Dillman, R.O., *Infusion reactions associated with the therapeutic use of monoclonal antibodies in the treatment of malignancy*. Cancer Metastasis Rev, 1999. 18(4): p. 465-71.
150. Lim, L.C., L.P. Koh, and P. Tan, *Fatal cytokine release syndrome with chimeric anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in a 71-year-old patient with chronic lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 1999. 17(6): p. 1962-3.
151. Eisenberg, R. and R.J. Looney, *The therapeutic potential of anti-CD20 "what do B-cells do?"* Clin Immunol, 2005. 117(3): p. 207-13.

152. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. Immunol Rev, 2006. 214: p. 56-72.
153. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy*. Nat Immunol, 2001. 2(4): p. 293-9.
154. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. 23: p. 225-74.
155. Papamichail, M., et al., *Natural killer lymphocytes: biology, development, and function*. Cancer Immunol Immunother, 2004. 53(3): p. 176-86.
156. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. 11(7): p. 237-44.
157. Lanier, L.L., B. Corliss, and J.H. Phillips, *Arousal and inhibition of human NK cells*. Immunol Rev, 1997. 155: p. 145-54.
158. Diefenbach, A., et al., *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity*. Nature, 2001. 413(6852): p. 165-71.
159. Cerwenka, A., J.L. Baron, and L.L. Lanier, *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11521-6.
160. Bottino, C., et al., *Cellular ligands of activating NK receptors*. Trends Immunol, 2005. 26(4): p. 221-6.
161. Phillips, J.H., et al., *Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes*. Science, 1995. 268(5209): p. 403-5.
162. Ferrini, S., et al., *T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function*. Eur J Immunol, 1994. 24(10): p. 2294-8.
163. Gumperz, J.E., et al., *Heterogeneous phenotypes of expression of the NKB1 natural killer cell class I receptor among individuals of different human histocompatibility leukocyte antigens types appear genetically regulated, but not linked to major histocompatibility complex haplotype*. J Exp Med, 1996. 183(4): p. 1817-27.
164. Shilling, H.G., et al., *Genetic control of human NK cell repertoire*. J Immunol, 2002. 169(1): p. 239-47.
165. Wagtmann, N., et al., *Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer*. Immunity, 1995. 3(6): p. 801-9.
166. Vitale, M., et al., *Physical and functional independency of p70 and p58 natural killer (NK) cell receptors for HLA class I: their role in the definition of different groups of alloreactive NK cell clones*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(4): p. 1453-7.
167. Biassoni, R., et al., *The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions*. J Exp Med, 1996. 183(2): p. 645-50.
168. Colonna, M. and J. Samaridis, *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells*. Science, 1995. 268(5209): p. 405-8.
169. Vales-Gomez, M., et al., *Kinetics of interaction of HLA-C ligands with natural killer cell inhibitory receptors*. Immunity, 1998. 9(3): p. 337-44.
170. Wilson, M.J., M. Torkar, and J. Trowsdale, *Genomic organization of a human killer cell inhibitory receptor gene*. Tissue Antigens, 1997. 49(6): p. 574-9.
171. Farag, S.S., et al., *Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect*. Blood, 2002. 100(6): p. 1935-47.
172. Vales-Gomez, M., et al., *Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD94/NKG2-A and the activating receptor CD94/NKG2-C to HLA-E*. Embo J, 1999. 18(15): p. 4250-60.
173. Mingari, M.C., et al., *HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. 95(3): p. 1172-7.
174. Bertone, S., et al., *Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1999. 29(1): p. 23-9.
175. Lopez-Botet, M., et al., *The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex*. Curr Top Microbiol Immunol, 1998. 230: p. 41-52.
176. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity*. Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 197-223.
177. Bottino, C., et al., *Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells*. Mol Immunol, 2004. 41(6-7): p. 569-75.
178. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells*. Nature, 2001. 409(6823): p. 1055-60.
179. Arnon, T.I., et al., *The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46*. Blood, 2004. 103(2): p. 664-72.
180. Gasser, S. and D.H. Raulet, *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. 214: p. 130-42.
181. Rosen, D.B., et al., *A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D*. J Immunol, 2004. 173(4): p. 2470-8.

182. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10*. Science, 1999. 285(5428): p. 730-2.
183. Li, Z., et al., *A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele*. Immunogenetics, 2000. 51(3): p. 246-8.
184. Steinle, A., et al., *Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family*. Immunogenetics, 2001. 53(4): p. 279-87.
185. Sutherland, C.L., et al., *ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity with enhancement by IL-15*. Blood, 2006. 108(4): p. 1313-9.
186. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc-Receptors as Regulators of Immunity*. Adv Immunol, 2007. 96C: p. 179-204.
187. Dhanji, S., K. Tse, and H.S. Teh, *The low affinity Fc receptor for IgG functions as an effective cytolytic receptor for self-specific CD8 T cells*. J Immunol, 2005. 174(3): p. 1253-8.
188. Matsumoto, G., et al., *Adhesion mediated by LFA-1 is required for efficient IL-12-induced NK and NKT cell cytotoxicity*. Eur J Immunol, 2000. 30(12): p. 3723-31.
189. Edberg, J.C. and R.P. Kimberly, *Cell type-specific glycoforms of Fc gamma R11a (CD16): differential ligand binding*. J Immunol, 1997. 159(8): p. 3849-57.
190. Salmon, J.E., et al., *Fc gamma receptor IIIb enhances Fc gamma receptor IIa function in an oxidant-dependent and allele-sensitive manner*. J Clin Invest, 1995. 95(6): p. 2877-85.
191. Koene, H.R., et al., *Fc gammaR11a-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaR11a, independently of the Fc gammaR11a-48L/R/H phenotype*. Blood, 1997. 90(3): p. 1109-14.
192. Wu, J., et al., *A novel polymorphism of Fc gamma R11a (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease*. J Clin Invest, 1997. 100(5): p. 1059-70.
193. Radaev, S., et al., *The structure of a human type III Fc gamma receptor in complex with Fc*. J Biol Chem, 2001. 276(19): p. 16469-77.
194. Vance, B.A., et al., *Binding of monomeric human IgG defines an expression polymorphism of Fc gamma R111 on large granular lymphocyte/natural killer cells*. J Immunol, 1993. 151(11): p. 6429-39.
195. Zompi, S. and F. Colucci, *Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells*. Immunol Lett, 2005. 97(1): p. 31-9.
196. Barber, D.F. and E.O. Long, *Coexpression of CD58 or CD48 with intercellular adhesion molecule 1 on target cells enhances adhesion of resting NK cells*. J Immunol, 2003. 170(1): p. 294-9.
197. Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins*. Science, 2003. 301(5640): p. 1720-5.
198. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. 214: p. 73-91.
199. Bryceson, Y.T., et al., *Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells*. J Exp Med, 2005. 202(7): p. 1001-12.
200. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion*. Blood, 2006. 107(1): p. 159-66.
201. Ting, A.T., et al., *Interaction between protein kinase C-dependent and G protein-dependent pathways in the regulation of natural killer cell granule exocytosis*. J Biol Chem, 1992. 267(33): p. 23957-62.
202. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(6): p. 420-30.
203. Loza, M.J., et al., *Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells*. Blood, 2002. 99(4): p. 1273-81.
204. Degli-Esposti, M.A. and M.J. Smyth, *Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage*. Nat Rev Immunol, 2005. 5(2): p. 112-24.
205. Demanet, C., et al., *Down-regulation of HLA-A and HLA-Bw6, but not HLA-Bw4, allospecificities in leukemic cells: an escape mechanism from CTL and NK attack?* Blood, 2004. 103(8): p. 3122-30.
206. Ahmad, A. and R. Ahmad, *HIV's evasion of host's NK cell response and novel ways of its countering and boosting anti-HIV immunity*. Curr HIV Res, 2003. 1(3): p. 295-307.
207. Koh, C.Y., et al., *Augmentation of antitumor effects by NK cell inhibitory receptor blockade in vitro and in vivo*. Blood, 2001. 97(10): p. 3132-7.
208. Lefebvre, S., et al., *Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer*. J Pathol, 2002. 196(3): p. 266-74.
209. Biassoni, R., et al., *Human natural killer cell receptors and co-receptors*. Immunol Rev, 2001. 181: p. 203-14.
210. Dorling, A., N.J. Monk, and R.I. Lechler, *HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells*. Eur J Immunol, 2000. 30(2): p. 586-93.
211. Xia, M.Q., et al., *Structure of the CAMPATH-1 antigen, a glycosylphosphatidylinositol-anchored glycoprotein which is an exceptionally good target for complement lysis*. Biochem J, 1993. 293 (Pt 3): p. 633-40.

212. Spiridon, C.I., et al., *Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo*. Clin Cancer Res, 2002. 8(6): p. 1720-30.
213. Jacobs, S.A. and K.A. Foon, *Monoclonal antibody therapy of leukaemias and lymphomas*. Expert Opin Biol Ther, 2005. 5(9): p. 1225-43.
214. Palmisano, G.L., et al., *Analysis of HLA-G expression in breast cancer tissues*. Hum Immunol, 2002. 63(11): p. 969-76.
215. Carson, W.E., et al., *Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells*. Eur J Immunol, 2001. 31(10): p. 3016-25.
216. Sondel, P.M. and J.A. Hank, *Combination therapy with interleukin-2 and antitumor monoclonal antibodies*. Cancer J Sci Am, 1997. 3 Suppl 1: p. S121-7.
217. Stockmeyer, B., et al., *Mechanisms of G-CSF- or GM-CSF-stimulated tumor cell killing by Fc receptor-directed bispecific antibodies*. J Immunol Methods, 2001. 248(1-2): p. 103-11.
218. Lustgarten, J., *Anti-Her-2/neu-IL-2 or heregulin-IL-2 fusions proteins redirect non-tumor specific CTL to the tumor site for tumor eradication*. Cancer Immunol Immunother, 2003. 52(12): p. 751-60.
219. van Ojik, H.H., et al., *CpG-A and B oligodeoxynucleotides enhance the efficacy of antibody therapy by activating different effector cell populations*. Cancer Res, 2003. 63(17): p. 5595-600.
220. Green, S.K., et al., *Disruption of cell-cell adhesion enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity: implications for antibody-based therapeutics of cancer*. Cancer Res, 2002. 62(23): p. 6891-900.
221. Shahied, L.S., et al., *Bispecific minibodies targeting HER2/neu and CD16 exhibit improved tumor lysis when placed in a divalent tumor antigen binding format*. J Biol Chem, 2004. 279(52): p. 53907-14.
222. Shields, R.L., et al., *High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R*. J Biol Chem, 2001. 276(9): p. 6591-604.
223. Ma, A., R. Koka, and P. Burkett, *Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis*. Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 657-79.
224. Zhang, X., et al., *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15*. Immunity, 1998. 8(5): p. 591-9.
225. Ku, C.C., et al., *Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines*. Science, 2000. 288(5466): p. 675-8.
226. Marks-Konczalik, J., et al., *IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(21): p. 11445-50.
227. Fehniger, T.A., M.A. Cooper, and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 169-83.
228. Carson, W.E., et al., *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival*. J Clin Invest, 1997. 99(5): p. 937-43.
229. Lenardo, M.J., *Fas and the art of lymphocyte maintenance*. J Exp Med, 1996. 183(3): p. 721-4.
230. Fontenot, J.D., et al., *A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1142-51.
231. D'Cruz, L.M. and L. Klein, *Development and function of agonist-induced CD25+Foxp3+ regulatory T cells in the absence of interleukin 2 signaling*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1152-9.
232. Maloy, K.J. and F. Powrie, *Fueling regulation: IL-2 keeps CD4+ Treg cells fit*. Nat Immunol, 2005. 6(11): p. 1071-2.
233. Schluns, K.S., K.D. Klonowski, and L. Lefrancois, *Transregulation of memory CD8 T-cell proliferation by IL-15Ralpha+ bone marrow-derived cells*. Blood, 2004. 103(3): p. 988-94.
234. Becker, T.C., et al., *Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells*. J Exp Med, 2002. 195(12): p. 1541-8.
235. Waldmann, T.A., S. Dubois, and Y. Tagaya, *Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy*. Immunity, 2001. 14(2): p. 105-10.
236. Waldmann, T.A. and Y. Tagaya, *The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens*. Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 19-49.
237. Fehniger, T.A. and M.A. Caligiuri, *Interleukin 15: biology and relevance to human disease*. Blood, 2001. 97(1): p. 14-32.
238. Koka, R., et al., *Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice*. J Exp Med, 2003. 197(8): p. 977-84.
239. Ilangumaran, S., et al., *Suppressor of cytokine signaling 1 attenuates IL-15 receptor signaling in CD8+ thymocytes*. Blood, 2003. 102(12): p. 4115-22.
240. Lodolce, J.P., et al., *IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation*. Immunity, 1998. 9(5): p. 669-76.
241. Kennedy, M.K., et al., *Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice*. J Exp Med, 2000. 191(5): p. 771-80.
242. Tagaya, Y., et al., *Identification of a novel receptor/signal transduction pathway for IL-15/T in mast cells*. Embo J, 1996. 15(18): p. 4928-39.

243. Waldmann, T.A., *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*. Nat Rev Immunol, 2006. 6(8): p. 595-601.
244. Dubois, S., et al., *Distinct pathways involving the FK506-binding proteins 12 and 12.6 underlie IL-2-versus IL-15-mediated proliferation of T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(24): p. 14169-74.
245. Waldmann, T.A., Dubois, S., Muller, J., Glodman, C., Damjanovich, S., *Biophysical aspects of transmembrane signaling*. ed. Damjanovich, S., 2005. (Springer, Heidelberg, 2005): p. 97-121.
246. Bulfone-Pau, S.S., et al., *Death deflected: IL-15 inhibits TNF-alpha-mediated apoptosis in fibroblasts by TRAF2 recruitment to the IL-15Ralpha chain*. Faseb J, 1999. 13(12): p. 1575-85.
247. Dubois, S., et al., *IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells*. Immunity, 2002. 17(5): p. 537-47.
248. Krieg, A.M., et al., *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995. 374(6522): p. 546-9.
249. Klinman, D.M., et al., *CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(7): p. 2879-83.
250. Razin, A. and J. Friedman, *DNA methylation and its possible biological roles*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1981. 25: p. 33-52.
251. Cardon, L.R., et al., *Pervasive CpG suppression in animal mitochondrial genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(9): p. 3799-803.
252. Sun, S., et al., *Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA*. J Exp Med, 1998. 188(12): p. 2335-42.
253. Stacey, K.J., M.J. Sweet, and D.A. Hume, *Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA*. J Immunol, 1996. 157(5): p. 2116-22.
254. Ballas, Z.K., W.L. Rasmussen, and A.M. Krieg, *Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA*. J Immunol, 1996. 157(5): p. 1840-5.
255. Roman, M., et al., *Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants*. Nat Med, 1997. 3(8): p. 849-54.
256. Gursel, M., et al., *Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide*. J Leukoc Biol, 2002. 71(5): p. 813-20.
257. Takeshita, F., et al., *Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells*. J Immunol, 2001. 167(7): p. 3555-8.
258. Hemmi, H., et al., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature, 2000. 408(6813): p. 740-5.
259. Bauer, S., et al., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(16): p. 9237-42.
260. Yi, A.K., et al., *CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species*. J Immunol, 1998. 160(10): p. 4755-61.
261. Hacker, H., et al., *CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation*. Embo J, 1998. 17(21): p. 6230-40.
262. Verthelyi, D., et al., *Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs*. J Immunol, 2001. 166(4): p. 2372-7.
263. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. 31(7): p. 2154-63.
264. Hartmann, G. and A.M. Krieg, *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. J Immunol, 2000. 164(2): p. 944-53.
265. Rothenfusser, S., et al., *Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta*. Eur J Immunol, 2001. 31(12): p. 3525-34.
266. Hartmann, G., et al., *Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2003. 33(6): p. 1633-41.
267. Klinman, D.M., *Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides*. Nat Rev Immunol, 2004. 4(4): p. 249-58.
268. Ishii, K.J., et al., *CpG-activated Thy1.2+ dendritic cells protect against lethal Listeria monocytogenes infection*. Eur J Immunol, 2005. 35(8): p. 2397-405.
269. Elkins, K.L., et al., *Bacterial DNA containing CpG motifs stimulates lymphocyte-dependent protection of mice against lethal infection with intracellular bacteria*. J Immunol, 1999. 162(4): p. 2291-8.
270. Zimmermann, S., et al., *CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis*. J Immunol, 1998. 160(8): p. 3627-30.
271. Klinman, D.M., *Adjuvant activity of CpG oligodeoxynucleotides*. Int Rev Immunol, 2006. 25(3-4): p. 135-54.
272. Gluck, W.L., et al., *Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-hodgkin's lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response*. Clin Cancer Res, 2004. 10(7): p. 2253-64.

273. Song, H., et al., *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, 2006. 242(1): p. 39-45.
274. Dall'Ozzo, S., et al., *Rituximab-dependent cytotoxicity by natural killer cells: influence of FCGR3A polymorphism on the concentration-effect relationship*. Cancer Res, 2004. 64(13): p. 4664-9.
275. Funakoshi, S., D.L. Longo, and W.J. Murphy, *Differential in vitro and in vivo antitumor effects mediated by anti-CD40 and anti-CD20 monoclonal antibodies against human B-cell lymphomas*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996. 19(2): p. 93-101.
276. Kim, D.H., et al., *FCGR3A gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma*. Blood, 2006. 108(8): p. 2720-5.
277. Fischer, L., et al., *The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells*. Exp Hematol, 2006. 34(6): p. 753-9.
278. Dunne, J., et al., *Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15*. J Immunol, 2001. 167(6): p. 3129-38.
279. Golay, J., et al., *Rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity against neoplastic B cells is stimulated strongly by interleukin-2*. Haematologica, 2003. 88(9): p. 1002-12.
280. Eisenbeis, C.F., et al., *Combination immunotherapy of B-cell non-Hodgkin's lymphoma with rituximab and interleukin-2: a preclinical and phase I study*. Clin Cancer Res, 2004. 10(18 Pt 1): p. 6101-10.
281. Munger, W., et al., *Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2*. Cell Immunol, 1995. 165(2): p. 289-93.
282. Strayer, D.R., W.A. Carter, and I. Brodsky, *Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity*. Breast Cancer Res Treat, 1986. 7(3): p. 187-92.
283. Saibara, T., et al., *Assessment of lymphokine-activated killer activity and gamma-interferon production in patients with small hepatocellular carcinomas*. Hepatology, 1993. 17(5): p. 781-7.
284. Pierson, B.A. and J.S. Miller, *CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis*. Blood, 1996. 88(6): p. 2279-87.
285. Jovic, V., et al., *Impaired perforin-dependent NK cell cytotoxicity and proliferative activity of peripheral blood T cells is associated with metastatic melanoma*. Tumori, 2001. 87(5): p. 324-9.
286. Costello, R.T., et al., *Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2002. 99(10): p. 3661-7.
287. Richards, J.O., et al., *Tumor growth impedes natural-killer-cell maturation in the bone marrow*. Blood, 2006. 108(1): p. 246-52.
288. Mrozek, E., P. Anderson, and M.A. Caligiuri, *Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1996. 87(7): p. 2632-40.
289. Williams, N.S., et al., *Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems*. Immunol Rev, 1998. 165: p. 47-61.
290. Carson, W.E., et al., *Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor*. J Exp Med, 1994. 180(4): p. 1395-403.
291. Kobayashi, H., et al., *Differences of biodistribution, pharmacokinetics, and tumor targeting between interleukins 2 and 15*. Cancer Res, 2000. 60(13): p. 3577-83.
292. Kishida, T., et al., *Interleukin (IL)-21 and IL-15 genetic transfer synergistically augments therapeutic antitumor immunity and promotes regression of metastatic lymphoma*. Mol Ther, 2003. 8(4): p. 552-8.
293. Koka, R., et al., *Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells*. J Immunol, 2004. 173(6): p. 3594-8.
294. Manshoury, T., et al., *Circulating CD20 is detectable in the plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and is of prognostic significance*. Blood, 2003. 101(7): p. 2507-13.
295. Lundin, J. and A. Osterborg, *Advances in the use of monoclonal antibodies in the therapy of chronic lymphocytic leukemia*. Semin Hematol, 2004. 41(3): p. 234-45.
296. Wang, J. and T.A. Springer, *Structural specializations of immunoglobulin superfamily members for adhesion to integrins and viruses*. Immunol Rev, 1998. 163: p. 197-215.
297. Hildreth, J.E., et al., *A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis*. Eur J Immunol, 1983. 13(3): p. 202-8.
298. Chen, B.P., et al., *Nonrestricted cytotoxicity mediated by interleukin 2-expanded leukocytes is inhibited by anti-LFA-1 monoclonal antibodies (MoAb) but potentiated by anti-CD3 MoAb*. Cell Immunol, 1987. 110(2): p. 282-93.
299. Schmits, R., et al., *LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor*. J Exp Med, 1996. 183(4): p. 1415-26.
300. Yokoyama, W.M., S. Kim, and A.R. French, *The dynamic life of natural killer cells*. Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 405-29.
301. Jamieson, A.M., et al., *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing*. Immunity, 2002. 17(1): p. 19-29.

302. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(10): p. 781-90.
303. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. Nature, 2005. 436(7054): p. 1186-90.
304. Sutherland, C.L., et al., *UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells*. J Immunol, 2002. 168(2): p. 671-9.
305. Raffaghello, L., et al., *Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma*. Neoplasia, 2004. 6(5): p. 558-68.
306. Friese, M.A., et al., *MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas*. Cancer Res, 2003. 63(24): p. 8996-9006.
307. Poggi, A., et al., *Vdelta1 T lymphocytes from B-CLL patients recognize ULBP3 expressed on leukemic B cells and up-regulated by trans-retinoic acid*. Cancer Res, 2004. 64(24): p. 9172-9.
308. Conejo-Garcia, J.R., et al., *Ovarian carcinoma expresses the NKG2D ligand Letal and promotes the survival and expansion of CD28- antitumor T cells*. Cancer Res, 2004. 64(6): p. 2175-82.
309. Eagle, R.A. and J. Trowsdale, *Promiscuity and the single receptor: NKG2D*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 737-44.
310. Horng, T., J.S. Bezbradica, and R. Medzhitov, *NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway*. Nat Immunol, 2007. 8(12): p. 1345-1352.
311. Ozdemir, O., Y. Ravindranath, and S. Savasan, *Mechanisms of superior anti-tumor cytotoxic response of interleukin 15-induced lymphokine-activated killer cells*. J Immunother (1997), 2005. 28(1): p. 44-52.
312. Chang, H.L., et al., *Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells*. Cancer Res, 1993. 53(18): p. 4391-8.
313. Stander, M., et al., *Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo*. Gene Ther, 1998. 5(9): p. 1187-94.
314. Fakhrai, H., et al., *Eradication of established intracranial rat gliomas by transforming growth factor beta antisense gene therapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(7): p. 2909-14.
315. Gasser, S. and D.H. Raulet, *The DNA damage response arouses the immune system*. Cancer Res, 2006. 66(8): p. 3959-62.
316. Hoglund, P., *DNA damage and tumor surveillance: one trigger for two pathways*. Sci STKE, 2006. 2006(317): p. pe2.
317. Doubrovina, E.S., et al., *Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma*. J Immunol, 2003. 171(12): p. 6891-9.
318. Wu, J.D., et al., *Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer*. J Clin Invest, 2004. 114(4): p. 560-8.
319. Lucas, P.J., et al., *Dysregulation of IL-15-mediated T-cell homeostasis in TGF-beta dominant-negative receptor transgenic mice*. Blood, 2006. 108(8): p. 2789-95.
320. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting*. Cytokine Growth Factor Rev, 2002. 13(2): p. 95-109.
321. Rosenzweig, S.D. and S.M. Holland, *Defects in the interferon-gamma and interleukin-12 pathways*. Immunol Rev, 2005. 203: p. 38-47.
322. Fehniger, T.A., et al., *Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response*. J Immunol, 1999. 162(8): p. 4511-20.
323. Nishikawa, H., et al., *Accelerated chemically induced tumor development mediated by CD4+CD25+ regulatory T cells in wild-type hosts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(26): p. 9253-7.
324. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity*. J Immunol, 1999. 163(10): p. 5211-8.
325. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody*. Cancer Res, 1999. 59(13): p. 3128-33.
326. Suttmoller, R.P., et al., *Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses*. J Exp Med, 2001. 194(6): p. 823-32.
327. Ormandy, L.A., et al., *Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma*. Cancer Res, 2005. 65(6): p. 2457-64.
328. Beyer, M., et al., *Reduced frequencies and suppressive function of CD4+CD25hi regulatory T cells in patients with chronic lymphocytic leukemia after therapy with fludarabine*. Blood, 2005. 106(6): p. 2018-25.
329. Kuzel, T.M., et al., *Phase II study of denileukin diftitox for previously treated indolent non-Hodgkin lymphoma: final results of E1497*. Leuk Lymphoma, 2007. 48(12): p. 2397-402.
330. Dang, N.H., et al., *Phase II trial of the combination of denileukin diftitox and rituximab for relapsed/refractory B-cell non-Hodgkin lymphoma*. Br J Haematol, 2007. 138(4): p. 502-5.
331. Khan, K.D., et al., *A phase 2 study of rituximab in combination with recombinant interleukin-2 for rituximab-refractory indolent non-Hodgkin's lymphoma*. Clin Cancer Res, 2006. 12(23): p. 7046-53.

332. Aklilu, M., et al., *Depletion of normal B cells with rituximab as an adjunct to IL-2 therapy for renal cell carcinoma and melanoma*. *Ann Oncol*, 2004. 15(7): p. 1109-14.
333. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. *J Immunol*, 2007. 178(4): p. 2018-27.
334. Roy, S., et al., *NK cells lyse T regulatory cells that expand in response to an intracellular pathogen*. *J Immunol*, 2008. 180(3): p. 1729-36.
335. de Toterò, D., et al., *Interleukin-21 receptor (IL-21R) is up-regulated by CD40 triggering and mediates proapoptotic signals in chronic lymphocytic leukemia B cells*. *Blood*, 2006. 107(9): p. 3708-15.
336. Gowda, A., et al., *IL-21 mediates apoptosis through up-regulation of the BH3 family member BIM and enhances both direct and antibody-dependent cellular cytotoxicity in primary chronic lymphocytic leukemia cells in vitro*. *Blood*, 2008. 111(9): p. 4723-30.
337. Brandt, K., et al., *Interleukin-21: a new modulator of immunity, infection, and cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2007. 18(3-4): p. 223-32.
338. de Toterò, D., et al., *The opposite effects of IL-15 and IL-21 on CLL B cells correlate with differential activation of the JAK/STAT and ERK1/2 pathways*. *Blood*, 2008. 111(2): p. 517-24.
339. Bonavida, B., *Rituximab-induced inhibition of antiapoptotic cell survival pathways: implications in chemo/immunosensitivity, rituximab unresponsiveness, prognostic and novel therapeutic interventions*. *Oncogene*, 2007. 26(25): p. 3629-36.
340. Hernandez-Ilizaliturri, F.J., et al., *Neutrophils contribute to the biological antitumor activity of rituximab in a non-Hodgkin's lymphoma severe combined immunodeficiency mouse model*. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(16 Pt 1): p. 5866-73.
341. Hernandez-Ilizaliturri, F.J., et al., *Concurrent administration of granulocyte colony-stimulating factor or granulocyte-monocyte colony-stimulating factor enhances the biological activity of rituximab in a severe combined immunodeficiency mouse lymphoma model*. *Leuk Lymphoma*, 2005. 46(12): p. 1775-84.
342. Rao, R., et al., *The combination of fludarabine, cyclophosphamide, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the treatment of patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia and low-grade Non-Hodgkin's Lymphoma*. *Clin Lymphoma*, 2005. 6(1): p. 26-30.
343. Hatjiharissi, E., et al., *Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc(gamma)RIIIa-158 V/V and V/F polymorphism*. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2561-4.
344. Farag, S.S., et al., *Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIa polymorphisms do not predict response to rituximab in B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2004. 103(4): p. 1472-4.
345. Lin, T.S., et al., *FCGR3A and FCGR2A polymorphisms may not correlate with response to alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2005. 105(1): p. 289-91.
346. Barton, G.M., J.C. Kagan, and R. Medzhitov, *Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA*. *Nat Immunol*, 2006. 7(1): p. 49-56.
347. Ishii, K.J., et al., *A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA*. *Nat Immunol*, 2006. 7(1): p. 40-8.
348. Okabe, Y., et al., *Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation*. *J Exp Med*, 2005. 202(10): p. 1333-9.
349. Krieg, A.M., *Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation*. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(6): p. 471-84.
350. Vollmer, J., et al., *Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities*. *Eur J Immunol*, 2004. 34(1): p. 251-62.
351. Hemmi, H., et al., *The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets*. *J Immunol*, 2003. 170(6): p. 3059-64.
352. Roda, J.M., R. Parihar, and W.E. Carson, 3rd, *CpG-containing oligodeoxynucleotides act through TLR9 to enhance the NK cell cytokine response to antibody-coated tumor cells*. *J Immunol*, 2005. 175(3): p. 1619-27.
353. Iho, S., et al., *Oligodeoxynucleotides containing palindrome sequences with internal 5'-CpG-3' act directly on human NK and activated T cells to induce IFN-gamma production in vitro*. *J Immunol*, 1999. 163(7): p. 3642-52.
354. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. *Nat Immunol*, 2004. 5(10): p. 987-95.
355. Krieg, A.M., *Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer*. *Oncogene*, 2008. 27(2): p. 161-7.
356. Krieg, A.M., *Development of TLR9 agonists for cancer therapy*. *J Clin Invest*, 2007. 117(5): p. 1184-94.
357. Rothenfusser, S., et al., *CpG-A and CpG-B oligonucleotides differentially enhance human peptide-specific primary and memory CD8+ T-cell responses in vitro*. *Blood*, 2004. 103(6): p. 2162-9.

358. Longo, P.G., et al., *The Akt signaling pathway determines the different proliferative capacity of chronic lymphocytic leukemia B-cells from patients with progressive and stable disease.* Leukemia, 2007. 21(1): p. 110-20.
359. Jahrsdorfer, B., S. Blackwell, and G. Weiner, *The effects of CpG ODN on CLL proliferation, apoptosis or phenotype could have an impact on its clinical utility.* Leukemia, 2007. 21(11): p. 2354-5; author reply 2355-6.