

The background of the cover is a dark field filled with various cells. Some cells are brightly fluorescent, showing green and blue colors. The cells have different shapes, some are spherical and others are more elongated with many fine protrusions. The overall appearance is that of a complex biological system, possibly related to cancer research or immunology.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Programa de Doctorado en Biociencias Moleculares

**Análisis del uso combinado de nanopartículas
magnéticas y campos magnéticos externos
para dirigir células linfoides hacia una región
de interés y de su potencial en terapias
de transferencia adoptiva
celular en cáncer**

Laura Sanz Ortega
MADRID, 2019

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Análisis del uso combinado de nanopartículas magnéticas y campos magnéticos externos para dirigir células linfoides hacia una región de interés y de su potencial en terapias de transferencia adoptiva celular en cáncer

Graduada en Biotecnología

Laura Sanz Ortega

Director de Tesis:

Dr. Domingo F. Barber Castaño

Centro Nacional de Biotecnología

Departamento de Inmunología y Oncología

Madrid, 2019



El trabajo presentado en esta memoria ha sido
realizado en el
Departamento de Inmunología y Oncología
del
Centro Nacional de Biotecnología,
bajo la dirección del
Dr. Domingo F. Barber Castaño.

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas las personas que han sustentado esa parte vital de una tesis que no llega a plasmarse en resultados, pero que considero imprescindible para llevar a cabo este trabajo. Una tesis doctoral no sólo es fruto del esfuerzo personal de una persona, es necesaria la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal. Intentar resumir en unas líneas la gratitud que siento a todas las personas que han estado presentes durante esa etapa, apoyándome y haciendo que hoy todo esto sea posible, va a ser muy difícil.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Domingo Barber por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, por su dedicación y apoyo durante este tiempo, por su confianza en mi trabajo y su capacidad para guiarme no sólo durante el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora. Gracias por sus consejos y por permitirme avanzar y crecer, personal y profesionalmente.

A José, por haber sido mi mentor durante la primera etapa de esta tesis. Por ser un compañero generoso, por su inmensa ayuda y su infinita paciencia, por compartir sus conocimientos y su pasión por la ciencia, y por tener siempre una sonrisa y una frase llena de optimismo, aún cuando algo (o todo) salía mal. Y gracias también por endulzarnos los días con todos esos postres caseros que traías.

A Yadi, por ser desde el principio una persona tan cercana y afín a mí, y por ofrecerme todo su apoyo, su confianza y su ayuda. Por ser una excelente compañera, sin esperar nada a cambio. Por alegrarme el día, sacarme una sonrisa y estar siempre ahí. Nunca podré agradecerte todo lo que has hecho por mí. Aún te queda pendiente el enseñarme a bailar salsa. Y ahora vienen curvas... pero tú puedes con todo eso y más, tenlo por seguro.

A Sonia, por todos sus consejos, enseñanzas y dedicación y por su paciencia infinita. Por todas esas horas de animalario, para después salir oliendo a ratón y con la cara marcada para el resto del día. Porque tardábamos más en sacar las tarjetas identificativas que en pinchar 50 ratones. Por los ratitos de desayuno, las comidas y los cafés. Por todo su apoyo, incluso cuando las cosas estaban difíciles. Eres una mujer increíble y muy fuerte (aunque los peques ahora puedan contigo).

A Carla, por su buen humor y su cariño, por esos ratitos de desayuno, y de charloteo. Por acercarte hasta nuestro sitio a darnos la vara (que en el fondo nos gusta). No te voy a dar las gracias por acompañarme al nitrógeno... te voy a dar las gracias por hacer del labo un sitio en el que sea agradable ir a trabajar, lleno de risas, música (aunque sea esa rara que te gusta a ti) y de buenos momentos. Gracias por tu apoyo y tu manera de ser.

A las tres, gracias por vuestro apoyo. Porque a pesar de que no siempre fue fácil, en ocasiones bastante difícil, el que estuvierais ahí hizo que todo fuera poco a poco mucho mejor. Gracias por todo este tiempo, sin vosotras no hubiera sido lo mismo. Os voy a echar muchísimo de menos.

A Vladimir, por todos sus consejos y su ayuda. Por siempre siempre un ratito para ese café y obligarte a parar un rato. Por esos mojitos que vinieron, y que ahora volverán y me perderé!

A Inés, por estar siempre disponible si necesitábamos cualquier cosa. A Gabi, por inundar de alegría y buen ánimo allá donde esté. Por todos esos dulces que siempre trae y que no pueden estar más ricos.

A todos los que formaron parte y pasaron por el L16 y que contribuyeron de alguna manera poniendo su granito de arena, gracias.

A María, mi compañera de piso, mi amiga y mi pilar en estos años. Por haber sido y ser un gran apoyo en todo momento, mi parte no tan racional y mi gran amiga. Por cuidarme y por estar de manera incondicional a mi lado, en los buenos y en los malos momentos, a pesar de todo. Por todos esos momentos de desahogo, risas y viajes inolvidables. Gracias por todo lo que hemos vivido durante este tiempo y por todo lo que nos depara el futuro. Esta tesis lleva parte de ti.

A todas esas personas del DIO que me ayudaron en algún momento. A Anabel por su ayuda y paciencia con algo que parecía imposible conseguir en un principio. A Mario, Yolanda y José Miguel, por sus consejos y por contribuir también a que eso fuera posible. A todos los predocs que ya han leído o que van a leer en breve y que me ayudaron o aconsejaron en algún momento. A Javi, por su ayuda con los modelos tumorales, a Lidia y Alfonso, por su compañía en citometría. A todos los Servicios del CNB. A Sylvia y Ana, por brindarme siempre su ayuda y tener siempre una sonrisa y cariño para todo el mundo. A Iván, por acompañarme en mis horas muertas en inoculados y por enseñarme algo todos los días y a Eber, por estar siempre disponible y ser tan amable. A Sara y MariCarmen por ayudarme siempre que lo necesité en citometría (que no fue poco...). A Juan Carlos y a Antonio, por su ayuda y su paciencia cuando bajábamos a almacén. A Carol y Santa, por siempre tener buenas sonrisas y bromas en la cafetería. Al Servicio de Microscopía Electrónica, a la gente de Cocinas y a la gente de Personal y de Recepción, por ayudar siempre en todo lo que podían.

A Puerto y todo su laboratorio, en especial a Lucía y Yurena, por enseñarme y ayudarme en el mundo de las nanopartículas. Gracias por todo el apoyo y los consejos.

A Jens, por dejarme formar parte de su grupo durante unos meses y por dejarme entrar en el mundo de la microscopía multifotónica. A todas las personas de allí, Ana, Flavian, Jun, Sujana, Nora, Yosuke, ... gracias por hacer de mi estancia en Berna una de las mejores experiencias que recuerdo. No sólo por lo que aprendí profesionalmente, sino también personalmente. En especial gracias a ti, Ana, por hacer que todo fuera mucho más fácil y por cuidarme tanto.

A mis amigas biotec, Lara, Rocío, Guada, Andrea, Eu y Coru, porque a pesar de la distancia y de que cada una estemos en una parte del mundo, siempre podremos contar las unas con las otras y apoyarnos. Por todos esos reencuentros pasados y los que vendrán.

A mis amigos de siempre, porque a pesar de que no entendían mi desesperación y frustración a veces, y no siempre podía unirme a ellos, siempre tenían palabras de apoyo y ánimo. En especial a Rocío, por estar siempre ahí, por cuidarme, por apoyarme incluso cuando tú no estabas bien, y por comprenderme tan bien aun sin entender nada de lo que te contaba. Porque a pesar de que ahora haya distancia de por medio, sé que siempre estarás ahí.

A Dani, por aparecer durante esta época de locura y estrés y aun así colmarse de paciencia y quedarse. Por motivarme siempre a continuar, y a confiar en mí. Le doy las gracias por todos los esfuerzos que ha hecho, por haberme hecho creer cada día que podría hacerlo y no dejarme tirar la toalla, por toda su ayuda y ánimo incondicional.

A Javi, porque juntos empezamos en el CNB durante el máster, y aunque se fue, siempre ha estado ahí y ha sabido escucharme, darme buenos consejos y motivarme (con sus audios que bien podrían ser un audiolibro). Por desatar la viajera que hay en mí y apoyarme en mis locuras.

A mi familia, y en especial a mis abuelos, por ser y haber sido tan especiales en mi vida y por quererme y apoyarme tanto, aun sin entender nada.

A mi hermana María, porque a pesar de ser tan diferentes me apoyas y confías en mí. Gracias por haberme aguantado estos últimos meses de escritura. Sé que no ha sido fácil, y que ha habido momentos muy complicados, pero esto sin ti no habría sido posible.

Por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida, mis padres, que siempre han luchado para que sea feliz y pueda elegir mi propio camino, que han hecho posible que pueda estudiar y trabajar en lo que me gusta, que siempre me han apoyado en todo (aunque no lo entendieran...) Sin vosotros esto no habría sido posible. No tengo palabras para expresar todo lo que os lo agradezco y lo que os quiero.

A las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante este trabajo y han hecho posible que hoy vea la luz.

Por todo lo que me habéis enseñado, por lo que me habéis aguantado, por vuestro tiempo, por todo esto y mucho más... muchísimas gracias.

*A mis padres, Luis Miguel y
Araceli, y a mi hermana María,
por su cariño y su apoyo
incondicional.*

*A mis abuelos, en especial a mi
abuelo Vítor, por estar siempre
conmigo.*

*“Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son
montañas, el agua es agua, y los árboles son árboles. Cuando
se ha estudiado y se ha leído, las montañas ya no son
montañas, el agua ya no es agua, y los árboles ya no son
árboles. Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son
montañas, el agua es agua y los árboles son árboles”*

Antiguo refrán del Budismo Zen

*“Hermoso es lo que vemos. Más hermoso es lo que sabemos.
Pero mucho más hermoso es lo que no conocemos”*

Niels Steensen

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. ABREVIATURAS	21
II. RESUMEN	27
III. ABSTRACT	31
IV. INTRODUCCIÓN	35
1. VISIÓN GLOBAL DEL SISTEMA INMUNE	37
2. INMUNIDAD Y CÁNCER	37
2.1. FASES DE INMUNOMODELADO DEL CÁNCER	39
2.1.1. Fase de eliminación	39
2.1.2. Fase de equilibrio	40
2.1.3. Fase de escape	40
3. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER	41
4. TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (ACT)	42
4.1. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS T	43
4.1.1. Células T y cáncer	43
4.1.2. Uso de células T en ACT	44
4.2. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS NK	46
4.2.1. Células NK y cáncer	46
4.2.2. Uso de células NK en ACT	48
5. LIMITACIONES EN ACT	50
6. NANOBIOMEDICINA	53
6.1. NANOPARTÍCULAS COMO BASE DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN LOCALIZADA	53
6.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS	54
6.2.1. Núcleo magnético	54
6.2.2. Recubrimiento de las NPMs	55
6.3. APLICACIÓN DE NPMs EN ACT	55
V. OBJETIVOS	57
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NPMs	63
1.1. Reactivos y compuestos	63
1.2. Síntesis de los núcleos de óxido de hierro	63
1.3. Recubrimiento de los núcleos de óxido de hierro	64
1.4. Caracterización de las NPMs	64
2. MEDIOS DE CULTIVO, SUPLEMENTOS Y SOLUCIONES TAMPÓN	65
3. RATONES	65

3.1. Ratones C57BL6 (Jackson Laboratories).....	65
3.2. Ratones C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb (Ratones OT-I) (Jackson Laboratories)	66
3.3. Ratones athymic nude-Foxn1 ^{nu} (Harlan Laboratories).....	66
3.4. Ratones C57BL/6 (Harlan Laboratories).....	66
3.5. Ratones C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ (“Ubi-GFP”) (Jackson Laboratories).....	66
4. CULTIVOS CELULARES	67
4.1. Líneas celulares	67
4.2. Aislamiento y cultivo de células primarias de ratón	68
4.2.1. Purificación de células T primarias.....	68
4.2.2. Purificación y expansión de células NK.....	68
4.2.3. Purificación y expansión de células OT-I.....	68
5. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE LAS NPMs	69
5.1. AlamarBlue/PrestoBlue	69
5.2. Anexina/PI	70
6. INCUBACIONES DE CÉLULAS CON NPMs	70
7. CUANTIFICACIÓN DE NPMs	71
8. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS NPMs	71
9. CITOMETRÍA DE FLUJO	72
9.1. Marcaje vivas/muertas.....	72
9.2. Marcaje de proteínas de membrana.....	73
9.3. Marcaje de proteínas intracelulares	73
10. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	73
11. ANÁLISIS METABÓLICOS EN TIEMPO REAL	74
12. MICROSCOPIA DE CALCIO	74
13. ENSAYOS DE MIGRACIÓN <i>IN VITRO</i> EN CÁMARAS DE FLUJO	75
14. ENSAYOS DE MIGRACIÓN <i>IN VITRO</i>	77
14.1. Ensayo en transwell.....	77
14.2. Ensayo “under agarose”	78
15. TRANSFERENCIA ADOPTIVA CELULAR Y HOMING	79
16. MICROSCOPIA DE ILUMINACIÓN SELECTIVA DE PLANOS	80
17. MICROSCOPIA MULTIFOTÓNICA	80
17.1. Transferencia de células T y microscopía multifotónica	80
17.2. Transferencia de DCs y microscopía multifotónica	81
18. ENSAYOS FUNCIONALES DE CÉLULAS LINFOIDES	83
18.1. Ensayos de conjugación	83
18.2. Ensayos de desgranulación	84

18.3. Ensayos de citotoxicidad	85
18.4. ELISA IFN- γ	86
18.5 Tinción intracelular de IFN- γ	86
19. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES	87
20. MODELO TUMORAL EG7-OVA	88
21. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS OT-I	88
21.1. Administración de los tratamientos.....	88
21.2. Procesamiento de las muestras biológicas recogidas	89
21.3. Análisis por citometría de flujo	90
22. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	90
VII. RESULTADOS	91
PARTE 1: INTERACCIÓN DE CÉLULAS T CON NPMs Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA.....	93
1.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPMs CON DIFERENTES CARGAS SUPERFICIALES PARA DIRECCIONAMIENTO MAGNÉTICO	93
1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE INCUBACIÓN CON LAS NPMs.....	95
1.3. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON MODELOS DE CÉLULAS T HUMANAS Y MURINAS	96
1.3.1. Evaluación de la toxicidad en los modelos de células T	97
1.3.2. Cuantificación del hierro asociado a los modelos de células T	98
1.3.3. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en los modelos de células T	100
1.3.4. Análisis fenotípico de los modelos de células T tras su asociación con NPMs ...	101
1.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN <i>IN VITRO</i>.....	103
1.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo).....	103
1.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico).....	106
1.5. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN <i>IN VIVO</i>	108
1.5.1. Evaluación de la capacidad de homing en ausencia o presencia de CMEs	108
1.5.2. Evaluación del comportamiento in vivo de las células T asociadas a NPMs en el NL.....	111
1.5.3. Evaluación del comportamiento in vivo de DCs asociadas a NPMs en el NL	116
1.6. PRINCIPALES OBSERVACIONES.....	118
PARTE 2: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS NPMs SOBRE CÉLULAS NK MURINAS Y HUMANAS Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA <i>IN VITRO</i>.....	119
2.1. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK MURINAS	119
2.2. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON MODELOS DE CÉLULAS NK HUMANAS Y MURINAS.....	120

2.2.1. Evaluación de la toxicidad en los modelos de células NK	120
2.2.2. Cuantificación del hierro asociado a los modelos de células NK	121
2.2.3. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en los modelos de células NK	122
2.1.4. Análisis fenotípico de los modelos de células NK tras su asociación con NPMs.	123
2.3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS MODELOS DE CÉLULAS NK HUMANAS Y MURINAS TRAS SU ASOCIACIÓN CON NPMs.....	125
2.3.1. Capacidad de conjugación con diversas líneas celulares diana	125
2.3.2. Capacidad de desgranulación frente a diferentes estímulos.....	128
2.3.3. Capacidad citotóxica frente a diversas líneas celulares diana	130
2.3.4. Capacidad de producción de IFN- γ tras su exposición a diferentes estímulos...	132
2.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN <i>IN VITRO</i>.....	134
2.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo).....	134
2.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico).....	134
2.5. CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS NK MURINAS ASOCIADAS A NPMs SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES <i>IN VITRO</i>	135
2.6. PRINCIPALES OBSERVACIONES	137
PARTE 3: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS NPMs SOBRE CÉLULAS T CD8⁺ CITOTÓXICAS Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i>.....	138
3.1. GENERACIÓN DE CÉLULAS T CD8⁺ CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE ANTÍGENO (OT-I)	138
3.1.1. Mantenimiento y fenotipaje de la cepa de ratones OT-I.....	138
3.1.2. Aislamiento y expansión de células OT-I.....	139
3.2. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON LAS CÉLULAS OT-I.....	139
3.2.1. Evaluación de la toxicidad en las células OT-I y cuantificación del hierro asociado.....	139
3.2.2. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en las células OT-I	141
3.2.3. Análisis fenotípico de las células OT-I tras su asociación con NPMs.....	142
3.3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD <i>IN VITRO</i> DE LAS CÉLULAS OT-I TRAS SU ASOCIACIÓN CON NPMs.....	143
3.3.1. Capacidad de conjugación y desgranulación	143
3.3.2. Capacidad citotóxica frente a células diana	145
3.3.3. Capacidad de producción de IFN- γ tras su exposición a diferentes estímulos...	145
3.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN <i>IN VITRO</i>.....	146
3.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo).....	146
3.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico).....	148
3.5. CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS OT-I ASOCIADAS A NPMs SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES <i>IN VITRO</i>	148

3.6. TRANSFERENCIA DE CÉLULAS OT-I ASOCIADAS CON NPMs EN PRESENCIA DE UN CME EN UN MODELO TUMORAL SINGÉNICO	150
3.6.1. Generación de un modelo tumoral singénico	150
3.6.2. Transferencia celular	151
3.6.3. Análisis de las muestras biológicas	152
VIII. DISCUSIÓN	161
1. EVALUACIÓN DE ASPECTOS BÁSICOS ENTRE LA INTERACCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES Y NPMs Y SU RETENCIÓN MAGNÉTICA <i>IN VIVO</i> EN NLs COMO PRUEBA DE CONCEPTO	163
2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS EFECTORAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CON NPMs Y SU RETENCIÓN MAGNÉTICA <i>IN VIVO</i> EN UN MODELO TUMORAL	170
IX. CONCLUSIONES	179
X. CONCLUSIONS	183
XI. BIBLIOGRAFÍA	187
XII. ANEXO I. Pies de figura de los vídeos	205
XIII. ANEXO II. Artículos publicados (o en revisión) durante esta Tesis	209

I. ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- 2PM:** microscopía multifotónica, del inglés *two-photon microscopy*
- ACT:** terapia adoptiva celular, del inglés *adoptive cell therapy*
- ADCC:** citotoxicidad celular mediada por anticuerpos, del inglés *antibody-dependent cellular cytotoxicity*
- ALL:** leucemia linfocítica aguda, del inglés *acute lymphoid leukemia*
- AML:** leucemia mieloide aguda, del inglés *acute myeloid leukemia*
- APS:** (3-aminopropil)trimetoxisilano
- BSA:** albúmina de suero bovino, del inglés *bovine serum albumin*
- CAR:** receptor de antígeno quimérico, del inglés *chimeric antigen receptor*
- CCL:** ligando de quimioquina CC, del inglés *CC chemokine ligand*
- CCR:** receptor de quimioquina CC, del inglés *CC chemokine receptor*
- CD:** clúster/conjunto de diferenciación
- CME:** campo magnético externo
- CPA:** célula presentadora de antígeno
- CTL:** linfocito T citotóxico, del inglés *cytotoxic T-lymphocyte*
- CTLA-4:** antígeno 4 del linfocito T citotóxico, del inglés *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*
- CXCR:** receptor de quimioquina CXC, del inglés *CXC chemokine receptor*
- DC:** célula dendrítica, del inglés *dendritic cell*
- DLS:** dispersión dinámica de luz, del inglés *dynamic light scattering*
- DMEM:** medio *Dulbecco's Modified Eagle's*
- DMSA:** ácido dimercaptosuccínico, del inglés *dimercaptosuccinic acid*
- DTA:** análisis térmico diferencial, del inglés *differential thermal analysis*
- ECAR:** tasa de acidificación extracelular, del inglés *extracellular acidification rate*
- ECM:** matriz extracelular, del inglés *extracellular matrix*
- ELISA:** ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*
- FBS:** suero fetal bovino, del inglés *fetal bovine serum*
- FDA:** Administración de Alimentos y Medicamentos, del inglés *Food and Drug Administration*
- FITC:** fluoresceína isotiocianato
- FTIR:** espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier, del inglés *Fourier-transform infrared spectroscopy*
- G418:** genética
- GFP:** proteína verde fluorescente, del inglés *green fluorescent protein*
- HBSS:** solución salina de Hanks, del inglés *Hanks' balanced salt solution*
- HEV:** vénulas del endotelio alto, del inglés *high endothelial venules*
- HLA:** antígeno leucocitario humano, del inglés *human leukocytic antigen*
- ICAM-1:** molécula de adhesión intracelular 1, del inglés *intercellular adhesion molecule 1*
- ICI:** inhibidor de puntos de control inmune, del inglés *immune checkpoint inhibitor*
- ICP-OES:** plasma de acoplamiento inductivo acoplado a espectrometría de emisión óptica del inglés *inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*
- IFN- γ :** interferón gamma

IL-: inter-leuquina

KIR: del inglés killer-cell immunoglobulin-like receptor

LAK: célula asesina activada por linfoquina, del inglés *limphokine-activated killer cell*

LAL: lisado del amebocito limulus

LFA-1: antígeno leucocítico funcional 1, del inglés, *lymphocyte function associated antigen 1*

LN: del inglés *lymph node*

LPS: lipopolisacárido

Ly49: del inglés *killer cell lectin-like receptor subfamily 49*

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés *major histocompatibility complex*

MNPs: del inglés *magnetic nanoparticles*

MTOC: centro organizador de microtúbulos, del inglés *microtubule-organizing center*

NGR: péptido asparagina-glicina-arginina

NK: asesina natural, del inglés *natural killer*

NL: nódulo linfático

NP: nanopartícula

NPM: nanopartícula magnética

OCR: tasa de consumo de oxígeno, del inglés *oxygen consumption rate*

OVA: ovoalbúmina

OVA₂₅₇₋₂₆₄: fragmento peptídico (257-264) de OVA (SIINFEKL)

PBS: tampón salino fosfato, del inglés *phosphate buffered saline*

PD-1: proteína de muerte celular programada 1, del inglés *programmed cell death protein 1*

PD-L1: ligando 1 de muerte celular programada 1, del inglés *programmed death-ligand 1*

PDI: índice de polidispersidad, del inglés *polydispersity index*

PFA: paraformaldehído

PMA: forbol-12-miristato-13-acetato del inglés *phorbol 12-myristate 13-acetate*

PI: yoduro de propidio, del inglés *propidium iodure*

RGR: péptido asparagina-glicina-asparagina

RPMI: medio *Roswell Park Memorial Institute*

ROS: especies reactivas de oxígeno, del inglés *reactive oxygen species*

S1P: esfingosina-1-fosfato, del inglés *sphingosine-1-phosphate*

S1PR1: receptor 1 esfingosina-1-fosfato, del inglés *sphingosine-1-phosphate receptor 1*

SPIM: microscopía de iluminación selectiva de planos, del inglés *selective plane illumination microscopy*

TA: temperatura ambiente

TAA: antígeno tumoral, del inglés *tumor-associated antigen*

TBS: tampón tris salino, del inglés *tris-buffered saline*

TCR: receptor de células T, del inglés *T-cell receptor*

TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés *transmission electronic microscopy*

TG: termogravimétrico

TGF- β : factor de crecimiento transformante-beta, del inglés *transforming growth factor- β*

TIL: linfocito infiltrado en tumor, del inglés *lymphocyte infiltrating tumor*

TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa, del inglés *tumor necrosis factor- α*

TRAIL: ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral, del inglés *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TRITC: tetrametilrodamina isotiocianato

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular, del inglés *vascular endothelium growth factor*

VLA-4: antígeno de activación muy tardía 4, del inglés *very late antigen-4*

WGA: aglutinina de germen de trigo del inglés *wheat germ agglutinin*

II. RESUMEN

La transferencia adoptiva celular, un tipo de inmunoterapia antitumoral muy prometedora, utiliza células inmunes de un paciente o donante, que pueden ser modificadas y expandidas *ex vivo* y reinfundidas de nuevo en el paciente, con el fin de que migren al tumor y medien su destrucción. Sin embargo, una de sus principales limitaciones es el tráfico ineficiente de células efectoras y el pequeño porcentaje de las mismas que consigue mantenerse activo y migrar e infiltrarse en el tumor. Actualmente existen diversas estrategias destinadas a derribar las barreras que restringen la entrada eficiente de las células efectoras en el ambiente tumoral. Sin embargo, sería de gran interés una aproximación más general, con el objetivo de mejorar y facilitar la migración de células inmunes activas de manera específica hacia cualquier tumor.

En esta tesis nos propusimos analizar si era posible mejorar la retención de células linfoides mediante la utilización combinada de nanopartículas magnéticas y la aplicación de un campo magnético externo, para promover su acumulación e infiltración en el tumor. Hemos observado que, a diferencia de otros tipos celulares (macrófagos o células tumorales), las células linfoides, como células T o NK, son incapaces de internalizar estas nanopartículas, las cuales permanecen en asociación con la membrana plasmática, sin causar toxicidad. La presencia de nanopartículas magnéticas en las células T, así como la aplicación específica de un campo magnético externo, aumenta su retención en nódulos linfáticos, lo que podría ser útil en algunas patologías como ciertos desórdenes autoinmunes. Las células linfoides con actividad citolítica como células T CD8⁺ y NKs son capaces de preservar su función antitumoral *in vitro* en asociación con nanopartículas magnéticas. De igual manera, la asociación de estas nanopartículas con células T CD8⁺ citotóxicas no afecta tampoco a su capacidad antitumoral *in vivo*, así como a su migración e infiltración en el tumor en un modelo *in vivo*. En un modelo murino tumoral, donde el tumor expresa un antígeno de OVA (OVA257-264), la aplicación de un imán sobre el tumor durante, y después, de la transferencia adoptiva de células T CD8⁺ que expresan un receptor transgénico específico del péptido y están asociadas con nanopartículas magnéticas, no produjo un incremento significativo en la infiltración de dichas células en el tumor en comparación con la transferencia de las mismas sin la aplicación del imán. Sin embargo, indujo una mayor activación de dichas células T CD8⁺ (mayor expresión de CD25 e IFN- γ) sobre todo en comparación con la transferencia de las células sin nanopartículas, y promovió, además, una mayor acumulación de estas células T CD8⁺ específicas y más activadas en el nódulo linfático que drena el tumor. Los resultados nos permiten concluir que las nanopartículas magnéticas, así como su localización específica mediante el uso de campos magnéticos externos, pueden servir como plataforma para resolver algunas de las limitaciones, tales como la baja eficiencia en el tráfico linfocitario, que presentan algunas inmunoterapias antitumorales actuales.

III. ABSTRACT

Adoptive cell transfer therapy is a promising antitumour immunotherapy that uses immune cells, originated from a patient or a donor, that can be modified and expanded *ex vivo* and reinfused again into the patient, so that they can migrate to the tumour and destroy it. However, one of its main limitations is the inefficient trafficking of effector cells and the small percentage of them that remain active and succeed in reaching the tumour. Nowadays, there are different strategies to reduce and bring down the barriers that restrict the efficient entry of effector cells into the tumour environment. However, it would be of great interest to develop a more general approach, in order to improve and facilitate the migration of specific active lymphoid cells to any tumour.

In this work, we proposed to analyse whether it was possible to improve lymphoid cells localization by combining the use of magnetic nanoparticles and the application of an external magnetic field, to promote their accumulation and retention in the tumour. We have shown that, unlike other cell types (macrophages or tumour cells), lymphoid cells, such as T cells or NK cells, are unable to internalize these nanoparticles, which remain in association with the plasma membrane, without causing any toxicity. The presence of magnetic nanoparticles in T cells, as well as the targeted application of an external magnetic field, increases their retention in lymph nodes, which could be useful to control some pathologies such as certain autoimmune disorders. Cytolytic lymphoid cells, such as CD8⁺ T and NK cells, retain their antitumour function *in vitro* when associated with magnetic nanoparticles. Similarly, the association of these nanoparticles with cytotoxic CD8⁺ T cells does not affect their antitumour capacity *in vivo*, as well as their migration and infiltration into the tumour in an *in vivo* model. The application of a magnet on the tumour, in a murine tumour model, where the tumour expresses an OVA antigen, during and after the adoptive transfer of CD8⁺ T cells expressing a transgene receptor specific for the peptide and associated with magnetic nanoparticles, did not produce a significant increase in the infiltration of those cells in the tumour compared to the transfer in the absence of the magnet. However, it induced a greater activation of the CD8⁺ T cells, with a higher expression in CD25 and IFN- γ markers, especially in comparison with the transfer of cells without nanoparticles, and promoted, in addition, a greater accumulation of these specific and more activated CD8⁺ T cells in the tumour-draining lymph node.

These results allow us to conclude that magnetic nanoparticles, as well as their specific targeting through the application of external magnetic fields, can serve as a platform to solve some of the limitations, such as the low efficiency in lymphocyte trafficking, that some current antitumour immunotherapies present.

IV. INTRODUCCIÓN

1. VISIÓN GLOBAL DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune está compuesto por un conjunto de células, proteínas, tejidos y órganos que trabajan en conjunto con el objetivo de proteger continuamente al individuo frente a la invasión de otros organismos o sustancias que pueden causar diversas enfermedades. El sistema inmune **está equilibrado de manera precisa y puede distinguir entre los componentes que pertenecen al propio organismo y aquellos que son extraños** a él y así eliminarlos sin dañar al organismo [1]. Además, también tiene un papel antitumoral, ya que puede reconocer y eliminar las células pre-tumorales y tumorales, debido a las modificaciones que sufren durante la transformación tumoral y que las hacen ser reconocidas como extrañas. Sin embargo, en ciertas circunstancias, la **ruptura de este equilibrio (Fig. 11)** puede dar lugar a una respuesta inmune descontrolada donde las células del propio organismo se ven atacadas dando lugar a diversos **desórdenes autoinmunes** [2, 3]. Por otro lado, también hay situaciones en las que existe una disminución de la eficacia de dicha respuesta inmune frente al desarrollo de tumores o presencia de patógenos, impidiendo su correcto reconocimiento y eliminación y dando lugar al desarrollo de **cáncer e infecciones**. De esta manera se pone de manifiesto que los componentes que constituyen el sistema inmune juegan un papel clave en el tratamiento contra estas situaciones patológicas.

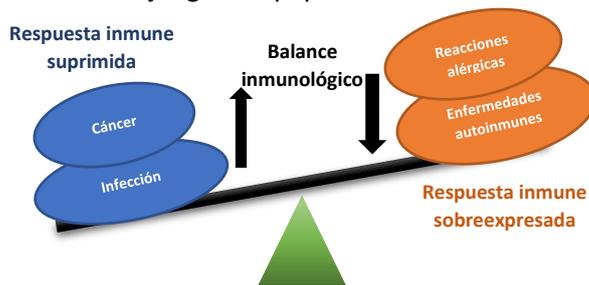


Fig. 11. La ruptura del equilibrio del sistema inmune puede dar lugar a diferentes situaciones patológicas. La restauración del balance inmunológico, como se indica en la figura en cada caso, resolvería dichas patologías.

2. INMUNIDAD Y CÁNCER

Como se ha visto, **una de las funciones fisiológicas del sistema inmune es reconocer y eliminar las células transformadas del organismo originadas por la transformación tumoral**. Las primeras evidencias científicas que pusieron de manifiesto la activación del sistema inmune en individuos con un tumor se encuentran recogidas en numerosas descripciones histopatológicas de principios del siglo XIX. En ellas se describía la presencia de células inflamatorias atraídas hacia el foco tumoral, lo que se interpretó como un intento para detener el desarrollo de la enfermedad por parte del sistema inmune del paciente. En 1890, William Coley observó que, a veces, el tumor remitía después de que el paciente sufriese una infección y estaba convencido de que existía una relación entre la remisión del tumor y la activación del sistema inmune provocada por la bacteria responsable de la infección [4]. Más adelante, Paul Ehrlich fue el primero en plantear, de manera teórica, la idea de que de forma espontánea y frecuente surgen células tumorales y que el sistema inmune puede eliminarlas y evitar el desarrollo de la

enfermedad. De esta manera se daba base teórica a las observaciones hechas previamente por Coley. En los años 50, se llevaron a cabo una serie de estudios mediante los cuales se observaron que unos ratones eran capaces de generar una respuesta inmune tras una segunda infusión de células tumorales. De esta manera se puso de manifiesto la existencia de los **antígenos asociados a tumor (TAA)** [5, 6].

En 1957, la **teoría de la inmunovigilancia** (*cancer immunosurveillance*) fue establecida por Frank M. Burnet y Lewis Thomas. Según esta teoría, los linfocitos eliminarían a los tumores en sus fases iniciales debido a que las células transformadas expresan antígenos específicos que permitirían su identificación y eliminación por parte del sistema inmune [7-9]. Más adelante, a finales de los años 90, experimentos en ratones inmunodeficientes, mostraron una mayor incidencia en tumores en comparación con ratones inmunocompetentes o inmunocomprometidos [10, 11], validando así la teoría de la inmunovigilancia del cáncer propuesta por Burnet y Thomas. Finalmente, en el siglo XXI, Schreiber acuñó el concepto de **inmunomodelado del cáncer** (*cancer immunoediting*) (Fig. 12), que ampliaba y abarcaba el término de inmunovigilancia. En él, se propone un **modelo de interacción entre el sistema inmune y el tumor** en el que se distinguen tres fases: eliminación, equilibrio y escape, que explican los diversos eventos inmunológicos desde que una célula tumoral se transforma hasta que el tumor se manifiesta clínicamente [12].

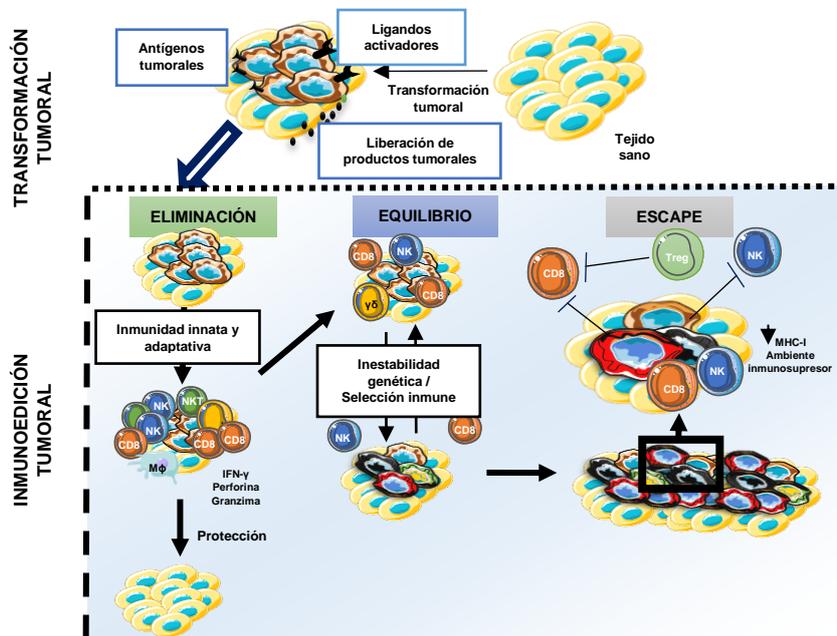


Fig. 12. Proceso de inmunomodelado del cáncer. Tras la transformación tumoral y el fallo de los mecanismos intrínsecos de supresión de tumores, el sistema inmune detecta el tumor en desarrollo. El resultado dependerá de si es eliminado por las respuestas inmunes innata y adaptativas del propio huésped (fase 1), si permanece en un estado de equilibrio (fase 2) o si se desarrollan mecanismos de escape a los mecanismos extrínsecos supresores de tumores (fase 3).

2.1. FASES DE INMUNOMODELADO DEL CÁNCER

2.1.1. Fase de eliminación

Esta primera etapa representa la idea clásica de la inmunovigilancia del cáncer propuesta por Burnet y Thomas en 1957. **El sistema inmunitario, tanto innato como adaptativo, es capaz de reconocer TAAs y desarrollar una respuesta efectora adecuada sobre las células transformadas que los expresan [13] (Fig. 13).** En esta etapa tiene lugar una remodelación del estroma y todo el microambiente tumoral comienza a secretar moléculas proinflamatorias con el fin de reclutar células inmunes asociadas con la respuesta inmune innata, tales como las células NK y NKT, linfocitos T $\gamma\delta$, macrófagos y DCs [14, 15]. Estas células efectoras identifican a las células tumorales e interaccionan con ellas, favoreciéndose su activación y produciendo diversas citoquinas como el IFN- γ , ayudando así a la eliminación de las células tumorales [16, 17].

En esta fase, las células NK destruyen gran parte del tumor a través de diferentes mecanismos [18-20]. Esta destrucción de células tumorales liberaría una gran cantidad de TAAs, que serían posteriormente captados por las células presentadoras de antígenos (CPA), que los fagocitarían comenzando así la respuesta inmune adaptativa. Las DCs inmaduras migrarían a los nódulos linfáticos (NLs) cercanos al tumor, donde presentarían dichos TAAs fagocitados a los linfocitos T naïve. Tras ser activados, los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ específicos contra esos TAAs se infiltrarían en el tumor y llevarían a cabo su función de manera específica contra las células tumorales para así eliminarlas [21, 22].

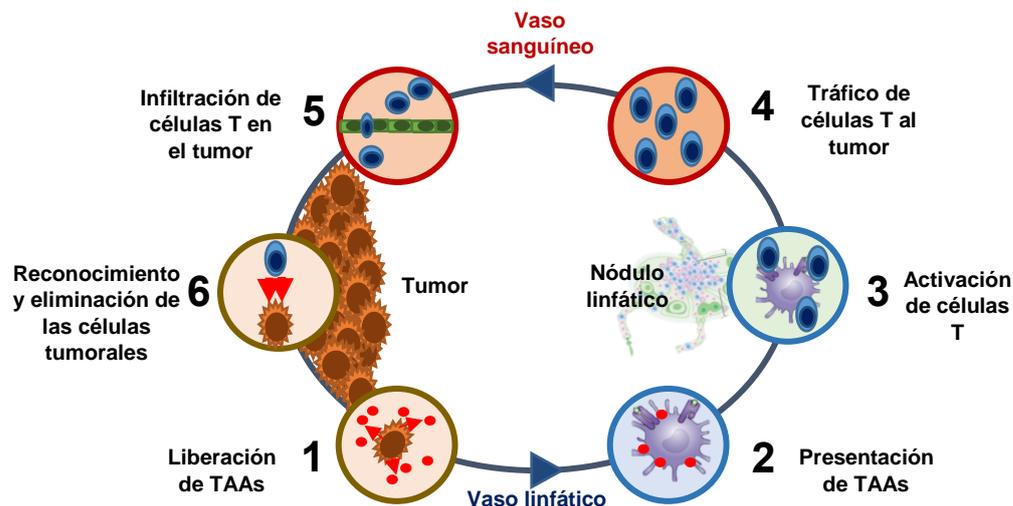


Fig. 13. Ciclo de inmunidad antitumoral. Los TAAs liberados son reconocidos por CPAs, que maduran y migran hacia los NLs, dando lugar a la proliferación y activación de células T. Las células T activadas migran hacia el tumor, donde se infiltran y eliminan las células tumorales. Finalmente, nuevos TAAs liberados inducen otra ronda de respuesta inmune, dando lugar al ciclo de inmunidad antitumoral.

2.1.2. Fase de equilibrio

Durante la primera fase se destruyen una gran cantidad de células tumorales. No obstante, en ocasiones algunas de estas células evaden al sistema inmune y pueden seguir desarrollándose en un individuo inmunocompetente. Esta teoría propone una **fase temporal de equilibrio dinámico entre el sistema inmune y el tumor en progreso**, que puede prolongarse por tiempo variable. Durante esta etapa se originan nuevas variantes celulares con diversas mutaciones que les permiten evadir y resistir al ataque del sistema inmune. La gran plasticidad genética de las células tumorales, debido a la inestabilidad genética y cromosómica asociada al cáncer, puede dar lugar a la aparición de nuevos fenotipos, incluso con menor inmunogenicidad, generándose así tumores de gran heterogeneidad [23]. En este paso, el tumor puede progresar de maneras diversas: puede ser eliminado por parte del sistema inmune, puede permanecer en dicha etapa de equilibrio de forma prolongada o puede escapar de la presión ejercida por sistema inmune y avanzar hacia la fase final [24].

2.1.3. Fase de escape

En esta última fase, **las variantes tumorales que han progresado**, debido a su baja inmunogenicidad y su capacidad para evadir al sistema inmune, **se desarrollan en un entorno inmunológicamente activo y se manifiestan clínicamente**. Estas variantes **son capaces incluso de inducir cierta supresión inmunológica o tolerancia** [25]. Algunas células tumorales son capaces de perder o disminuir la cantidad de moléculas del MHC de clase I (MHC-I), denominadas HLA en humanos, o de los mecanismos de procesamiento y presentación antigénica, para evitar el reconocimiento tumoral por parte de los linfocitos T citotóxicos [26]. Asimismo, también son numerosos los factores solubles producidos y liberados, no solo por las células tumorales, sino también por ciertos tipos celulares inmunes. Por ejemplo, los linfocitos T reguladores pueden migrar hacia el tumor y constituir una fuente principal de TGF- β , una potente citoquina inmunosupresora [27], induciendo así un estado de tolerancia inmunológica [28]. Otros factores solubles inmunosupresores producidos, en este caso, por células tumorales, son la citoquina IL-10 [29], VEGF [30], Fas soluble [31] y FasL soluble y los ligandos solubles de receptores activadores e inhibidores de las células NK [32, 33]. Todos estos y otros factores, así como las células del propio microambiente tumoral, contribuyen a la generación de un ambiente inmunosupresor favorable para el mantenimiento y desarrollo tumoral incontrolado y finalmente, a la manifestación clínica de la enfermedad.

3. INMUNOTERAPIA DEL CÁNCER

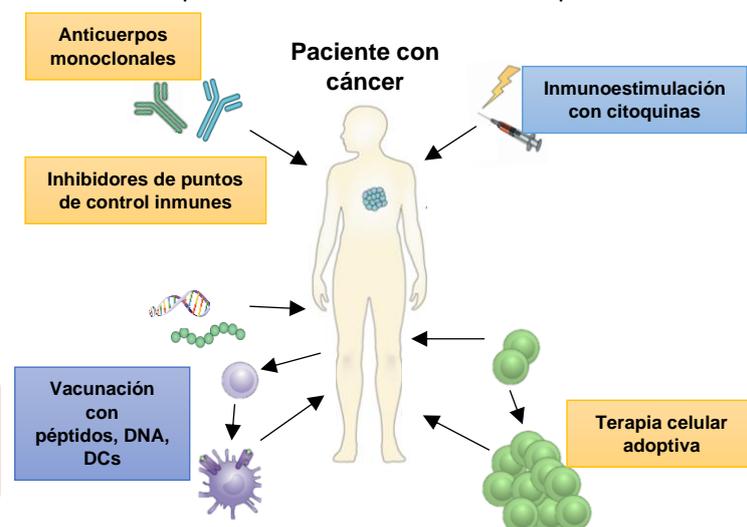
Como se ha comentado **la inmunidad antitumoral no funciona de manera correcta en los pacientes con cáncer** debido a diversas causas como i) la incapacidad para poder detectar los diferentes TAAs, ii) el reconocimiento de los antígenos tumorales como propios creando una respuesta reguladora más que efectora, iii) la reducida infiltración de las células efectoras en el tumor y iv) la presencia de ciertos factores que generen un ambiente inmunosupresor [34].

Durante décadas, las terapias tumorales convencionales en cáncer han sido la cirugía, la quimioterapia y la radioterapia. Sin embargo, la existencia de una alta tasa de reincidencia en cáncer, así como los numerosos efectos secundarios que producen, ponen de manifiesto la necesidad de nuevos tratamientos alternativos con el objetivo de eliminar estas limitaciones y problemas. De esta manera, en los últimos años ha resurgido el concepto de **inmunoterapia**, que busca la modulación de la respuesta inmune, como una de las terapias más prometedoras para solucionar dichos problemas [1]. La idea de **modular la respuesta inmune de manera específica con el fin de reestablecer el equilibrio** es muy atractiva. La **inmunoterapia antitumoral** se basa en la manipulación o en la utilización de componentes del sistema inmune para potenciar su respuesta con el fin de vencer los mecanismos de escape a la vigilancia inmunológica y establecer una respuesta antitumoral efectiva [35, 36].

Como se ha podido ver, tanto el sistema inmune innato como adaptativo tienen papeles clave en la respuesta inmune antitumoral. Actualmente, existen diferentes estrategias en la inmunoterapia del cáncer, que incluyen tanto estrategias pasivas como activas [37, 38]. La **inmunoterapia activa** tiene como objetivo estimular el sistema inmune para atacar a las células tumorales mediante vacunación, inmunomodulación no específica o a través de la activación de receptores específicos de antígeno, mientras que la **inmunoterapia pasiva** consiste en la administración de agentes tales como anticuerpos monoclonales o linfocitos que aumentarían la respuesta antitumoral existente [39]. Estas estrategias también pueden ser específicas o inespecíficas. A continuación, se comentan las más utilizadas

(Fig. 14).

Fig. 14. Principales estrategias activas (azul) y pasivas (amarillo) utilizadas en inmunoterapia del cáncer.



Dentro de la **inmunoterapia activa**, destaca como estrategia específica la **vacunación**, que estimula el sistema inmune para atacar y eliminar las células tumorales. Las vacunas antitumorales pueden estar basadas **en péptidos, en DCs o en células tumorales** [40-42]. Como estrategia no específica se encuentran las **citoquinas**, moduladores inmunes producidos de manera natural por diferentes tipos celulares inmunes [42] que pueden amplificar o suprimir de manera directa la respuesta de células T frente al tumor. Su administración sistémica fue una de las primeras aproximaciones en inmunoterapia antitumoral [41] y las más utilizadas en este ámbito son el **IFN- γ** y la **IL-2**, aunque otras muchas están siendo investigadas [42].

Dentro de la **inmunoterapia pasiva**, destacan como estrategias específicas los **anticuerpos monoclonales** así como los **inhibidores de puntos de control inmunes (ICIs)**. Los anticuerpos monoclonales son proteínas de gran tamaño producidas por un clon B específico que presentan especificidad frente a un único antígeno que les permite unirse a epítopos tumorales. Han sido utilizados en el tratamiento de diversos cánceres [43], solos o en conjugación con diversos fármacos quimioterapéuticos, actuando como plataforma para dirigirlos hacia el tumor [40, 41]. Los ICIs previenen la unión de ciertos ligandos a las células T evitando su ataque al tumor [43], por lo que están dirigidos a eliminar la inmunosupresión, produciendo respuestas antitumorales más prolongadas [42, 44-46]. Los más utilizados van dirigidos a bloquear receptores ICIs como CTLA-4 y PD-1, o sus ligandos (PD-L1) [41, 47, 48]. Como estrategia no específica se encuentra la **terapia celular adoptiva (ACT)**. Este trabajo se centra en la mejora de esta estrategia, que se desarrolla a continuación en mayor profundidad.

4. TERAPIA CELULAR ADOPTIVA (ACT)

La **ACT** consiste en el **aislamiento de células inmunes de un paciente o donante, que pueden ser modificadas y expandidas *ex vivo* bajo condiciones óptimas y en ausencia de factores supresores y reinfundidas de nuevo en el paciente** [49-51]. Esta aproximación se basa en la idea de que una amplia población de células con actividad antitumoral activadas *ex vivo* e inoculadas de nuevo migrará hacia el tumor y mediará su destrucción. Los primeros ensayos clínicos fueron llevados a cabo por Rosenberg et al, quienes usaron células killer activadas por linfoquinas (células LAK), que consisten en células mononucleares de sangre periférica autólogas y activadas con IL-2, junto con altas dosis de IL-2, para el tratamiento de tumores como el melanoma o el cáncer colorrectal [52]. Sin embargo, el beneficio clínico fue limitado, ya que las altas dosis de IL-2 inducían cierta toxicidad severa [53]. Desde entonces, **diferentes tipos celulares, basados en células T o NK principalmente, han sido investigados para su uso en ACT.**

4.1. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS T

4.1.1. Células T y cáncer

Las células T progenitoras se originan de células madre hematopoyéticas procedentes de la médula ósea, maduran en el timo y posteriormente, son liberadas hacia tejidos periféricos, donde pueden ser activadas. La maduración de estas células implica una **reorganización en los genes que codifican el receptor de las células T (TCR)** ya que se producen una serie de eventos de recombinación aleatoria en etapas tempranas de la producción de los TCRs. De esta manera se origina un **repertorio muy diverso de TCRs** que pueden reconocer gran variedad de antígenos [54].

Las células T circulan en la sangre en estado de reposo y migran hacia las vénulas de endotelio alto (HEVs) debido a la presencia de diversas quimioquinas, como CCL19 y CCL21 [55]. Las células T naïve o vírgenes, que no se han encontrado aún con un antígeno y expresan CCR7, permanecen en los tejidos linfoides secundarios. Cuando el TCR de una célula T naïve se encuentra con un antígeno presentado por las moléculas MHC de una CPA, se produce la activación de dicha célula. La unión de las células T CD8⁺ o CD4⁺ con las moléculas MHC-I o MHC-II respectivamente, produce una fuerte interacción entre ambas células formando la **sinapsis inmunológica**, proceso dinámico y clave para la activación de las células T. Tras la activación, se genera un gran número de **células T efectoras** y de algunas **células T de memoria**. Las primeras son capaces de secretar citoquinas y tienen actividad citotóxica mientras que las segundas son células quiescentes que permanecen y podrían reaccionar rápidamente a un segundo enfrentamiento con el mismo antígeno [56]. Las células T efectoras migrarían hacia los sitios de inflamación para llevar a cabo su función. Existen **diversos tipos de células T efectoras**. Las células T CD4⁺ colaboradoras producen citoquinas como IL-2 para proporcionar señal de supervivencia esencial para las células T y ayudar a las células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) en su función. **Las CTLs**, por otro lado, **son capaces de secretar gránulos a través de su membrana y liberar perforina y granzima**. La perforina crea poros transmembrana que permiten la difusión de granzimas en el interior de la célula diana, produciendo su apoptosis [57]. Además, durante la liberación de granzimas, las células T sobreexpresan CD107a en su membrana para protegerse de las perforinas. Por tanto, **CD107a se considera un marcador de desgranulación de las células T, así como de las células NK**, relacionado indirectamente con su capacidad citotóxica [58]. Por otro lado, la activación de estas células puede ser inhibida por células T reguladoras y moléculas inhibidoras. Es importante la regulación cuidadosa de las respuestas inmunes para poder evitar una sobre activación cuando el patógeno o célula maligna ya han sido eliminados.

4.1.2. Uso de células T en ACT

A pesar de que las células T CD4⁺ juegan un papel importante en el inicio y mantenimiento de las respuestas inmunes, las células T CD8⁺ citotóxicas han sido las más utilizadas en la ACT [49, 59]. Esto es debido a que son los efectores dominantes que median la destrucción tumoral [60]. Además, el reconocimiento antigénico de las células T CD4⁺ se restringe al MHC-II mientras que el de las células T CD8⁺ lo hace con MHC-I [61] y la mayoría de los tumores no expresan MHC-II [62]. La primera transferencia de células T se realizó en 1988, utilizando linfocitos infiltrados en el tumor (TILs) de un paciente de melanoma metastático [63]. A partir de aquí, se han utilizado diversas estrategias en la transferencia de células T (Fig. 15), las cuales se recogen a continuación.

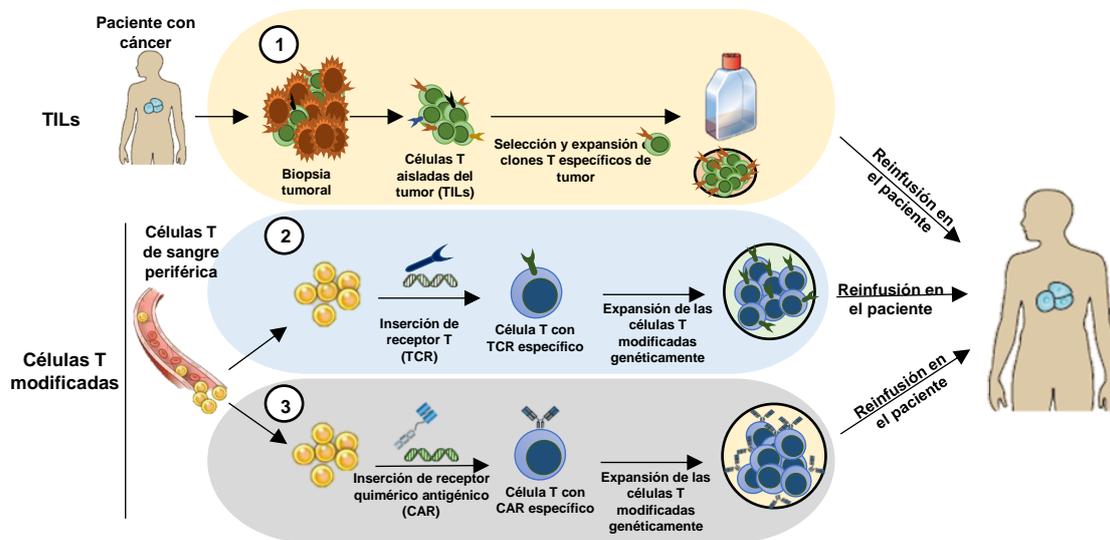


Fig. 15. Estrategias utilizadas en la transferencia de células T en cáncer. La ACT de células T puede utilizar 1) linfocitos infiltrados en el tumor del propio paciente, o células T modificadas genéticamente mediante 2) TCRs o 3) CARs diseñados específicamente contra un TAA.

4.1.2.1. Linfocitos T citotóxicos (CTLs)

Los CTLs pueden obtenerse a partir de células mononucleares de sangre periférica o de TILs. En el primer caso, se pueden utilizar células tumorales autólogas como fuente de antígeno para la estimulación y expansión *ex vivo*. En el caso de las TILs, pueden ser aisladas a partir de biopsias de tumores, expandidas y activadas *in vitro* en presencia de IL-2 y reinfundidas de nuevo en el paciente [64]. Los TILs representan una fuente de células T reactivas al tumor y autólogas, sin la necesidad de buscar antígenos específicos del tumor en el paciente.

Esta aproximación se caracteriza por su alta especificidad por los TAAs. **El aprovechamiento del potencial citotóxico de las células T da lugar a una actividad antitumoral poderosa y específica y reduce, por tanto, el daño en el tejido adyacente y sano.** En muchos casos, se ha observado que esta terapia tiene mejor eficacia en el control tumoral que otros agentes quimioterapéuticos

[65]. De hecho, en el tratamiento del melanoma metastásico, la ACT es uno de los tratamientos más efectivos, consiguiendo respuestas duraderas en alrededor del 50% de los pacientes [66-69]. Actualmente, existen numerosos ensayos clínicos en todo el mundo que utilizan esta estrategia. No obstante, la terapia con TILs se ha visto limitada al melanoma, posiblemente debido a la facilidad para obtener muestras del tejido tumoral, a la alta frecuencia de mutaciones que proporciona numerosos y únicos TAAs y a que es muy inmunogénico y de manera natural genera gran cantidad de células T antitumorales *in vivo* [67]. Es por esto, que esta ACT no ha logrado resultados comparables en el tratamiento de otros cánceres tales como glioma [70], y sarcoma sinovial metastático [71]. Además, se suma que, en numerosas ocasiones, no es posible acceder a muestras del tumor o a un reducido número de TILs en él.

4.1.2.2. Células T modificadas

• TCRs genéticamente diseñados

Otra alternativa sería el uso de células T modificadas. Como se comentó previamente, el TCR, junto con la recombinación aleatoria de sus genes, permite a las células T dirigir su actividad frente a diferentes antígenos de manera específica. En aquellos pacientes donde no se pueden obtener o generar los TILs y las células T específicas de tumor, es posible la **introducción de TCRs clonados con alta afinidad por un TAA que se presenta por MHC-I y de esta manera diseñar células T con TCRs específicos** de tumor para determinados TAAs. Por ejemplo, existen TCRs clonados específicos frente a MART-1, un antígeno de melanoma, que pueden ser introducidos en linfocitos humanos, para tratar específicamente a pacientes con tumores positivos en este antígeno [72]. En otro ensayo clínico, células T transformadas con un TCR específico para el antígeno NY-ESO-1 se logró la regresión tumoral en el 50% de pacientes con melanoma metastático y sarcoma [73]. Transformar células T con genes específicos es una poderosa herramienta para generar células T específicas de un tumor. Desafortunadamente, uno de los principales mecanismos de escape para evadir la actividad de las células T es la disminución en la expresión del MHC [74], con el fin de evitar el reconocimiento y la respuesta antitumoral.

• Receptores de antígeno quiméricos (CARs)

Los **receptores de antígeno quiméricos (CAR)** resolverían este problema de inmunoevasión ya que se les **dota a las células T de receptores artificiales compuestos por partes de diferentes anticuerpos y que serían específicos de una proteína o antígeno tumoral** [75]. Los CARs están compuestos por un dominio extracelular de unión a antígeno fusionado con un dominio intracelular de señalización de células T, cuya señal puede ser amplificada mediante la adición de moléculas coestimuladoras como CD28 [76]. El lugar de unión de los CARs reconoce de

manera específica un antígeno con gran afinidad. Actualmente existen diversidad de estudios de su uso en inmunoterapia antitumoral [77-80]. En concreto, numerosos ensayos clínicos utilizando células T con CARs frente a CD19 en linfomas de células B han mostrado respuestas remarcables y duraderas [81] y la FDA ha aprobado dos de estas terapias en 2017. Sin embargo, a pesar de ser una estrategia prometedora, existen ciertas limitaciones en su uso. Aunque al contrario que los TCRs, los CARs reconocen antígenos de manera independiente a la presentación por MHC-I y pueden evitar ese tipo de inmunoevasión, se ven limitados al reconocimiento de antígenos en la superficie celular y son incapaces de reconocer antígenos presentados por MHC-I. También podrían generarse ciertas respuestas inmunes debido a las secuencias no humanas presentes en los receptores quiméricos.

4.2. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS NK

4.2.1. Células NK y cáncer

Las células NK fueron identificadas en los años 70 por Kiessling, como una **subpoblación de linfocitos, mayores en tamaño en comparación con los linfocitos T y B, y capaces de eliminar células tumorales sin previa sensibilización** [82-84]. Desde entonces, se ha investigado mucho en el papel de estas células sobre el control de tumores e infecciones [85]. Las células NK se originan a partir de células linfoides progenitoras comunes y se diferencian en maduras e inmaduras en la médula ósea, distribuyéndose posteriormente en órganos y tejidos linfoides y no linfoides periféricos tales como médula ósea, NLS, bazo, sangre periférica placenta, pulmones, etc. [86-89]. Las células NK en reposo constituyen el 10-15% de los linfocitos que circulan en sangre periférica y, tras su respuesta a diferentes citoquinas y quimioquinas, son capaces de extravasar y ser reclutadas en diversos tejidos tumorales o inflamados[90].

Su principal diferencia con respecto a las células T y B es la ausencia de un reordenamiento génico de sus receptores y, por tanto, no poseen un receptor de reconocimiento de un único antígeno [91, 92]. Su citotoxicidad, en cambio, está modulada por un **balance entre las señales que se originan de los receptores inhibidores y activadores presentes en su superficie**. Las células NK están inactivas cuando se encuentran con células normales o sanas que expresan las moléculas MHC adecuadas para los receptores inhibidores y apenas expresan ligandos activadores. La citotoxicidad se genera cuando una célula “peligrosa” muestra un perfil MHC alterado o reducido junto con la elevada expresión de ligandos activadores [93]. Existen tres modelos de reconocimiento (**Fig. 16**):

-Reconocimiento “missing self” [94]: este modelo se basa en la interacción entre las moléculas MHC propias y los receptores inhibidores de las células NK, entre los que destacan la familia

Ly49 en ratones o KIR en humanos [95]. Son capaces de comprobar si las células con las que interactúan expresan el perfil de MHC correcto. De no ser así, algo frecuente debido a la transformación tumoral, no tiene lugar la unión a los receptores inhibidores y, por tanto, se produce la subsecuente activación de las células NK y la lisis de las células diana.

-Reconocimiento inducido por estrés: este modelo se basa en que cierto número de receptores activadores de NK reconocen proteínas propias, sobreexpresadas en células infectadas o transformadas. Algunos receptores activadores incluyen el complejo CD49/NKG2C, NKp46 y NKG2D (en humanos y ratón), el subconjunto Ly49 en ratón y la familia KIR S en humanos [96]. Por ejemplo, el receptor activador NKG2D se expresa de manera constitutiva en todas las células NK y se activa por ligandos NKG2D, una familia de proteínas MHC-I-like inducida por estrés [97].

-Reconocimiento "non-self": algunos receptores activadores de células NK no reconocen ligandos endógenos sino moléculas de patógenos extraños. Por ejemplo, NKp46 y NKp44 reconocen hemaglutininas del virus influenza, NKp30 reconoce la proteína tegumento pp65 del citomegalovirus humano y 2B4 reconoce células B infectadas con el virus Epstein Barr [98-100].

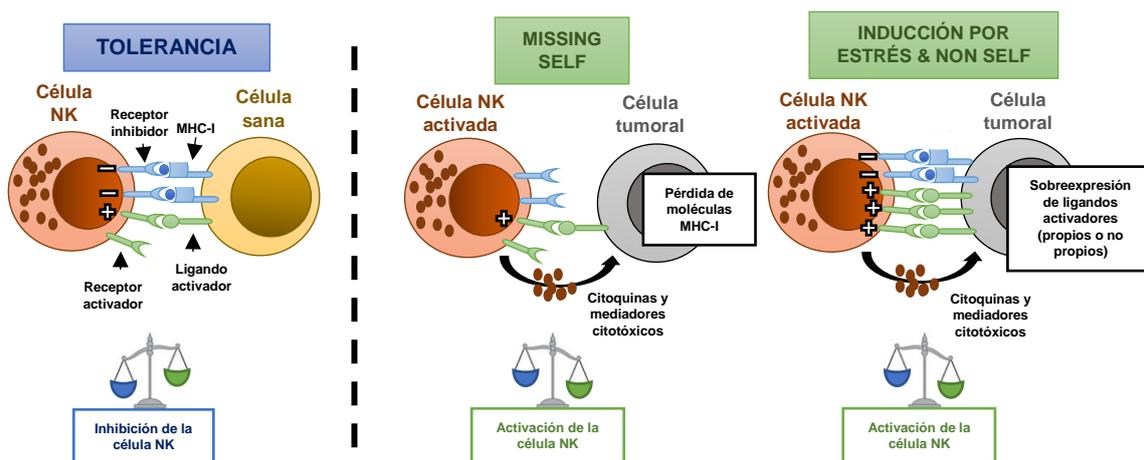


Fig. 16. Vías de reconocimiento y activación por parte de las células NK. El balance entre las diferentes señales obtenidas de los receptores inhibidores y activadores de las células NK da lugar a la actividad de las mismas.

Como se ha comentado, **las células NK pueden controlar el desarrollo tumoral mediante su interacción directa con él y son capaces de lisar sin previa sensibilización a través de tres vías:**

i) citotoxicidad directa mediante la liberación de gránulos de perforina y granzima que inducen apoptosis en las células diana [101, 102]; ii) a través de rutas apoptóticas inducidas por la activación de miembros de la familia de TNF por parte de las células NK como FasL o TRAIL [103-105] y iii) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) a través del receptor CD16, que también puede ser mediado por perforina y granzima [106].

Además, las células NK **también actúan como nexo entre las respuestas inmunes innatas y adaptativas**. Son capaces de modular la actividad de diferentes tipos celulares inmunes en el microambiente tumoral mediante contacto directo o a través de la liberación de citoquinas o quimioquinas [107]. Las células NK producen de manera rápida diversas citoquinas y quimioquinas tales como IFN- γ o TNF α , capaces de amplificar y reclutar una respuesta inflamatoria a través de diversos mecanismos [108, 109]. Se ha demostrado que son una fuente principal de IFN- γ *in vivo*, considerada crucial en la restricción de la angiogénesis tumoral y en la modelación de la inmunidad adaptativa [110, 111].

Existen **numerosas evidencias que apoyan la importancia de las células NK en inmunidad antitumoral**. La depleción de células NK en modelos murinos de alotrasplante tumoral, como linfoma, melanoma, cáncer de pulmón y próstata, ha establecido el papel crucial de las células NK en el control del crecimiento del tumor y la aparición de metástasis [19, 112]. De la misma manera, la infusión de células NK en ratones sin este tipo celular generó resistencia a la formación de metástasis [112]. Las células NK humanas alogénicas o autólogas han mostrado su capacidad para reconocer y eliminar *in vitro* células tumorales de biopsias de pacientes. Se ha observado que la lisis de células de cáncer hematológico se debe a la activación a través del receptor NKG2D o DNAM-1, y se ve facilitada por la baja expresión de HLA-I y el “mismatch” de ligandos KIR, que tiene lugar debido a la diferencia entre el ligando KIR del donante y el del receptor [113]. Además, células aisladas de pacientes con tumores sólidos avanzados también fueron susceptibles de ser lisadas por células NK activadas [114]. También se ha descrito que, las células NK activadas, tanto alogénicas como autólogas, pueden dirigir su actividad hacia las poblaciones de células madre tumorales en muestras de tumores derivadas de pacientes, debido a una sobreexpresión de ligandos de NKG2D en sarcoma y cáncer pancreático y de ligandos de NKp30 y NKp44 en colorrectal [115, 116]. Un estudio prospectivo a lo largo de 11 años ha correlacionado la actividad citotóxica alta y media de las células NK de sangre periférica con un menor riesgo para desarrollar cáncer, proporcionando más evidencias del rol de las células NK en la inmunovigilancia tumoral [117]. Altos niveles de células NK intratumorales se correlacionan con una mayor supervivencia en diferentes tipos de cáncer como colorrectal, gástrico, esofágico, etc. [118-121]. Todo esto son indicativos del **rol beneficioso de las células NK en la prognosis del cáncer y de su potencial en el tratamiento de cáncer**.

4.2.2. Uso de células NK en ACT

Como se comentó previamente, uno de los primeros ensayos clínicos de transferencia adoptiva con células linfoides se realizó con células en cultivo con IL-2, generándose así células LAK, y obteniéndose una respuesta en un 20% de los pacientes tras la reinfusión de estas células [53].

Estas células LAK contenían una alta proporción de células NK. Dado que las células NK no dependen de la existencia de un antígeno tumoral o de una activación previa, y son fáciles de obtener a través de sangre periférica, representan un enfoque atractivo para inmunoterapia. Ruggeri et al demostraron el potente efecto clínico que tenían células NK aloreactivas en pacientes con AML [122]. Miller et al demostraron que la ACT de células NK haploidénticas expandidas en pacientes con cáncer avanzado junto con IL-2 subcutánea es un tratamiento seguro [123].

La ACT de células NK requiere de un gran número de células que debe ser obtenido a partir de sangre periférica y expandido *ex vivo*. Cuando se usan **células NK alogénicas** es necesario eliminar las células T y B para evitar el rechazo y la enfermedad de injerto contra huésped y el riesgo de autoinmunidad [124]. En el caso de **células NK autólogas**, existen diferentes protocolos de expansión en desarrollo, sin necesidad de separar las células NK del resto [125, 126]. Además de la sangre periférica, las células NK pueden ser generadas a partir de células madre hematopoyéticas del cordón umbilical [127] o a partir de células madre embrionicas o pluripotentes [128]. Además, también existen **líneas celulares de NK purificadas** a partir de clones de células NK malignos, como las **células NK-92**. La línea celular NK-92 es una línea celular humana NK dependiente de IL-2, que fue establecida en 1992 a partir de sangre periférica de un paciente con linfoma no Hodgkin [129, 130]. Se caracteriza por la expresión de CD56 y la ausencia de CD16, y por tanto de la ADCC. NK-92 carece de casi todos los receptores inhibidores KIR [131]. De entre los receptores activadores principales, NK-92 expresa principalmente NKG2D, así como NKp30 y NKp46, pero no NKG2C o NKp44 [131, 132]. Esta línea celular presenta una **citotoxicidad superior frente a múltiples dianas en comparación con células NK primarias o tradicionales** [130, 133-135], probablemente debido a la aparente falta de receptores inhibidores y a la presencia de altos niveles de perforina y granzima B. La citotoxicidad de esta línea ha sido demostrada tanto *in vitro* [130] como *in vivo*, tras su uso en modelos murinos inmunodeficientes de xenotrasplante con melanoma y leucemia humanas [133, 134]. Además, **esta línea celular está ganando mucha atención debido a la facilidad para cultivarlas y modificarlas genéticamente en comparación con células primarias** y actualmente ya existen diversos ensayos clínicos que la usan y que han demostrado su seguridad incluso a altas dosis [136]. Además, a pesar de carecer de CD16 y necesitar IL-2, las modificaciones de células NK-92 con CARs, con el objetivo de superar los mecanismos de escape y de dirigir su actividad de manera más específica, están en alza [137, 138].

5. LIMITACIONES EN ACT

A pesar de que la ACT ha conseguido altas tasas de regresión en pacientes con melanoma metastático, **existe todavía una falta de respuesta** en algunos pacientes [65]. Esto puede deberse a **diversos factores**, entre los que se incluyen el potencial de proliferación de las células transferidas [139, 140], la persistencia [141] o el estado de diferenciación o fenotipo de las mismas [142, 143] y su habilidad para migrar e infiltrarse en el tumor [59, 68, 144]. Otra importante razón suele ser la incapacidad para aislar y expandir un número suficiente de células T específicas de tumor para mediar la destrucción del tumor [42, 50]. El tiempo y el coste requerido para la producción de estas células es un gran reto [145]. Además, en el caso de las células NK, su infiltración en la mayoría de tumores sólidos suele ser reducida, aunque existen ciertos estudios donde se describe cierta infiltración en el ambiente tumoral [146].

Como se ha podido ver, **el tráfico de un cierto número de células efectoras hacia la región del tumor es un paso crítico para el desarrollo de una respuesta inmune antitumoral**. Este proceso es dinámico y está altamente regulado y como ya se ha comentado previamente, las respuestas antitumorales óptimas se correlacionan positivamente con un aumento en la infiltración de células efectoras con actividad antitumoral en varios cánceres [147-150]. Sin embargo, **solo un pequeño porcentaje de estas células consigue migrar hacia el tumor e infiltrarse en él, tanto en humanos [151, 152] como en ratones [153, 154]**, todo lo contrario que en el caso de enfermedades infecciosas e inflamatorias debido a diferentes factores intrínsecos y extrínsecos [155]. Además, estas células pueden viajar indiscriminadamente hacia múltiples órganos [156], lo que podría potencialmente causar una patología. Por tanto, **uno de los mayores retos en ACT es superar las barreras que restringen el direccionamiento de las células efectoras al tumor y diseñar nuevas estrategias que aumenten el tráfico de esas células al microambiente tumoral**.

Estas células con actividad antitumoral se reclutan desde la circulación hasta el tumor por una serie de diferentes procesos que involucran la adhesión al endotelio, el rolling, la quimiotaxis y finalmente la extravasación [157, 158]. Están involucradas una serie de interacciones complejas entre las células efectoras y las células endoteliales. Además, durante la transición a células efectoras, se pierde la expresión de marcadores como CD62L y CCR7, perdiendo su capacidad para acceder a los NLS a través de las HEVs y adquieren la expresión de una serie de moléculas que les permiten migrar hacia los tejidos enfermos (selectinas P y E, CXCR3, LFA-1, VLA-4).

Las **razones del bajo tráfico de las células efectoras hacia el tumor** están siendo estudiadas y por el momento se sabe que influyen factores como: i) la discordancia entre los receptores de quimioquinas y el pool de quimioquinas en el ambiente tumoral [159-162] ii) la disminución en

la expresión de moléculas de adhesión así como iii) la vasculatura aberrante que puede promover el flujo irregular de sangre y por tanto un tráfico ineficiente de células inmunes en el tumor [155] y iv) el funcionamiento en ocasiones del endotelio del tumor como una barrera para prevenir la infiltración de las células efectoras [163]. En resumen, **los tumores son capaces de crear diferentes barreras celulares y moleculares que restringen la entrada eficiente de células efectoras** en las regiones intratumorales (Fig. 17).

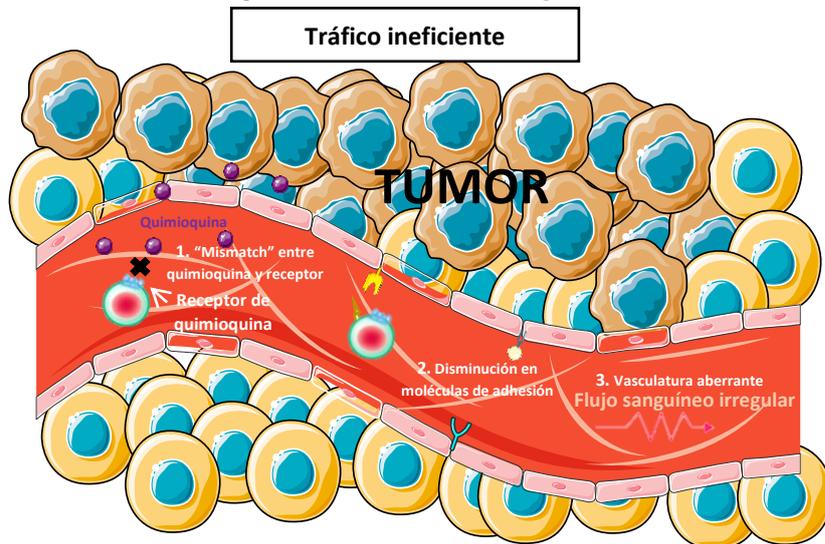


Fig. 17. Principales barreras que restringen el tráfico eficiente de las células efectoras hacia el tumor.

Por ejemplo, la discordancia entre los receptores de quimioquina de las células efectoras y las quimioquinas secretadas por los tumores han mostrado ser responsables del tráfico subóptimo de las células inmunes en el tumor [157]. Sin embargo, los diferentes tipos de tumores pueden variar en la secreción de quimioquinas y la correcta redirección de la migración de dichas células depende en gran medida de la correcta combinación entre la quimioquina y el receptor apropiado. Se han descrito numerosas quimioquinas que regulan la migración de las células T y NK hacia el tumor. CXCR3 es uno de los principales receptores que se activan en las TILs en melanoma [160], cáncer colorrectal [162] y de mama [159]. El tráfico eficiente de los CTLs a los sitios metastáticos en pacientes con melanoma se correlaciona bien con la expresión de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10, ligandos de CXCR3, donde este receptor se ha encontrado desregulado en las células T efectoras [160]. Además, no todos los tumores expresan suficientes ligandos de CXCR3 [159, 160] lo que puede dar lugar a un reclutamiento ineficiente de células T CD8⁺ efectoras y de memoria. Otro receptor que también tiene importancia es CXCR6, el cual está sobreexpresado en células T activadas y la ausencia del mismo demostró una infiltración reducida de células T en tumores de mama, impidiendo la regresión tumoral [161]. Una opción para solventar este problema es el uso de la modificación genética de las células transferidas con el objetivo de mejorar su capacidad para migrar de manera efectiva hacia el tumor. Kershaw et al. demostraron que la introducción del receptor de quimioquina CXCR2 en células T permitía

su migración efectiva hacia células tumorales *in vitro* [164]. Desde entonces, existen muchos estudios destinados a aumentar el tráfico de células T y NK hacia el tumor a través de modificaciones de otros receptores de quimioquina. Di Stasi et al. demostraron que la expresión de CCR4 en células T CAR-CD30 mejoraba la migración hacia el linfoma Hodgkin CD30+ que secretaba CCL17, el ligando de CCR4. Además, la transferencia de células T CCR4-CAR-CD30 resultó en una actividad antilinfoma superior en un modelo de xenotrasplante debido al aumento de la infiltración de células T en el tumor [165]. Otro receptor prometedor es, como ya se vio, CXCR3. Un estudio sobre transferencia adoptiva de células T expresando un CAR con NKG2D pudo reclutar y activar células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas de antígeno en la región tumoral de manera dependiente de CXCR3 para optimizar la eliminación del cáncer de ovario [166]. Por todo esto, es necesaria la **cuidadosa selección o generación de células T o NK con un perfil de receptor de quimioquinas apropiado para las quimioquinas secretadas por diversos tumores individuales**, lo que podría facilitar la infiltración de las células transferidas en el tumor y, por tanto, aumentar la eficacia antitumoral de la ACT. Sería interesante identificar tanto quimioquinas que atraigan de manera específica células efectoras T y NK, pero no supresoras como MDSCs. De esta manera, se sugiere que la combinación de tratamientos pudiera ser la forma de aumentar la eficacia y el homing de las células T transferidas en pacientes.

Por otro lado, la presencia de una vasculatura aberrante puede promover el flujo irregular de sangre dando lugar a un tráfico de células T ineficiente en el lecho tumoral [155]. Además, el endotelio tumoral se ha descrito como una barrera que previene la infiltración de CTLs [163]. Diferentes estrategias destinadas a la normalización de los vasos sanguíneos en el tumor tales como anticuerpos frente a VEGF y sus receptores [155, 167, 168], irradiación [169] o la actuación sobre citoquinas como TNF α mediante péptidos de homing de la vasculatura del tumor como NGR y RGR [155, 170] han demostrado aumentar la infiltración en el tumor. Además, también se están construyendo CARs dirigidos hacia componentes de las células endoteliales como la integrina $\alpha V/\beta 3$ [171] o el receptor-2 VEGF sobreexpresado en la vasculatura tumoral [172]. De esta manera, se podría destruir dicha vasculatura para aumentar el tráfico de células efectoras hacia el tumor y por tanto mediar la regresión tumoral.

Se ha podido ver que el tráfico eficiente de las células T y NK al ambiente tumoral es crítico para el éxito en inmunoterapia antitumoral y que nuevas estrategias con el objetivo de aumentar el tráfico de las células T hacia el tumor están siendo investigadas (**Fig. 18**). **Todas estas estrategias requieren de mecanismos específicos para los diferentes tipos de tumores, y el diseño de aproximaciones más generales, que puedan aplicarse a una gran variedad de tumores, serían de gran utilidad.**

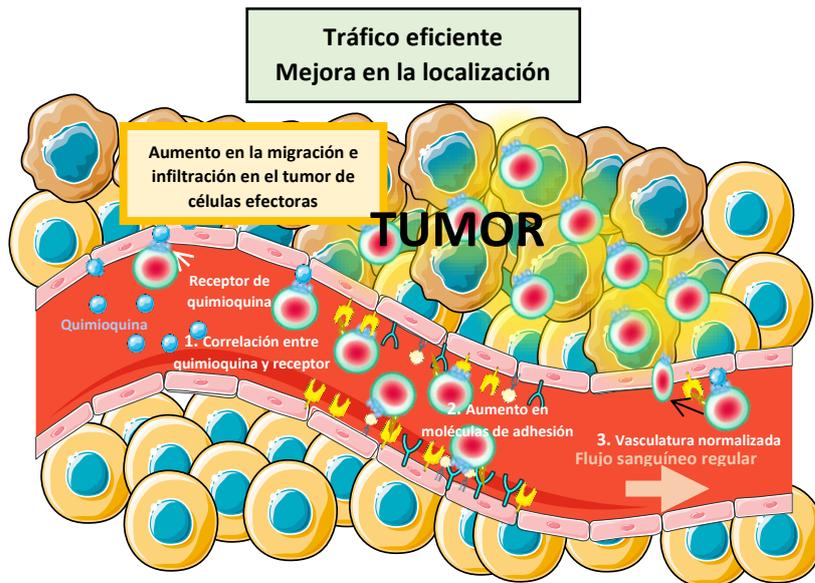


Fig. 18. Principales estrategias utilizadas para mejorar el tráfico de las células efectoras y su infiltración en el tumor.

6. NANOBIOMEDICINA

La **nanotecnología** es un área multidisciplinaria que se basa en el diseño y utilización de materiales y sistemas a escala nanométrica. Uno de los ámbitos en el que la nanotecnología ha tenido un mayor impacto ha sido la biomedicina, dando lugar a la **nanobiomedicina**. La nanobiomedicina utiliza sistemas nanotecnológicos como nanopartículas, nanocélulas, nanoemulsiones, etc. para diferentes aplicaciones biomédicas como pueden ser predicción, prevención, diagnóstico temprano y terapia personalizada, entre otros [173].

La nanotecnología es una plataforma que presenta diversas ventajas ya que permite **controlar y dirigir de manera más específica un determinado tratamiento mediante la liberación específica y localizada del mismo** y, además, evita su degradación y aumenta su estabilidad *in vivo*. Por tanto, gracias a la nanotecnología se puede obtener una mayor concentración en el lugar deseado y no en el resto del organismo, aumentando así la efectividad del tratamiento y disminuyendo la toxicidad sistémica.

6.1. NANOPARTÍCULAS COMO BASE DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN LOCALIZADA

La principal limitación de muchos tratamientos con fármacos o biomoléculas, así como de la ACT, es su baja eficacia *in vivo* y en ocasiones, su alta toxicidad. Como consecuencia de esa baja eficacia y, por tanto, efecto terapéutico, debe utilizarse una alta concentración para obtener el efecto deseado, causando de esta manera múltiples efectos adversos. Además, como ya se vio, uno de los factores limitantes en la ACT es la dificultad en la obtención y expansión de un número suficiente de células efectoras específicas. La nanotecnología puede utilizarse para solventar este tipo de problemas. Uno de los nanosistemas más empleados en biomedicina con este fin son las **nanopartículas (NPs)**, mediante su unión a los diversos tratamientos. Estos sistemas de

liberación basados en NPs se han utilizado principalmente para la liberación específica de fármacos o biomoléculas debido a sus diversas ventajas. Debido a su pequeño tamaño, las NPs tienen acceso a ciertas zonas a las que otros sistemas no pueden acceder y pueden ser dirigidas hacia una zona deseada mediante diversas estrategias, reduciendo así la cantidad de fármaco o biomolécula necesaria para obtener efecto terapéutico en ese lugar y minimizando la toxicidad. Este hecho tiene gran importancia cuando se busca la actuación de un fármaco en un lugar concreto, como en el cáncer o en la autoinmunidad específica de órgano, ya que las terapias convencionales suelen dispersarse por todo el organismo y solo parte llega al lugar de acción.

Además, las NPs pueden ser dirigidas hacia el sitio de acción mediante dos tipos de estrategias: **pasivas** o **activas** [174]. Por un lado, **suelen acumularse de manera pasiva** en regiones inflamadas o masas tumorales debido a que en esas regiones existe un aumento de la permeabilidad y de la retención [175]. Existen diversos ensayos preclínicos y clínicos que demuestran que la unión de fármacos antitumorales a diferentes NPs aumenta la eficacia del fármaco en comparación con la administración del fármaco libre [176]. Por otro lado, existen **estrategias activas** que buscan dirigir las NPs hacia la región de interés, ya que, en ocasiones, la acumulación pasiva no es suficiente. Un ejemplo de ello podría ser mediante la unión de las NPs a ligandos específicos que las dirigen a un tipo de tejido concreto [177]. Otra estrategia muy prometedora es la utilización de **NPs magnéticas (NPMs)** que pueden localizarse de manera precisa en la zona deseada mediante el uso de un campo magnético externo (CME) [178].

6.2. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

El concepto del uso de NPMs como agentes transportadores que podrían dirigirse y concentrarse en una región concreta con ayuda de un CME fue propuesta por primera vez por Freeman en 1960 [174, 179], y se basa en la competición entre las fuerzas ejercidas sobre las NPMs por el propio flujo sanguíneo y el CME aplicado. Cuando esta última predomina, las NPMs se retienen en la zona del campo. Para su uso en biomedicina, es importante que las NPMs presenten diversas propiedades que las hagan biocompatibles y eviten su toxicidad. Además, deben poseer propiedades especiales para poder ser utilizadas en biomedicina, dependiendo de la aplicación que se quiera dar al material [179]. En el caso de las NPMs, sus características vienen determinadas por el núcleo de material magnético, y por la cubierta que lo rodea (Fig. 19).

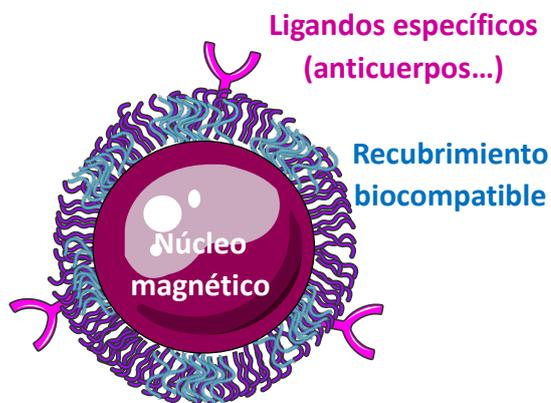
6.2.1. Núcleo magnético

El material magnético debe proporcionar unos requerimientos esenciales, siendo el primero de ellos el **comportamiento superparamagnético**, que aparece en materiales de muy pequeño tamaño. En los materiales superparamagnéticos, debido a su tamaño, las fluctuaciones en la

dirección de la magnetización afectan a la partícula entera, que posee un único dominio magnético, y su comportamiento al aplicar un campo magnético es reversible. Si las partículas son de mayor tamaño, su comportamiento magnético no será reversible. Para uso biomédico es especialmente importante el **superparamagnetismo**, ya que cuando el campo magnético deja de aplicarse, **el material no presenta una magnetización residual, de forma que no se produce la atracción y aglomeración entre partículas**, lo que evita posibles problemas como la embolización en el torrente sanguíneo. Otro requisito básico es que el núcleo magnético sea biodegradable o pueda ser excretado fácilmente. Las NPs con núcleos de hierro se procesan por las células utilizando las vías bioquímicas del metabolismo del hierro [180, 181]. Finalmente, el núcleo magnético debe proporcionar una alta magnetización, para que el movimiento de las NPs se pueda controlar con un CME y se puedan inmovilizar en la región que se desee.

6.2.2. Recubrimiento de las NPMs

La cubierta de las NPMs les va a proporcionar características significativas para su uso. Recubrir las NPMs con compuestos biocompatibles evita su posible toxicidad, inmunogenicidad y permite aumentar el tiempo de residencia en sangre. Por otra parte, la cubierta puede dotar a las NPMs de la capacidad de unir determinados compuestos, o les proporciona carga superficial a pH fisiológico, lo que permite su estabilización y evita que se formen agregados por la repulsión



entre cargas del mismo signo.

Fig. 19. Esquema de una NPM. Las NPMs constan de un núcleo magnético que puede estar rodeado por diversos recubrimientos biocompatibles y funcionalizado con fármacos, anticuerpos, etc.

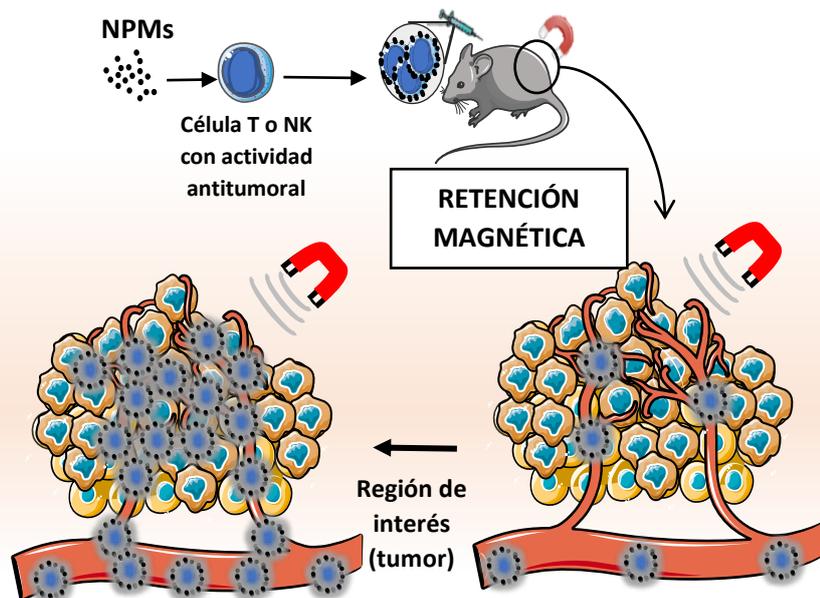
6.3. APLICACIÓN DE NPMs EN ACT

Como se ha comentado, la ACT es una aproximación terapéutica muy prometedora para el tratamiento del cáncer. Sin embargo, una de las principales limitaciones como se ya vio, es la **reducida migración y la infiltración ineficiente de las células T y NK efectoras en el microambiente tumoral**, y, por tanto, es necesaria la **búsqueda de estrategias que permitan aumentar el tráfico de las células transferidas hacia el tumor**, permitiendo así una acción antitumoral efectiva y la eliminación completa del tumor [182]. Por otro lado, la aplicación de NPMs en biomedicina es una forma de mejorar la eficacia de un tratamiento y disminuir su toxicidad, por lo que la aplicación de este tipo de estrategias en ACT es una idea muy atractiva.

Por ello, y con el objetivo de **mejorar la migración o activación de las células linfoides** en el tumor, una posibilidad podría ser mediante el uso combinado de NPMs asociadas a las células y la aplicación de un CME, que permitiría la localización exacta en la zona deseada, algo que puede además prolongarse en el tiempo gracias precisamente al CME que se aplica [178]. Diversos estudios utilizando este tipo de estrategia han sido llevados a cabo, pero principalmente con el objetivo de acumular células madre, células mesenquimales macrófagos o DCs en terapias de regeneración tisular y desórdenes autoinmunes [183-188]. Su uso en el redireccionamiento de células linfoides tales como células T o NK para tratamientos de cáncer o autoinmunidad son muy limitados [189] y este campo permanece inexplorado.

El direccionamiento magnético de células efectoras como células T y NK, caracterizadas por una alta motilidad y por estar, a diferencia de las DCs y macrófagos, continuamente en circulación, **para mejorar su migración de manera específica hacia el tumor y de promover su acumulación e infiltración en el mismo, podría ser una estrategia prometedora para solventar uno de los principales problemas en ACT**. La aplicación de un CME podría suponer un aumento en el tiempo de adhesión de estas células en la región de interés y, por tanto, en la infiltración del tumor. No obstante, apenas hay estudios donde se haya analizado la influencia de las NPMs en la migración y funcionalidad de células del sistema inmune [190] y esta estrategia sólo tendría sentido siempre y cuando los aspectos funcionales clave no se vieran afectados por la presencia de las NPMs y el CME. Durante este proyecto, se ha evaluado la posibilidad de utilizar las NPMs como plataforma para el direccionamiento magnético de células T y NK hacia una región de interés, mediante el análisis de la influencia de las NPMs sobre estas células, así como de la capacidad de un CME de promover la acumulación de estas células asociadas a NPMs (Fig. I10).

Fig. I10. Estrategia de direccionamiento magnético de células linfoides con actividad antitumoral en ACT. Se propone combinar la asociación de NPMs con células linfoides con actividad antitumoral y la aplicación de campos magnéticos con el fin de promover la retención de las células en la región tumoral y favorecer así su infiltración y actuación frente al tumor.



V. OBJETIVOS

Los diferentes objetivos planteados a lo largo de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

1. Analizar la interacción entre las nanopartículas magnéticas y diferentes modelos de células T y NK, con el fin de determinar las condiciones adecuadas de asociación entre ambas.
2. Evaluar la retención magnética *in vitro* de diversos modelos de células T y NK asociadas con nanopartículas magnéticas y posteriormente *in vivo*, de células T primarias asociadas a nanopartículas magnéticas en nódulos linfáticos, así como su comportamiento en el interior de los mismos.
3. Analizar la influencia de las nanopartículas magnéticas sobre los principales aspectos funcionales *in vitro* de las células T y NK efectoras.
4. Evaluar la retención magnética y la funcionalidad *in vivo* de células T CD8⁺ específicas de antígeno asociadas a nanopartículas magnéticas en un modelo tumoral que expresa el antígeno que reconocen dichas células, mediante la aplicación de un imán en la proximidad del tumor en experimentos de transferencia celular.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS NPMs

1.1. Reactivos y compuestos

Los principales reactivos utilizados para la síntesis y caracterización de las NPMs se enumeran a continuación: cloruro de hierro (II) (FeCl_2) (Sigma-Aldrich, >99%), cloruro de hierro (III) (FeCl_3) (VWR International, 27% solución acuosa), hidróxido de amonio (NH_4OH) (Fluka, 25%), ácido nítrico (HNO_3) (Sigma-Aldrich, <65%), nitrato de hierro (III) ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) (Sigma-Aldrich, >98%), ácido dimercaptosuccínico (DMSA) (Sigma-Aldrich, >98%), 3-aminopropiltriétoxilano (APS) (Sigma-Aldrich, >98%), dextrano 6kDa (DEXT) (Sigma-Aldrich), metanol (Sigma-Aldrich, >98%) e hidróxido sódico (NaOH) (Sigma-Aldrich).

1.2. Síntesis de los núcleos de óxido de hierro

Los núcleos de óxido de hierro se prepararon siguiendo el protocolo de coprecipitación previamente publicado [191, 192]. Brevemente, sobre una mezcla de cloruros de Fe^{2+} y Fe^{3+} (FeCl_2 y FeCl_3) se adicionó una base (NH_4OH) de manera lenta y bajo una agitación intensa. La mezcla se calentó a 90°C durante 90 minutos con el objetivo de preparar núcleos de aproximadamente 12 nm de diámetro (Fig. M1.A). Posteriormente, la preparación se lavó con agua destilada mediante decantación magnética. Con el fin de oxidar la magnetita a maghemita y activar la superficie para los pasos siguientes, el precipitado obtenido se trató con ácido (HNO_3) bajo agitación durante 15 minutos. Después, el ácido se eliminó por decantación magnética y una mezcla de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ y agua se añadió sobre la preparación. La mezcla se calentó en agitación hasta temperatura de ebullición durante 30 minutos, tras lo cual se dejó enfriar a temperatura ambiente (TA) y, mediante decantación magnética, el sobrenadante se sustituyó por HNO_3 y se agitó durante 15 minutos (Fig. M1.B). Finalmente, la preparación se lavó tres veces con acetona y se dispersó en agua destilada. Para eliminar cualquier resto de acetona y concentrar la muestra final se utilizó un rotavapor.

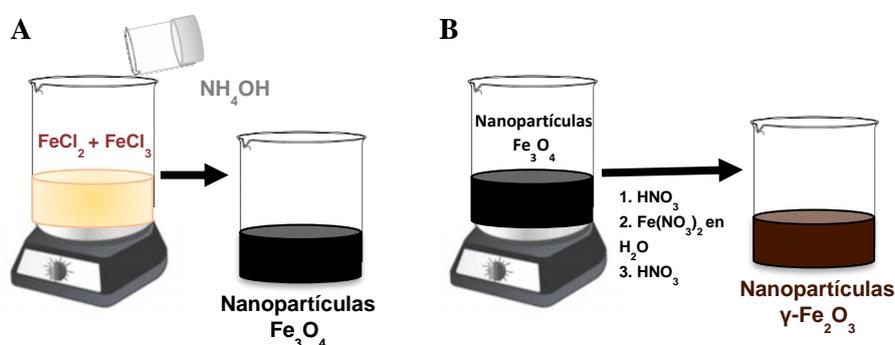


Fig. M1. Síntesis de los núcleos de óxido de hierro por coprecipitación. A) Síntesis de núcleos de óxido de hierro (magnetita). **B)** Tratamiento ácido y proceso de oxidación a maghemita de los núcleos obtenidos previamente.

1.3. Recubrimiento de los núcleos de óxido de hierro

Para mejorar la estabilidad y biocompatibilidad de las NPs, los núcleos de óxido de hierro obtenidos previamente se recubrieron con diferentes compuestos: DMSA, APS o DEXT, siguiendo los protocolos descritos previamente [192]. De manera concisa se describen a continuación los pasos principales:

- Recubrimiento con DMSA (DMSA-NPMs): se añadió DMSA sobre la suspensión de núcleos de óxido de hierro bajo agitación a un pH ácido (pH 3). Después, se aumentó el pH hasta 11 y la muestra se sonicó durante 20 minutos. Finalmente, la suspensión se dializó contra agua destilada durante 2 días, utilizando una membrana de diálisis de 14kDa (Sigma-Aldrich) y se ajustó el pH a 7.
- Recubrimiento con APS (APS-NPMs): se añadió APS de manera lenta sobre la suspensión de núcleos de óxido de hierro y metanol bajo agitación vigorosa durante 12-16 horas. Posteriormente, el metanol se eliminó de la mezcla utilizando un rotavapor. La muestra se lavó 3 veces con una mezcla de acetona/agua (70/30) y se redispersó en agua destilada. El pH se acidificó (pH 3) y la muestra se sonicó durante 1 hora. Finalmente, el pH se ajustó a 7 y se sonicó durante 10 minutos.
- Recubrimiento con DEXT (DEXT-NPMs): se dispersó la suspensión de núcleos de óxido de hierro en una disolución de NaOH y se añadió gota a gota sobre una solución de dextrano (6kDa) en NaOH bajo sonicación. La mezcla se sonicó durante 6 horas bajo refrigeración. Finalmente, la preparación se dializó contra agua destilada durante 3 días, de manera similar al recubrimiento con DMSA, y el pH se ajustó a 7.

1.4. Caracterización de las NPMs

Se realizó una caracterización físico-química mediante el análisis de diversos parámetros, tanto de los núcleos de óxido de hierro obtenidos inicialmente, como de las NPMs modificadas con los diferentes recubrimientos. En primer lugar, para el análisis por microscopía electrónica de transmisión (TEM), una gota de la suspensión diluida de los núcleos o de las NPMs recubiertas se depositó sobre una rejilla de cobre recubierta de carbono, y se dejó secar a TA. Las imágenes se adquirieron usando el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 con la cámara Gatan ES1000Ww. El análisis de las imágenes se llevó a cabo utilizando el software de análisis ImageJ y que permitió determinar el tamaño medio de los núcleos de las NPMs, así como su forma y distribución. Para determinar el tamaño hidrodinámico y la carga superficial (potencial zeta), se diluyeron las muestras en agua destilada o en una solución de KNO_3 , respectivamente y se analizaron por dispersión dinámica de la luz (DLS) (Malvern Nano Sizer ZS). A continuación, se cuantificó la concentración de Fe en las diferentes preparaciones mediante su digestión en

medio ácido y su posterior análisis por espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) en el equipo Optima 2100 DV (Perkin Elmer).

La presencia del recubrimiento en la superficie se evaluó mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), mediante un barrido entre las longitudes de onda de 4000 y los 250 cm^{-1} con los espectrofotómetros Bruker IFS 66V/S-FTIR y Nicolet 20SXC-FTIR (ThermoScientific). La cantidad de recubrimiento presente en la NPM se cuantificó mediante análisis termogravimétricos (TG) y análisis térmicos diferenciales (DTA) simultáneos llevados a cabo en una termobalanza Seiko TG/DTA 320U (Seiko Instruments). Posteriormente, para la caracterización magnética, las muestras en suspensión fueron congeladas y desecadas overnight (O/N) en un liofilizador LyoQuest (Telstar). La muestra sólida resultante se compactó en cápsulas de gelatina para la subsiguiente caracterización magnética. Las curvas de histéresis se obtuvieron en un magnetómetro de muestra vibrante (MLVSM9, MagLab 9T, Oxford Instruments), utilizando un campo magnético máximo de 5 T.

Finalmente, se evaluaron los niveles de endotoxina en las diferentes preparaciones de NPMs recubiertas utilizando un ensayo comercial cromogénico de lisado de amebocitos del limulus (LAL) (Lonza), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2. MEDIOS DE CULTIVO, SUPLEMENTOS Y SOLUCIONES TAMPÓN

- Medios de cultivo: medio RPMI 1640 y medio DMEM (ambos de Biowest).
- Suplementos de medios: FBS (GBi Life Sciences) y sodio piruvato, HEPES, penicilina, streptomycin, aminoácidos no esenciales, β -mercaptoetanol y L-glutamina, todos de Biowest.
- PBS: KH_2PO_4 1 mM, NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM a pH 7.0.
- Buffer de lisis de eritrocitos: NH_4Cl 160 mM, NaHCO_3 10 mM, EDTA 0.14 mM en H_2O a pH 7.4
- TBS: Trizma base 10 mM, NaCl 150 mM a pH 8.0.
- PBS-staining: FBS 1-2% o BSA 0.1-0.2% a pH 7.0.

3. RATONES

Para el desarrollo de esta tesis se han utilizado las siguientes cepas de ratones:

3.1. Ratones C57BL/6 (Jackson o Janvier Laboratories)

Estos ratones, tanto machos como hembras, se han empleado para la purificación de células T primarias y células NK, con los que se han realizado los experimentos de la primera y segunda parte de esta tesis, respectivamente.

3.2. Ratones C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb (Ratones OT-I) (Jackson Laboratories)

Se trata de ratones transgénicos, que expresan el TCR transgénico OT-I ($V\alpha 2$ y $V\beta 5$) que reconoce un péptido específico de la ovoalbúmina (OVA), el 257-264 (SIINFEKL), presentado en el contexto de la molécula de MHC-I H-2Kb [193, 194]. Estos ratones fueron fenotipados mediante citometría de flujo, usando principalmente como marcador un anticuerpo que reconoce $V\alpha 2$, específico para este tipo de receptores. Fueron cedidos por la Dr. I. Mérida (CNB) para iniciar nuestra propia colonia. A partir de estos ratones se purificaron y expandieron los linfocitos T $CD8^+$ con los que se han realizado la tercera parte de esta Tesis.

Los anticuerpos anti-ratón utilizados en citometría de flujo para el fenotipaje de estos ratones fueron los siguientes: anti-CD90.2 (53-2.1, eBioscience), $-V\alpha 2$ (B20.1, Pharmingen) y $-CD8$ (53-2.1, Biolegend).

3.3. Ratones athymic nude-Foxn1^{nu} (Harlan Laboratories)

Se trata de una cepa de ratones inmunodeficientes. Se utilizaron ratones hembra, de 5-7 semanas de edad, durante los ensayos de transferencia celular de la primera parte de la Tesis.

3.4. Ratones C57BL/6 (Harlan Laboratories)

Se utilizaron ratones hembra, de 5-7 semanas de edad, para generar un modelo tumoral singénico y posteriormente, como modelo de tratamiento antitumoral tras la transferencia celular de células OT-I asociadas o no con NPMs y en ausencia o presencia de un CME.

3.5. Ratones C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)131Osb/LeySopJ (“Ubi-GFP”) (Jackson Laboratories)

Se trata de ratones transgénicos, cuyas células, a excepción de los eritrocitos y el pelo, presentan fluorescencia GFP. Se utilizaron para la obtención de células T primarias y su uso en el ensayo de migración *in vitro* “under agarose” o posterior transferencia a otros ratones, en presencia o ausencia de CMEs, con el fin de recoger y hacer imagen con los NLs (Apartados 14.2 y 16 en Materiales y Métodos). También se utilizaron para la obtención de células dendríticas y su posterior uso en algunos de los experimentos de microscopía multifotónica (Apartado 17.2 en Materiales y Métodos).

En todos los casos siempre se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos en el Animalario del Centro Nacional de Biotecnología (CNB), o en el Animalario del Instituto Theodor Köcher (Berna, Suiza), en el caso de algunos de los experimentos de homing (Apartado 15) y microscopía selectiva de planos y multifotónica (Apartados 16 y 17 en Materiales y Métodos). Además, todos los procedimientos realizados durante este trabajo que conllevan el manejo de animales se rigen por la legislación de la Unión Europea. Los experimentos realizados en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB) fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CNB

(CEEACNB), el Comité de Ética del CSIC, y por la Dirección General de Agricultura y Ganadería del Área de Protección Animal de la Comunidad de Madrid. Los experimentos realizados en Berna fueron aprobados el Comité de Experimentación Animal del Cantón de Berna.

4. CULTIVOS CELULARES

4.1. Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron las siguientes: **Jurkat** (ATCC, TIB-152) como modelo de células T humanas, **RAW264.7** (ATCC, TIB-71) como modelo de macrófagos murinos, **NK-92MI** (ATCC, CRL-2408) como modelo de células NK humanas, **SVEC4-10** (ATCC, CRL-2181) como modelo de células endoteliales murinas, **YAC-1** (ATCC, TIB-160) y **RMA/S** (cedidas por el Dr. B. Chambers, Karolinska Institute, Suecia) como modelos de dianas de células NK de origen murino, **K562** (cedidas por el Dr. A. Pérez Martínez, IdiPaz, España) como modelo de diana de células NK de origen humano y **EG7-OVA** (ATCC, CRL-2113) como modelo de diana tumoral específica de células T murinas. Las líneas celulares Jurkat, RAW264.7 y SVEC4-10 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomycin, 2 mM L-glutamina y 1 mM de piruvato sódico en condiciones estándar de cultivo (37°C, 5% CO₂ y 90% de humedad relativa). La línea NK-92MI se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 5% FBS, 5% suero humano (Sigma-Aldrich), 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomycin, 2 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 50 µM 2-mercaptoetanol, HEPES 10 mM, aminoácidos no esenciales 1X, y en algunos casos, se añadió también IL-2 humana recombinante (100 U/ml, Peprotech).

La línea celular YAC-1, de origen murino, se utiliza como diana de células NK ya que expresa el ligando del receptor activador NKG2D [195] mientras que RMA/S, también de origen murino, se usa debido a la expresión de bajos niveles de MHC de clase I [196]. La línea celular K562, de origen humano en este caso, se utiliza como diana ya que carece de HLA de clase I. Estas tres líneas celulares se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomycin y 2 mM L-glutamina.

La línea celular EG7-OVA se utiliza como modelo para estudiar la respuesta específica de antígeno por parte de las células T citotóxicas (específicas del péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄), ya que están modificadas, mediante la inserción de un plásmido, para la síntesis y presentación constitutiva del péptido OVA en moléculas de MHC-I H-2Kb. Estas células se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml estreptomycin, 2 mM L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 50 µM 2-mercaptoetanol, HEPES 10mM, aminoácidos no esenciales 1X (medio RPMI completo), en presencia de geneticina 0.4 mg/ml (G418,

ThermoFisher Scientific), para la selección únicamente de aquellas células con el inserto plasmídico.

4.2. Aislamiento y cultivo de células primarias de ratón

Para el desarrollo de este trabajo ha sido necesario aislar y cultivar diferentes tipos de células inmunes primarias de ratón: **células T primarias**, **células NK** y **células OT-I**.

4.2.1. Purificación de células T primarias

Se sacrificaron ratones C57BL/6, de unos 3-4 meses de edad, y el bazo y los NLs (axilares, inguinales, poplíteos y cervicales) fueron recogidos y disgregados en un filtro de 40 μm de poro (BD Falcon). Obtenida una suspensión de esplenocitos, se lisaron los eritrocitos y se aislaron las células T primarias mediante el kit “Dynabeads Untouched Mouse T cells” (ThermoFisher Scientific) o el kit “Mouse T cell Isolation” (STEMCELL Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estos kits permiten la purificación de células CD3^+ mediante selección negativa, para evitar su posible activación y poder utilizarlas inmediatamente después. Después del aislamiento, el porcentaje de células CD3^+ se comprobó por citometría de flujo para evaluar la eficacia del mismo, siendo utilizadas siempre en torno al 90-95%. Estas células se utilizaron inmediatamente después en los experimentos correspondientes, utilizando medio RPMI completo.

4.2.2. Purificación y expansión de células NK

En el caso de células NK primarias, se procedió de la misma manera que en el caso anterior, pero siendo necesario aislar sólo el bazo y utilizando el siguiente kit: “Mouse NK Cell Isolation Kit” (Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite la purificación de células NKp46^+ por selección positiva. Una vez aisladas, se pusieron en cultivo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fondo en U) utilizando el medio RPMI completo, pero esta vez suplementado con IL-2 recombinante murina (1000 U/ml, Peprotech) y fueron expandidas durante 7 días. El porcentaje de células NK ($\text{CD3}^+\text{NKp46}^+$) fue comprobado por citometría de flujo a día 0 y a día 7, obteniendo en este último una pureza de en torno al 90-95% tras la expansión.

4.2.3. Purificación y expansión de células OT-I

Finalmente, para obtener células OT-I, ratones OT-I fueron sacrificados y los nódulos y bazo fueron recogidos y procesados, de igual manera que en los casos anteriores, hasta obtener una suspensión de esplenocitos, tras lo cual se procedió a la lisis eritrocitaria. Posteriormente, se pusieron en cultivo durante 2 días a una concentración de 5×10^6 células/ml en medio RPMI completo suplementado con el péptido $\text{OVA}_{257-264}$ (sintetizado por el Servicio de Proteómica del CNB) a 10 pM, con el fin de activar las células OT-I presentes. Transcurridos los 2 días, la mayor

parte de células inactivas acaban muriendo y sólo sobreviven aquellas que se han activado. En este punto se sustituyó el medio de cultivo por medio RPMI completo suplementado con IL-2 recombinante murina (50 U/ml, Peprotech) a una concentración de $0.2-0.4 \times 10^6$ células/ml y se dejó que las células OT-I activadas se expandieran durante unos 3 días. El porcentaje de células OT-I (CD3⁺CD8⁺) así como su perfil de activación, según la expresión de marcadores de activación temprana y tardía, CD25 y CD69, se comprobó por citometría de flujo a día 0 y a día 5-6 de activación, obteniéndose un 90-95% de células OT-I tras la expansión. Se usaron en torno a día 5-6 de expansión en los experimentos correspondientes.

Los anticuerpos anti-ratón utilizados en citometría de flujo para la comprobación de los diferentes cultivos celulares se enumeran a continuación: anti-CD3 (17A2, eBioscience), -NKp46 (29A.1, Biolegend), -CD69 (H1.2F3) y -CD25 (PC61) ambos de Pharmingen.

5. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE LAS NPMs

5.1. AlamarBlue/PrestoBlue

Para evaluar la supervivencia celular en presencia de las diferentes NPMs se utilizó el compuesto comercial AlamarBlue o PrestoBlue (ambos de Invitrogen). Estos compuestos contienen un reactivo no fluorescente, la resazurina, el cual, al entrar en las células viables, se reduce por las enzimas mitocondriales y da lugar a la resorufina, altamente fluorescente (Fig. M2).

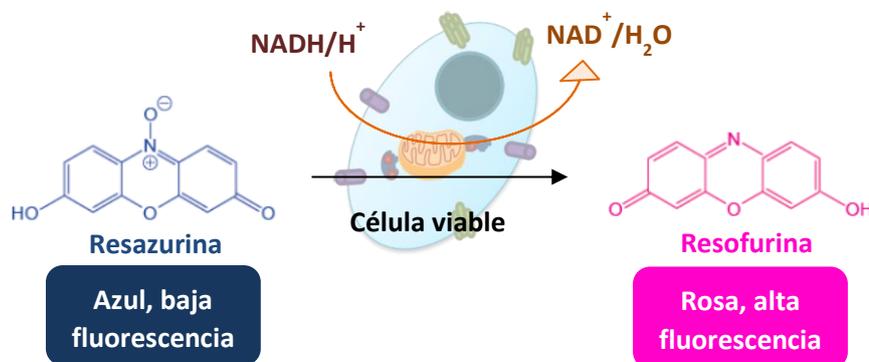


Fig. M2. Reacción producida en el ensayo AlamarBlue/PrestoBlue. La resazurina actúa como aceptor de electrones de las deshidrogenasas en las células vivas, formándose la resorufina, un compuesto rosa/rojo y muy fluorescente.

Las células fueron cultivadas con concentraciones crecientes de las diferentes NPMs (DMSA-NPMs, APS-NPMs y DEXT-NPMs) en el medio correspondiente para cada una, por 24 h en placas de cultivo de 96 pocillos en condiciones estándar. Durante las últimas 4 h, se añadió el reactivo AlamarBlue a una dilución final de 1:10. Finalmente se midió la fluorescencia con los filtros de excitación y emisión de 530 nm y de 590 nm, respectivamente. Como fluorescencia base o mínima se tomó aquella propia del medio completo solo. El porcentaje de supervivencia celular se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Supervivencia celular} = \frac{\text{fluorescencia}_{\text{células tratadas}} - \text{fluorescencia}_{\text{mínima}}}{\text{fluorescencia}_{\text{células no tratadas}} - \text{fluorescencia}_{\text{mínima}}} \times 100\%$$

5.2. Anexina/PI

Para determinar la inducción de apoptosis y/o necrosis debido a la presencia de las NPMs, se utilizó el marcaje conjunto anexina V y yoduro de propidio (PI). De esta manera, se detecta la externalización de la fosfatidilserina en células apoptóticas usando la anexina V conjugada con FITC y las células muertas mediante el PI, el cual entra únicamente en células muertas, cuando se encuentra comprometida la membrana plasmática (**Fig. M3.A**).

Para ello, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de NPMs en condiciones estándar y posteriormente, se procedió a la tinción con el kit de anexina V-FITC / PI (Life Technologies) siguiendo las instrucciones del fabricante, y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Se comparó el porcentaje de células apoptóticas tempranas (anexina V positivas), tardías (dobles positivas), necróticas (PI positivas) y viables (dobles negativas) (**Fig. M3.B**).

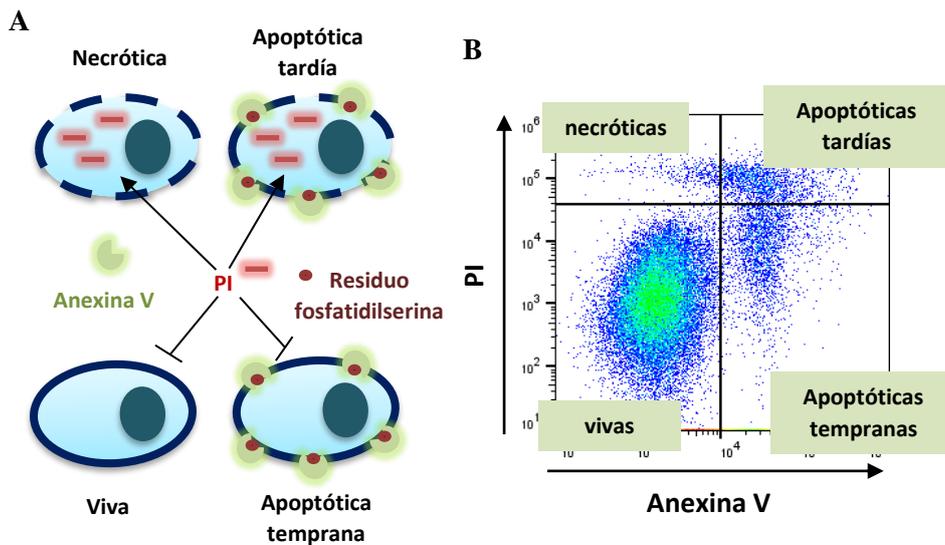


Fig. M3. Ensayo de apoptosis/necrosis por citometría de flujo. A) Esquema gráfico que muestra la interacción entre la anexina V y el PI con los diferentes estados de la célula. **B)** Gráfica representativa obtenida por citometría de flujo de las 4 poblaciones de células diferenciadas en función de su marcaje.

6. INCUBACIONES DE CÉLULAS CON NPMs

Para poder determinar las condiciones óptimas por las cuales las células linfoides se unen en mayor medida con las NPMs, se llevaron a cabo diferentes tipos de incubaciones con las mismas (**Fig. M4**):

- Incubación tradicional:** 2×10^6 células/ml fueron sembradas en pocillos de una placa de 24 y fueron incubadas con las NPMs (20 $\mu\text{g Fe/ml}$) en 500 μl del medio correspondiente durante 24 h.

- b) Incubación en presencia de agentes transfectantes [197]: 2×10^6 células/ml fueron sembradas en pocillos de una placa de 24 y fueron incubadas con las NPMs ($20 \mu\text{g Fe/ml}$) y Lipofectamina 2000 (1:125, Invitrogen) en $500 \mu\text{l}$ del medio correspondiente en ausencia de FBS durante 4 h. Posteriormente, fueron lavadas y sembradas de nuevo durante 20 h más. Nota: las NPMs se combinaron con la lipofectamina durante 30 min, antes de ser añadidas al cultivo celular.
- c) Incubación en pequeño volumen a altas concentraciones: 1×10^7 células/ml fueron incubadas con las NPMs ($50\text{-}150 \mu\text{g Fe/ml}$) en un tubo Falcon de 15 ml en presencia del medio correspondiente durante 2 h.
- d) Incubación magnética [189]: esta incubación fue similar a la incubación tradicional (a) en presencia de un CME debajo del pocillo, con el objetivo de atraer a las NPMs hacia el fondo del pocillo donde se encuentran las células.

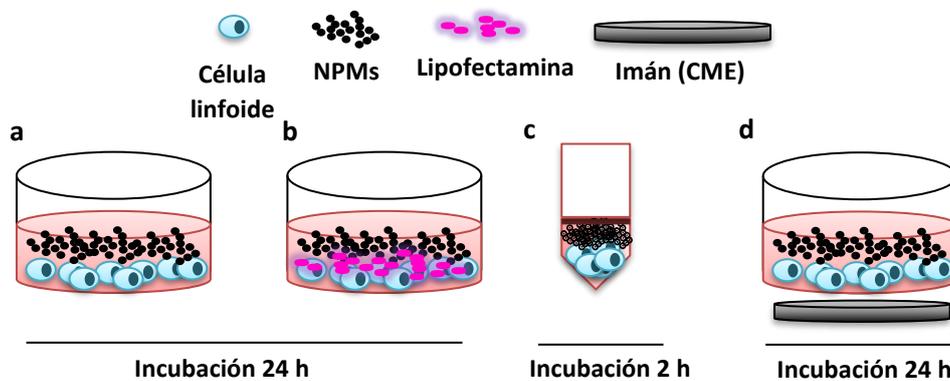


Fig. M4. Optimización de la asociación de NPMs con las células linfoides. Esquema gráfico de las diferentes incubaciones utilizadas (a, b, c y d) para determinar las condiciones óptimas de incubación entre las células linfoides y las NPMs.

7. CUANTIFICACIÓN DE NPMs

Con el fin de determinar la cantidad de NPMs asociadas a las células se procedió a la digestión en medio ácido de las mismas, tras su incubación con las diversas NPMs. De manera resumida, tras el tratamiento con las NPMs, se lavaron con PBS y se digirieron durante 1 h a 90°C con 1 ml de HNO_3 63% y posteriormente durante 1 h más con H_2O_2 . La determinación de hierro en las muestras se llevó a cabo por ICP-OES, como se describió previamente.

8. LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LAS NPMs

Para determinar la localización subcelular de las diferentes NPMs en las células, se llevaron a cabo diferentes tipos de microscopías. En primer lugar, se llevó a cabo la tinción de Azul de Prusia, que produce una intensa coloración azul en las zonas donde se encuentran presentes iones férricos (Fe^{3+}). De esta manera se puede comprobar si las NPMs se asocian con las células y dar una primera estimación sobre su localización en la célula por microscopía óptica. Las

células tratadas o no con las diferentes NPMs durante 2 h en condiciones estándar, tras lo cual se lavaron PBS, se fijaron con PFA (Sigma-Aldrich) 4% durante 15 minutos y se volvieron a lavar. Tras ser fijadas, las células se permeabilizaron con TritonX-100 durante 5 minutos y se tiñeron con una mezcla de ferrocianuro potásico (Sigma-Aldrich) al 4% y HCl (Merck) al 4% en proporción 1:1 durante 20-30 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con rojo neutro (Sigma-Aldrich) al 0.5% durante 1-2 minutos, tras lo cual volvieron a ser lavadas y se secaron y montaron utilizando medio de montaje (gelatina 7.7%, 54% glicerol) para su observación al microscopio. Las imágenes se adquirieron en un microscopio de campo claro invertido Olympus IX70 con los objetivos de inmersión 63x y 100x.

Asimismo, también se llevó a cabo microscopía confocal. Para marcar los lisosomas se añadió el colorante LysoTracker Red DND-99 (50 nM, Life Technologies) durante las 2 h de incubación. Posteriormente, se añadió otro colorante para teñir la membrana plasmática, WGA-AlexaFluor647 (1:500, ThermoFisher Scientific) durante los últimos 10-15 minutos de incubación. Posteriormente, las células se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% durante 15 minutos, se volvieron a lavar y se contratiñeron los núcleos incubando las células 10 min con DAPI (1:200, Sigma-Aldrich) diluido en PBS. Después, se montaron con Fluoromont-G (SouthernBiotec) para su observación mediante microscopía confocal y de campo oscuro. Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Leica TCS SP5, utilizando el objetivo de inmersión 63x/1.4 NA y en ocasiones, el zoom 5x. Para la adquisición en campo oscuro de las NPMs se utilizó el láser de 488 nm. El software de imagen ImageJ fue utilizado para el análisis de las imágenes obtenidas y la composición de las proyecciones ortogonales.

Finalmente, para la microscopía electrónica, las células fueron fijadas a TA en glutaraldehído 2% y ácido tánico 1% en HEPES 0.4 M a pH 7.2 tras su incubación con las NPMs durante 2 h en condiciones estándar y posterior lavado con PBS. Después, fueron lavadas y resuspendidas en HEPES. Tras esto, las muestras fueron procesadas e incluidas por el Servicio de Microscopía Electrónica del CNB. Las imágenes se adquirieron a diferentes magnificaciones con el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1011 y la cámara Gatan ES1000Ww.

9. CITOMETRÍA DE FLUJO

9.1. Marcaje vivas/muertas

En los casos en los que fue necesario, se utilizó el kit “LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain Kit (488 nm excitation)” (ThermoFisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, para distinguir entre las células vivas y muertas durante el análisis por citometría de flujo.

9.2. Marcaje de proteínas de membrana

Se depositaron 2.5×10^5 células/pocillo en una placa de 96 pocillos con fondo en V. Las células se centrifugaron a 2000 rpm 2 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y se lavaron añadiendo 150 µl/pocillo de PBS-staining y centrifugando posteriormente. Después, se añadieron 25 µl/pocillo de PBS-staining junto con el anticuerpo primario, en la concentración de uso, durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron de nuevo con 150 µl/pocillo de PBS-staining y en aquellos casos en los que el anticuerpo no estuviera marcado con un fluorocromo, se incubó de nuevo con 25 µl/pocillo de PBS-staining junto con el anticuerpo secundario correspondiente durante 30 min a 4°C. Finalmente, las células se lavaron en las mismas condiciones y se analizaron por citometría de flujo.

9.3. Marcaje de proteínas intracelulares

Se procedió de la misma manera que en el apartado anterior. Una vez que las proteínas extracelulares fueron marcadas, las células se fijaron con PFA 2% durante 10 min a 4°C. Para realizar el marcaje intracelular se permeabilizaron las células con una solución de saponina al 0.5% en PBS-staining. Primero, se lavaron con 150 µl/pocillo de esta solución y posteriormente se marcaron con los anticuerpos correspondientes diluidos en esta solución, a la concentración adecuada, durante 30 min a 4°C. Finalmente, se procedió al lavado de estas células y a su resuspensión en PBS-staining para su análisis por citometría de flujo.

Nota: en este caso las células fueron incubadas también en presencia de brefeldina A o monensina para inhibir el transporte de proteínas y poder detectar las proteínas intracelulares.

10. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

Para la caracterización por citometría de flujo de los diferentes tipos celulares utilizados tras su tratamiento con NPMs, se utilizaron los anticuerpos enumerados a continuación siguiendo el procedimiento explicado en el apartado anterior.

Para las células Jurkat se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-humano: anti-CD62L (DREGC 56, Coulter), -CD11a (25.3.1, Immunotech), -CD45 (KC56 (T-200), Beckman C.) y -CD44 (G44-26, Pharmingen). Para las células T primarias se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-CD44 (IM7), -CD62L (MeI-14), -CD11a (M17/4), -CCR7 (4B12), -CD4 (RMA-5) y -CD8 (53-6.7) (todos procedentes de Biolegend). El marcaje de CCR7 se llevó a cabo a 37°C durante 30 min con el anticuerpo primario biotinilado, seguido de una incubación con un anticuerpo secundario conjugado con un fluoróforo. Para las células NK-92MI se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-humano: anti-CD56 (N901 (NKH-1)), -CD95 (7C11) y -CD11a (25.3.1) de Immunotech, -CD16 (3G8) y -CD25 (B1.49.9) de Beckman C., -CD69 (FN50, eBioscience), -NKG2D (1D11, BD) y -IFN-γ

(B27, Pharmingen). Para las células NK primarias se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-NK1.1 (PK136), -CD69 (H1.2F3), -CD62L (Mel-14), -Ly49A+D (12A8) y -Ly49D (4E5) de Pharmingen, -NKG2D (CX5, Invitrogen), -CD27 (LG.3A10, BD), -CD11b (M1/70, Beckman C.), y -Ly49F (HBF-719, Coulter). Para las células OT-I se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-CD69 (H12F3), -CD25 (PC61) y -CD62L (Mel-14) de Pharmingen, -CD27 (LG.7F9), -IFN- γ (XMG1.2) y -CD127 (A7R34) de eBioscience y -CD44 (KM201, Beckman).

11. ANÁLISIS METABÓLICOS EN TIEMPO REAL

El perfil metabólico de las células T primarias murinas tratadas o no con APS-NPMs (150 μg Fe/ml durante 2 h en condiciones estándar) se obtuvo utilizando el analizador de flujo extracelular Seahorse XFp (Agilent Technologies) junto con el correspondiente kit "Cell Energy Phenotype Test Kit", siguiendo las instrucciones del proveedor.

12. MICROSCOPIA DE CALCIO

Para determinar si la señalización de calcio se ve afectada por la presencia de NPMs, se llevaron a cabo experimentos de microscopía para observar en tiempo real las variaciones de calcio intracelular tras cierta estimulación. En estos ensayos, se utilizó el indicador de calcio fluorescente Fluo-3AM (Invitrogen). Este tipo de indicadores son moléculas que aumentan su fluorescencia al unirse a Ca^{2+} intracelular, por lo que pueden detectar los cambios en los flujos de calcio celulares (Fig. M5).

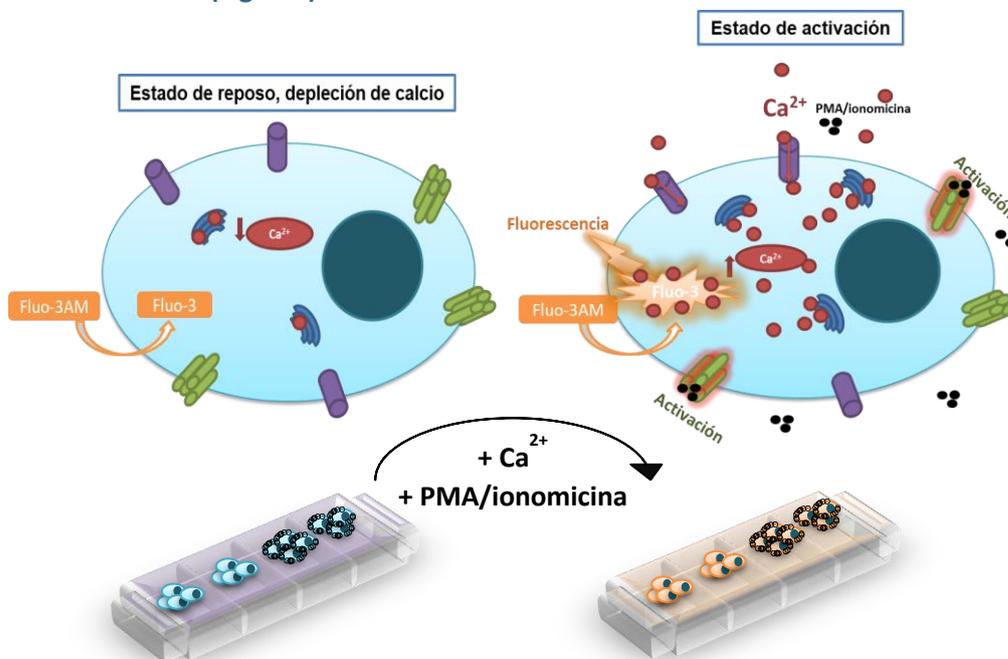


Fig. M5. Diseño experimental del ensayo de microscopía de calcio. El indicador de calcio Fluo-3 apenas presenta fluorescencia cuando las células T se encuentran en estado de reposo y depleción de calcio. Al añadir ciertos estímulos en presencia de calcio, la célula se activa y tienen lugar variaciones en los niveles de calcio. El indicador Fluo-3, al unirse a los iones Ca^{2+} liberados en el interior celular presentan un aumento de fluorescencia, lo que permite observar la dinámica de esta señalización.

Para ello, se tapizaron placas de 8 pocillos (1m-Slide 8 well ibiTreat, Microscopy Chamber; Ibbidi) con poli-L-lisina (0.01%, Sigma-Aldrich) durante 1 h a TA, lavándose posteriormente con PBS y dejándose secar a 37°C. Las células (células Jurkat o células T primarias de ratón) se trataron o no con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) durante 2 h en condiciones estándar, se lavaron con PBS y se dejaron durante 3 h en medio sin calcio. Tras esto, las células se tiñeron con Fluo-3AM (3 µM, Invitrogen) durante 30 minutos a 37°C en rotación y lavadas posteriormente con HBSS 1X (Gibco) suplementado con 10% FBS, en ausencia de calcio. Después, se sembraron 2.5×10^5 células en 250 µl del medio anterior sobre cada pocillo, tapizado anteriormente con poli-L-lisina y se dejaron adherir durante 5 minutos. Se tomaron imágenes cada 645 ms con un microscopio confocal Leica TCS SP5 con el objetivo de 20x y un zoom 2x y dentro de una cámara que mimetiza las condiciones del incubador. En primer lugar, se grabó durante 3 minutos en ausencia de cualquier tipo de estímulo y de calcio. Posteriormente, se añadieron con mucho cuidado 50 µl del mismo medio, esta vez suplementado para obtener en el pocillo 50 ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich), 5 µM de ionomicina (Sigma-Aldrich) y 2 mM de CaCl_2 y se procedió a la adquisición de imágenes inmediatamente después durante 10 minutos, en las mismas condiciones (Fig. M5). Asimismo, también se realizaron los controles correspondientes para tener en cuenta el ruido y la señal en ausencia de Fluo-3AM. El Software LAS X Life Science (Leica) se utilizó para analizar las fluctuaciones de fluorescencia en las células debido a las variaciones en el calcio intracelular. Al menos 3-4 vídeos y 100 células/vídeo fueron analizadas en cada condición.

13. ENSAYOS DE MIGRACIÓN *IN VITRO* EN CÁMARAS DE FLUJO

Para determinar si la aplicación de un CME era suficiente para promover la retención *in vitro* de las células cargadas con NPMs en presencia de fuerzas de flujo, se llevaron a cabo experimentos en cámaras de flujo. Para ello, fue necesario realizar ciertas modificaciones en cámaras de flujo comerciales (μ -Slide I Luer (0.4 mm), Ibbidi) (Fig. M6.A) para así poder aplicar el CME al mismo nivel de las células y lo más cerca posible. También fue necesaria la fabricación de un sistema de dos imanes, ya que de esta manera se crea un gradiente magnético mayor y más homogéneo. Los imanes utilizados (Tabla M1) fueron discos de neodimio-hierro-boro (Supermagnete), ya que es el material magnético más potente.

Las células fueron tratadas o no con diferentes concentraciones de APS-NPMs durante 2 h en condiciones estándar, lavadas posteriormente con PBS y teñidas con calceína-AM (1 nM, ThermoFisher Scientific) durante 20 minutos a 37°C en PBS suplementado con 0.5% FBS. Posteriormente, se diluyeron en el mismo buffer a una concentración de 2.5×10^5 células/ml. La cámara se conectó a un sistema de flujo y se montó sobre un microscopio invertido Olympus IX71 conectado sobre una estación de imagen cell^R y con una cámara que simula las

condiciones estándar del incubador. Se inyectó en primer lugar PBS 0.5% FBS para llenar el sistema y después, las células previamente preparadas se inyectaron en un flujo de 0.5 dina/cm^2 (0.1 ml/min). Se procedió a tomar imágenes durante 4 minutos cada 1 segundo. Transcurrido el primer minuto, se colocó con mucho cuidado el sistema de dos imanes sobre la cámara (Fig. M6.A,B) y se siguió grabando durante 2 minutos más en estas condiciones. Durante el último minuto, se retiraron los imanes. El software de análisis Imaris se utilizó para analizar los vídeos obtenidos y las trayectorias de las células, así como para cuantificar el desplazamiento de las mismas en la dirección del imán (desplazamiento en el eje Y).

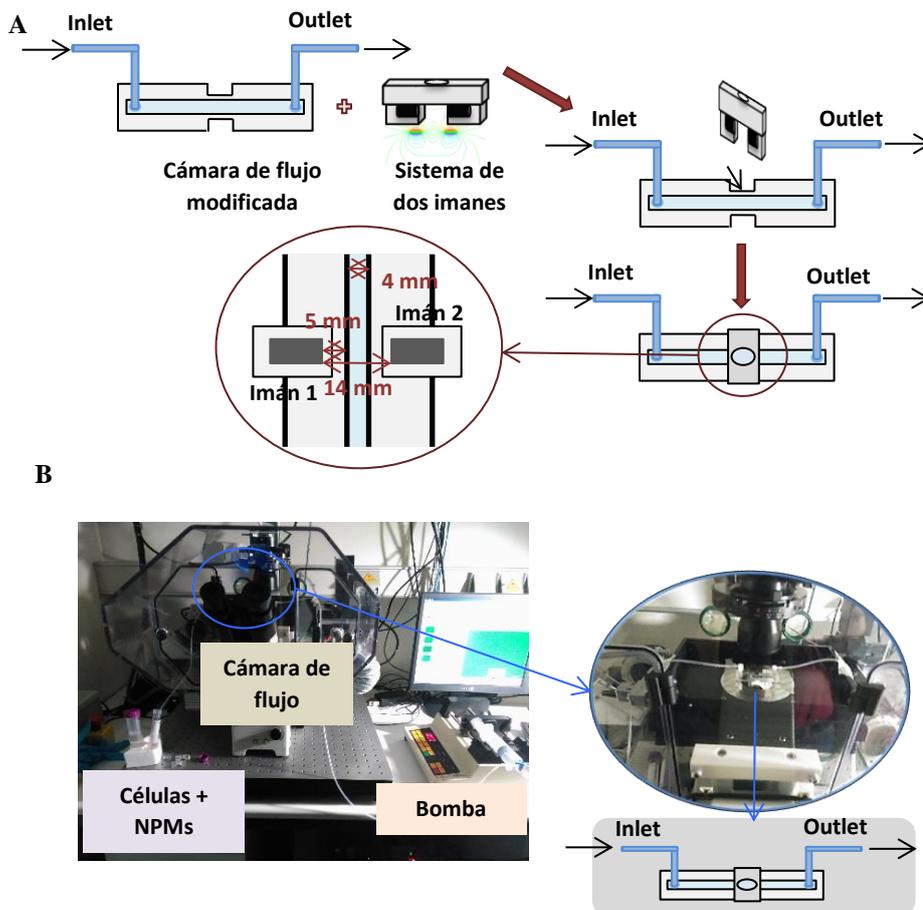


Fig. M6. Diseño experimental del ensayo en cámara de flujo. A) Modificaciones sobre la cámara de flujo y sistema de dos imanes utilizado. B) Montaje de la cámara de flujo sobre el microscopio bajo condiciones estándar de cultivo.

Imán	Magnetización remanente, Br (T)	Radio (mm)	Longitud (mm)
A	1.35	5	14
B	1.45	8	6

Tabla M1. Resumen de las propiedades de los imanes permanentes de neodimio-hierro-boro (NdFeB) utilizados para la retención magnética.

14. ENSAYOS DE MIGRACIÓN *IN VITRO*

14.1. Ensayo en transwell

Para estudiar la capacidad migratoria de las células linfoides en respuesta a gradientes quimiotácticos tras su asociación a NPMs, se realizaron ensayos de migración en cámaras de Boyden (Transwell Permeable Supports, Corning), que poseen una membrana porosa de diferentes tamaños de poro, según el tipo celular que se utilice. En el caso de las células T primarias de ratón, debido a su menor tamaño, se utilizaron transwell de 3 μm , mientras que para el resto de las células (células Jurkat, NK92-MI, OT-I y NK primarias) se utilizaron los transwell de 5 μm . Las quimioquinas empleadas fueron las siguientes: CXCL12 humano (10 nM, Peprotech) para las células Jurkat, CCL21 murino (25-100 nM, Peprotech) para las células T primarias de ratón y células OT-I, CXCL12 murino (100 nM, Peprotech) para las células OT-I, fractalquina recombinante murina (CX3CL1, aa25-105) (100 ng/ml, R&D Systems) para las células NK primarias y CXCL12 humano (100 ng/ml, Peprotech) para las células NK-92MI.

Para este ensayo, las células fueron tratadas o no con APS-NPMs (150 μg Fe/ml) durante 2 h en condiciones estándar y lavadas con PBS. Tras esto, se marcaron las membranas celulares con los kits de marcaje fluorescente de células en rojo (PKH26) o verde (PKH67) (ambos de Sigma-Aldrich), para discriminar aquellas células tratadas de las células control (no tratadas) y de manera alterna en los diferentes experimentos, para evitar posibles efectos inespecíficos del marcaje (**Figura M7.A**). Las células control y tratadas con NPMs se mezclaron en proporción 1:1 en su medio correspondiente con 0.5% FBS y 100 μl de la mezcla (2×10^5 células) se sembraron en el pocillo superior del inserto transwell adecuado. En cada pocillo inferior de la placa se añadieron 600 μl del mismo medio, pero suplementado con la quimioquina de estudio y se incubó en condiciones estándar durante un tiempo determinado (2-16 h). Pasado este tiempo, se recogió el medio del pocillo inferior, se cuantificó el número de células presentes en el mismo usando un citómetro de flujo y se estableció el porcentaje de células que migraron respecto al número de células inicial (input: pocillo sin transwell). Para evaluar el efecto de un CME en este tipo de ensayos, se repitió el estudio colocando el imán B (**Tabla M1**) debajo de cada pocillo (**Figura M7.B**). Además, en el caso de las células T primarias de ratón, se incubó con los anticuerpos marcados α -CD8 (53-6.7) y α -CD4 (RMA-5) para discernir entre ambos tipos celulares. El análisis se llevó a cabo con el software FlowJo.

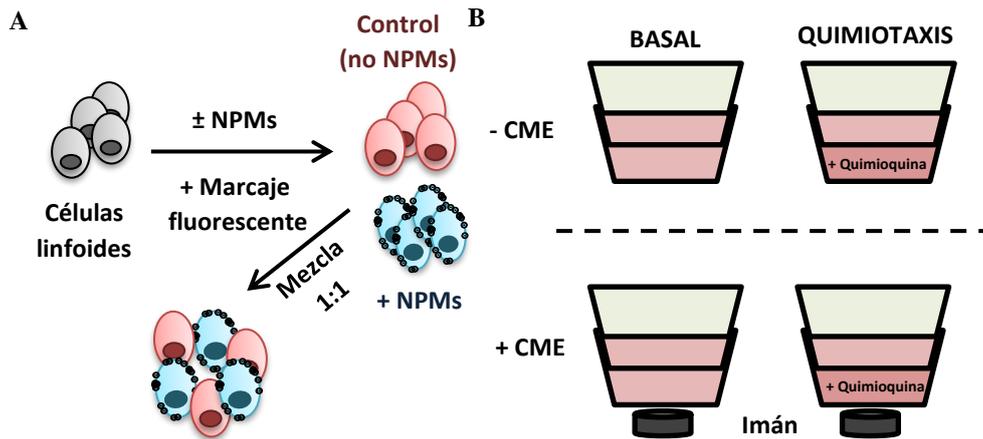


Fig. M7. Diseño experimental del ensayo transwell. A) Preparación de las células, mediante el tratamiento con NPMs y el marcaje diferencial, previo a la siembra sobre el pocillo transwell. B) Esquema que muestra las diferentes condiciones durante el experimento de migración *in vitro*.

14.2. Ensayo “under agarose”

El día anterior al ensayo se llevó a cabo la **preparación de las placas (Fig. M8.A)**. Para ello, se fijaron cubreobjetos bajo los orificios presentes en el centro de las placas. Después, sobre el orificio se fijaron con parafina unos anillos que lo limitan. Una vez fijados, se limpiaron bien las superficies y se incubó con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteína A diluido en PBS a pH 9, durante 1 h a 37°C. Después, se lavaron con PBS y se incubaron con 1.5% BSA O/N a 4°C. Al día siguiente, se lavaron e incubaron con ICAM-1 recombinante murino/Fc humano (100 nM, 796-IC, R&D) durante 2 h a 37°C, tras lo cual volvieron a lavarse y se bloquearon con 1.5% BSA durante 30 min a 37°C. Después, se dejaron a 4°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la **preparación de la capa de agarosa**, una parte de buffer HBSS 2X, dos partes de medio RPMI 1640 suplementado con 20% FBS y el doble de la concentración del resto de suplementos, y una parte de 1% agarosa de alto peso molecular (Biozym Gold Agarose, Biozym) en agua fueron mezcladas a 56°C. Finalmente, se tapizaron las placas, guardadas a 4°C con CCL21 (500 nM) durante 20 min a 37°C y posteriormente se añadieron 500 μl de la mezcla de agarosa preparada previamente y atemperada, se dejó polimerizar a TA durante 5 min y se equilibró primero a 4°C por 1 h y después a 37°C por 20 min.

Por otro lado, el día del ensayo, se aislaron células T primarias de ratones “Ubi GFP” y posteriormente se trataron o no con APS-NPMs (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$) durante 2 h en condiciones estándar. Después, fueron marcadas (sólo las células control o sólo las tratadas) con 5 μM CMTMR (CellTracker Orange CMTMR Dye, Invitrogen) durante 20 min y se preparó una mezcla de células control y tratadas en proporción 1:1. Durante el experimento, se inyectó esta mezcla de células bajo el bloque de agarosa con una micropipeta (Fig. M8.B), a diferentes distancias de donde se posicionará el imán B (Tabla M1) (Fig. M8.A), y se dejó que polarizaran al menos 30

min en condiciones estándar antes de proceder a su observación bajo el microscopio. Se dispuso la placa sobre el microscopio, y se fijaron diversas posiciones para su observación. Las imágenes se adquirieron, bajo condiciones de incubación (37°C, 5% CO₂), con el microscopio de fluorescencia invertido Zeiss AxioObserver.Z1, y utilizando el objetivo de inmersión 20x/0.5, en intervalos de 20 s. Los softwares Imaris y MATLAB fueron utilizados para el análisis de los vídeos obtenidos y la obtención de ciertos parámetros de motilidad (velocidad y desplazamiento medio).

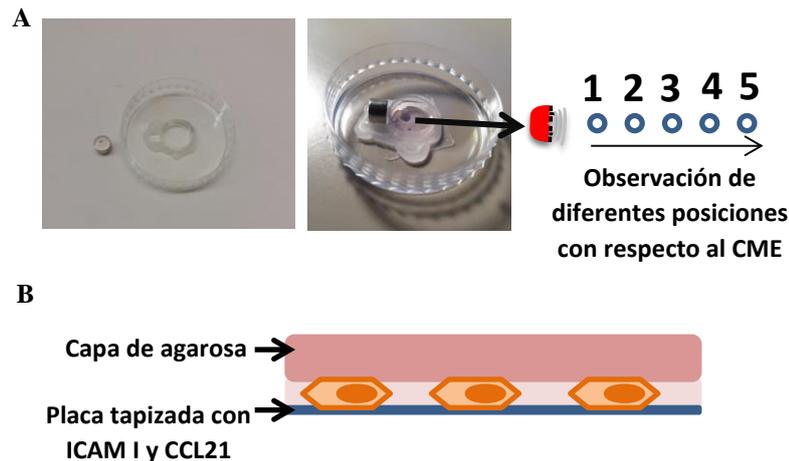


Fig. M8. Diseño experimental de los experimentos de migración *in vitro* "under agarose". A) Imágenes representativas sobre el diseño de las placas utilizadas y la disposición del imán. B) Esquema gráfico que muestra la disposición de las células en confinamiento *in vitro* bajo la capa de agarosa.

15. TRANSFERENCIA ADOPTIVA CELULAR Y HOMING

Para determinar si la capacidad para llegar a los diferentes órganos linfoides secundarios de las células tratadas con NPMs se veía afectada y estudiar la posibilidad del direccionamiento magnético en este caso, como primera prueba de concepto en la primera parte de esta Tesis, se analizó la capacidad de realizar homing tras la incubación con NPMs y en ausencia o presencia de un CME.

Las células Jurkat o las células T primarias aisladas de ratones C57BL/6, tratadas o no con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) durante 2 h en condiciones estándar, fueron marcadas, de manera alterna, con la sonda CellTrace CFSE (Invitrogen) y/o con Dye eFluor 670 (ThermoFisher Scientific) y se preparó una mezcla de células control y tratadas en proporción 1:1 a una concentración de 10⁸ células/ml en PBS. 100 µl de esta mezcla de células Jurkat o células T primarias, se inocularon por vía intravenosa en ratones nude o C57BL/6, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados tras 90 minutos o 24 h en el caso de la transferencia de células Jurkat, o 1 hora en el caso de la transferencia de células T primarias. Posteriormente, se recogieron los siguientes órganos: bazo, NLs periféricos (inguinales y axilares) y NLs mesentéricos y se procesaron hasta obtener una suspensión celular que fue analizada por citometría de flujo (FACSCalibur BD) con

el fin de detectar el porcentaje y el cociente de las células transferidas y marcadas previamente con fluoróforos. El análisis se llevó a cabo con el software FlowJo.

En el caso del direccionamiento magnético hacia un NL poplíteo específico, el imán B (**Tabla M1**) fue dispuesto y fijado sobre el mismo y el experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el caso anterior con algunas modificaciones, las cuales se exponen a continuación. Los ratones tuvieron que ser anestesiados previamente, para poder fijarles el imán sobre el NL, mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina (121 µg/g, Merial) y xilacina (14 µg/g, Calier). Además, el tiempo de desarrollo del estudio fue de 30 y 90 minutos en el caso de la transferencia de células Jurkat y de 20 minutos para las células T primarias. Finalmente, se recogieron y analizaron los NLs siguientes: poplíteos, axilares e inguinales.

16. MICROSCOPIA DE ILUMINACIÓN SELECTIVA DE PLANOS

Los NLs poplíteos en algunos de los experimentos anteriores (tras la transferencia de células T primarias obtenidos de ratones “Ubi-GFP”) fueron recogidos y preparados para su observación mediante microscopía de iluminación selectiva de planos (SPIM) con el objetivo de determinar, entre otros parámetros, si la localización de las células en el interior del NL se ve afectada por la presencia de las NPMs y la exposición a un CME. Además, fue necesario inocular, por vía intravenosa, 15-20 µg del anticuerpo MECA79-AlexaFluor633 (Nanotools), el cual marca las vénulas altas endoteliales (HEV) de los NLs. Para ello, tras su extracción, se fijaron en PFA 4% durante 24 h y después se limpió el tejido adiposo bajo un estereomicroscopio. Una vez limpios, se montaron en agarosa ultrapura de bajo peso molecular al 2% y se procedió al aclaramiento óptico siguiendo el protocolo previamente descrito [198]. Finalmente, se llevó a cabo la microscopía como está descrito [199].

17. MICROSCOPIA MULTIFOTÓNICA

17.1. Transferencia de células T y microscopía multifotónica

Con el objetivo de analizar el comportamiento *in vivo* de las células asociadas con NPMs en el interior del NL a tiempo real se realizó el siguiente estudio, únicamente con células T primarias de ratón, utilizando microscopía multifotónica (2PM).

Por un lado, el NL poplíteo derecho de un ratón C57BL/6 de unas 4 semanas de edad se preparó para su visualización al microscopio según se describe en este trabajo previo [200]. Además, en los casos en que fuera requerido, uno o dos imanes de neodimio (imán B, **Tabla M1**) fueron situados lo más próximos al NL expuesto que se pudo (**Fig. M9**).

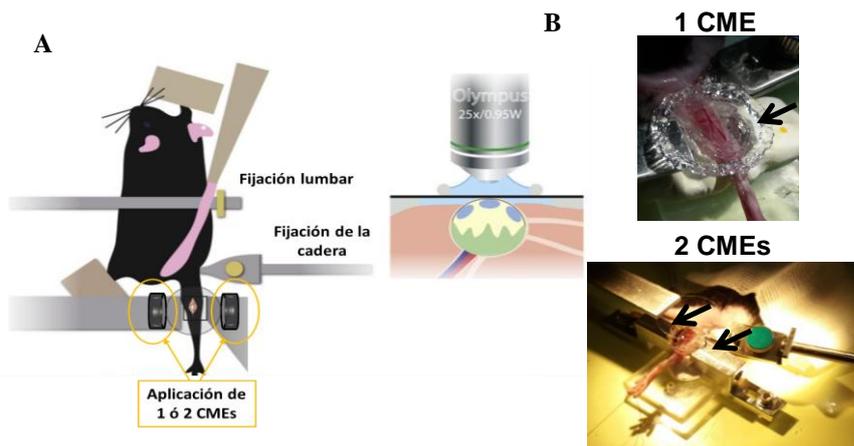


Fig. M9. Diseño experimental de los experimentos 2PM. A) Esquema sobre la inmovilización del ratón y la exposición del NL poplíteo (modificado de Stein J.V. et al, 2017 [201]). B) Aplicación de 1 o 2 CMEs sobre el NL poplíteo expuesto.

Por otro lado, las células, tratadas o no con APS-NPMs (150 μg Fe/ml) durante 2 h en condiciones estándar, fueron marcadas, de manera alterna, con 5 μM CMTMR (CellTracker Orange CMTMR Dye, Invitrogen) y/o con 20 μM CMAC (Cell Tracker Blue Dye, Invitrogen) y se preparó una mezcla de células control y tratadas en proporción 1:1 a una concentración de 10^8 células/ml en PBS. 100 μl de esta mezcla de células, junto con 15-20 μg del anticuerpo MECA79-AlexaFluor633 (Nanotools), para marcar las HEVs de los NLs, se inocularon por vía intravenosa en el ratón previamente preparado y se dispuso a grabar. El microscopio multifotón está formado por un microscopio de fluorescencia Olympus BX50WI con un objetivo 20x, un sistema TrimScope 2PM y es controlado con el programa Imspector (LaVision Biotec). El software de análisis Imaris y el programa de Ibidi "Chemotaxis and Migration tool" fueron usados en el análisis de los vídeos obtenidos, con el objetivo de determinar la velocidad y la trayectoria de las células en el interior del NL.

17.2. Transferencia de DCs y microscopía multifotónica

Para determinar el comportamiento *in vivo* de otro tipo celular, capaz de internalizar gran cantidad de NPMs, en el interior del NL y en presencia o ausencia de un CME, se realizó una prueba mediante la transferencia de DCs, cargadas o no con NPMs. Para ello, se prepararon suspensiones celulares procedentes de médula ósea del fémur y la tibia de varios ratones, y se pusieron en cultivo en presencia de 20% de sobrenadante que contiene FLT3L y que es producido por la línea celular transfectada SP2/0 [202], durante 7 días.

A los 7 días de cultivo, se obtuvo un cultivo de DCs inmaduras. Se trataron o no con APS-NPMs (150 μg Fe/ml) durante 2 h en condiciones estándar y posteriormente, se lavaron y se dispusieron en una placa de cultivo con su medio correspondiente suplementado, para su activación, con LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich), en condiciones estándar durante 24 h (Fig. M10). Al día siguiente, se comprobó por citometría de flujo el cultivo (tratado o no con NPMs), utilizando los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-CD86 (GL-1), -CD80 (16-10A1), -CD11b

(M1/70), -CD11c (N418), -IA/IE (M5/114) y -CCR7 (4B12), todos ellos de Biolegend. Posteriormente, se marcaron, de manera alterna, con 5 μM CMTMR y/o con 20 μM CMAC y se preparó una mezcla de células control y tratadas en proporción 1:1 a una concentración de 2×10^8 células/ml en PBS. Se inocularon 20 μl en la almohadilla plantar de varios ratones. Al día siguiente, se prepararon a los ratones para la realización de la microscopía multifotónica del NL poplíteo (del mismo lado en el que se inocularon las DCs el día anterior) y se procedió de la misma manera que en el apartado anterior (a excepción de la inoculación de células, que se realizó previamente el día anterior). Estos experimentos se llevaron a cabo en presencia o no de un CME en uno de los lados del NL (Fig. M10).

Cabe destacar que en algunos experimentos se partió de DCs obtenidas a partir de los ratones “Ubi-GFP”, por lo que en este caso sólo se procedió al marcaje de unas de ellas con 5 μM CMTMR. En este caso se diferenciaron dado que unas expresarán solo GFP y las otras emitirán fluorescencia tanto por expresar GFP como por estar teñidas con CMTMR.

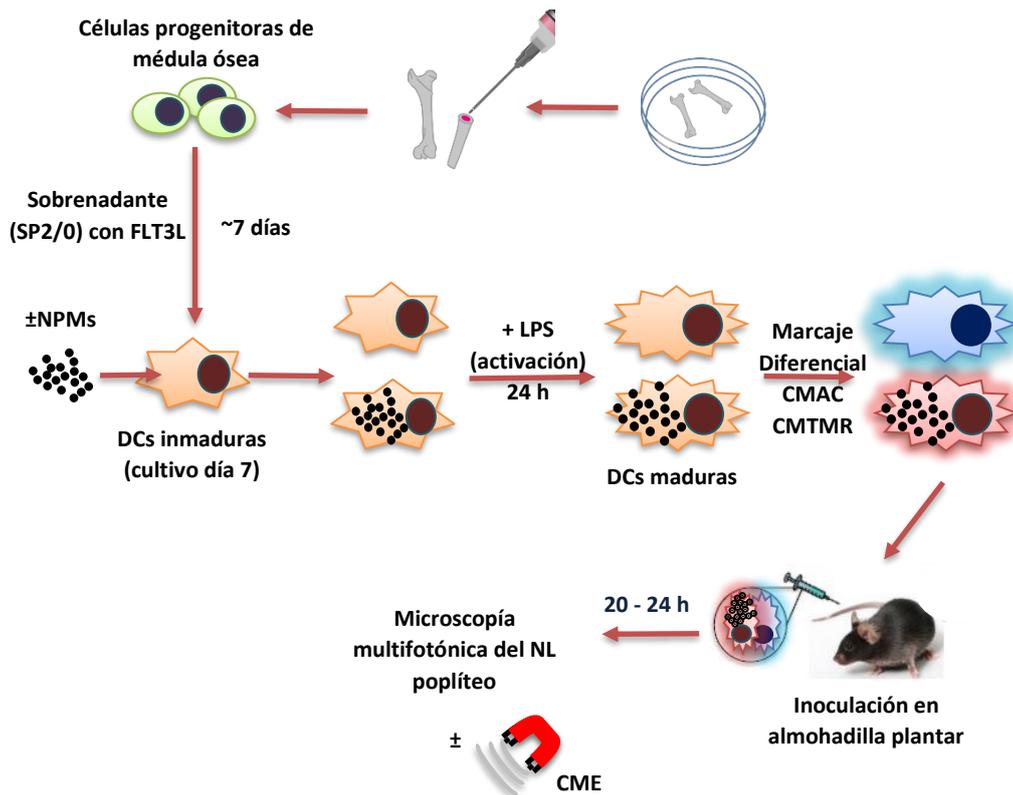


Fig. M10. Diseño experimental del ensayo de microscopía multifotónica con DCs. Se obtuvieron DCs a partir de médula ósea de ratones, las cuales fueron tratadas o no con NPMS, activadas con LPS e inoculadas en la almohadilla plantar de otros ratones, con el fin de hacer microscopía multifotónica.

18. ENSAYOS FUNCIONALES DE CÉLULAS LINFOIDES

18.1. Ensayos de conjugación

La línea celular NK-92MI o las células NK primarias, tras haber sido expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas o no con NPMs, así como sus correspondientes dianas (K562 o YAC-1 y RMA/S) se tiñeron con los kits de marcaje fluorescente de células en rojo (PKH26) o verde (PKH67) (ambos de Sigma-Aldrich), alternando los marcajes entre las células efectoras y diana en los diferentes experimentos. Las células NK y sus correspondientes células diana se co-incubaron en relación 1:2 en condiciones estándar de incubación, durante diversos períodos de tiempo, tras lo cual fueron fijadas en PFA 1% y analizadas por citometría de flujo (Fig. M11). Cada condición se realizó por duplicado. Los eventos positivos en ambos colores fueron considerados conjugados entre la célula NK y su diana y el porcentaje de conjugación se calculó como: $(\% \text{ células NK conjugadas} / \% \text{ células NK totales}) \times 100\%$.

Para los experimentos de conjugación entre las células OT-I, tras haber sido activadas con el péptido OVA y expandidas con IL-2 y tratadas o no con NPMs, y su diana EG7-OVA, se procedió exactamente de la misma manera, pero en relación 1:1.

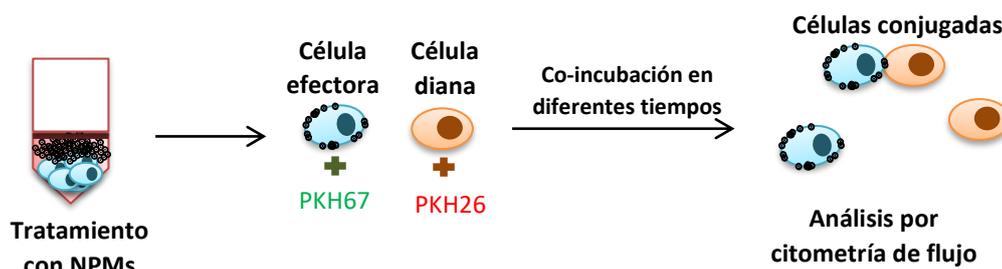


Fig. M11. Diseño experimental de los ensayos de conjugación. Se trataron las células efectoras con las NPMs, posteriormente se llevó a cabo el marcaje diferencial de las células efectoras y dianas y se co-incubaron en diferentes tiempos. Finalmente se analizó la formación de conjugados por citometría de flujo.

Para llevar a cabo la **microscopía confocal** de la conjugación entre las células NK murinas y las células RMA/S, se procedió de igual manera, pero sin llevar a cabo la tinción fluorescente previa de las células. Una vez terminado el tiempo de conjugación, se fijaron las células con PFA 4% durante 15-20 min, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con 0.05% Tritón X100 durante 10 min. Posteriormente se lavaron con PBS y se añadió una solución de bloqueo (“Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components”, Agilent) durante 45 min a TA. Posteriormente se incubó a 4°C O/N con los anticuerpos primarios siguientes diluidos en la solución anterior:

- Anticuerpo de ratón anti- β tubulina (1:200, Sigma-Aldrich).
- Anticuerpo de conejo anti-perforina (1:200, Cell Signaling).

Al día siguiente se lavaron con PBS y se incubaron de nuevo, esta vez durante 1 h a RT, con los anticuerpos secundarios:

- Anticuerpo anti-conejo conjugado con Alexa Fluor 488 (1:400, ThermoFisher Scientific).
- Anticuerpo anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 647 (1:500, ThermoFisher Scientific).
- Faloidina conjugada con TRITC (1:500, Sigma-Aldrich), para marcar los filamentos de actina.

Finalmente, se lavaron con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Fluoromong-G para su observación al microscopio confocal. Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Leica TCS SP5, utilizando el objetivo de inmersión 63x/1.4 NA y en ocasiones, el zoom 5x. El software de imagen ImageJ fue utilizado para el análisis de las imágenes obtenidas.

18.2. Ensayos de desgranulación

Este ensayo se realizó para determinar la capacidad de desgranulación de los diferentes tipos celulares mediante el análisis de los niveles de expresión de CD107a por citometría de flujo tras la exposición a diferentes estímulos (Tabla M2). Se llevó a cabo con la línea celular NK-92MI, con las células NK murinas (tras haber sido expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas o no con NPMs), o con las células OT-I (tras haber sido activadas con el péptido OVA y expandidas con IL-2 y tratadas o no con NPMs). Para ello, se incubaron 2×10^5 células efectoras con ciertos estímulos o dianas específicas, en presencia de 10 $\mu\text{g/ml}$ de monensina (Sigma-Aldrich) y 5 μl del anticuerpo CD107a conjugado con FITC (o su correspondiente control). Tras 4-5 h de incubación en condiciones estándar, se marcaron para citometría NKp46 y CD3 (en el caso de las células NK murinas) o CD3 y CD8 (en el caso de las células OT-I). El porcentaje de células CD107a positivas (NKp46⁺CD3⁻ para células NK o CD3⁺CD8⁺ para células OT-I) se analizó por citometría de flujo (Fig. M12).

TIPO CELULAR	ESTÍMULO	Concentración	Tipo de estímulo	Clon	Casa comercial/Origen
Células NK primarias	α -mouse NKG2D	10 $\mu\text{g/ml}$	Pocillos tapizados O/N a 4°C	A10	eBioscience
	α -mouse NKp46	5 $\mu\text{g/ml}$	Pocillos tapizados O/N a 4°C	29A1.4	Biolegend
	α -mouse NK1.1	10 $\mu\text{g/ml}$	Pocillos tapizados O/N a 4°C	PK136	Biolegend
Células NK-92MI	α -human NKG2D	10 $\mu\text{g/ml}$	Pocillos tapizados O/N a 4°C	1D11	Pharmingen
	Células K562	2 x nº células NK-92MI	Co-cultivo	-	Cedidas por Dr. A. Pérez Martínez (IdiPaz)
Células OT-I	Células EG7-OVA	2 x nº células OT-I	Co-cultivo	-	ATCC
	Células EG7-OVA + péptido OVA ₂₅₇₋₂₆₄	2 x nº células OT-I / 10 μM	Co-cultivo/soluble	-	ATCC / Servicio de Proteómica (CNB)

Tabla M2. Estímulos utilizados en los diferentes experimentos de desgranulación.

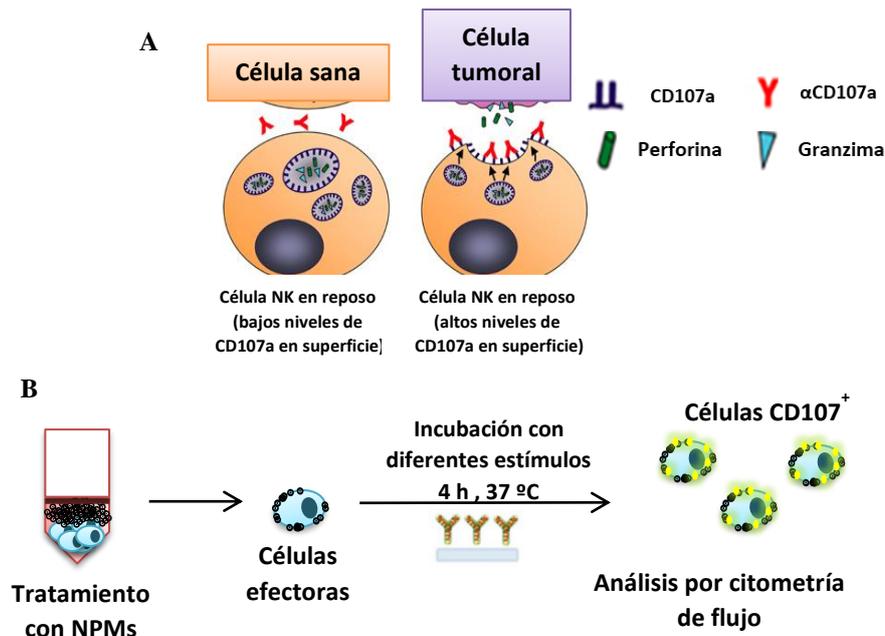


Fig. M12. Diseño experimental de los ensayos de desgranulación. A) Fenómeno de desgranulación en células NK tras su activación en presencia de células diana (modificado de Uhrberg M., 2005 [203]) B) Se trataron las células efectoras con las NPMs, posteriormente se estimularon de diversas maneras y finalmente se analizó la presencia del marcador de desgranulación CD107a por citometría de flujo.

18.3. Ensayos de citotoxicidad

La línea celular NK-92MI o las células NK murinas, tras haber sido expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas o no con NPMs, se co-incubaron con sus correspondientes dianas (K562 o YAC-1 y RMA/S) previamente teñidas con el kit de marcaje fluorescente en verde (PKH67) (Sigma-Aldrich) en diferentes ratios en un volumen total de 200 µl, durante 4 h en condiciones estándar de incubación, en placas de 96 pocillos de fondo en U. Cada condición se realizó por duplicado. La reacción se detuvo mediante la adición de 250 µl de PBS-staining frío y se dispusieron en tubos de citometría en hielo. 15 µl de PI se añadieron a cada pocillo justo en el momento previo a ser analizado por citometría de flujo (Fig. M13). Las células diana se detectaron por ser positivas en el canal FL1. El porcentaje de lisis específico de cada célula diana se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lisis} = \frac{\% \text{ células diana muertas} - \% \text{ muerte espontánea}}{100 - \% \text{ muerte espontánea}} \times 100\%$$

El porcentaje de muerte espontánea se llevó a cabo en ausencia de células efectoras.

Para los experimentos de citotoxicidad de las células OT-I, tras haber sido activadas con el péptido OVA y expandidas con IL-2 y tratadas o no con NPMs, y su diana EG7-OVA, se procedió exactamente de la misma manera. En este caso, el período de co-incubación fue de 5 h.

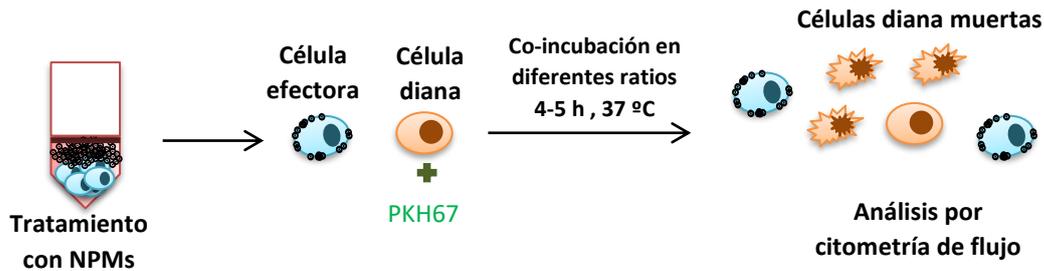


Fig. M13. Diseño experimental de los ensayos de citotoxicidad. Se trataron las células efectoras con las NPMs, posteriormente se llevó a cabo el marcaje de las células dianas y se co-incubaron en diferentes ratios. Finalmente se analizó la proporción de muerte en las células diana por citometría de flujo.

18.4. ELISA IFN- γ

El sobrenadante obtenido durante el experimento de desgranulación en las células NK murinas (Apartado 18.2) se recogió y la producción de IFN- γ en el mismo (producido por las células NK) se analizó mediante el kit comercial ELISA “BD OptEIA Mouse IFN- γ ELISA Set”, siguiendo las instrucciones del fabricante.

18.5 Tinción intracelular de IFN- γ

La línea celular NK-92MI, tras haber sido tratada o no con NPMs, o las células OT-I, tras haber sido activadas con el péptido OVA y expandidas con IL-2 y tratadas o no con NPMs, se expusieron a diferentes estímulos (**Tabla M3**) para determinar su capacidad de producción de IFN- γ mediante el análisis de los niveles de IFN- γ intracelular por citometría de flujo. Para ello, se incubaron 2×10^5 células efectoras con ciertos estímulos o dianas específicas en presencia de brefeldina A (1X, Biolegend). Tras 4-5 h de incubación en condiciones estándar, se marcaron para citometría CD56 (en el caso de las células NK-92MI) o CD3 y CD8 (en el caso de las células OT-I) y posteriormente se llevó a cabo la tinción para proteínas intracelulares explicado en el Apartado 9 de Materiales y Métodos para el marcaje intracelular de IFN- γ . El porcentaje de células IFN- γ^+ (dentro de la población CD56 $^+$ en células NK-92MI o CD3 $^+$ CD8 $^+$ en células OT-I) se analizó por citometría de flujo (**Fig. M14**).

TIPO CELULAR	ESTÍMULO	Concentración	Tipo de estímulo	Clon	Casa comercial/Origen
Células NK-92MI	Células K562	$2 \times n^{\circ}$ células NK-92MI	Co-cultivo	-	Cedidas por Dr. A. Pérez Martínez (IdiPaz)
	PMA/ionomicina	25 ng/ml – 1 μ g/ml	Soluble	-	Sigma-Aldrich
Células OT-I	Células EG7-OVA + péptido OVA ₂₅₇₋₂₆₄	$2 \times n^{\circ}$ células OT-I / 10 μ M	Co-cultivo/soluble	-	ATCC / Servicio de Proteómica (CNB)
	PMA/ionomicina	25 ng/ml – 1 μ g/ml	Soluble	-	Sigma-Aldrich

Tabla M3. Estímulos utilizados en los diferentes ensayos de evaluación de la producción de IFN- γ .

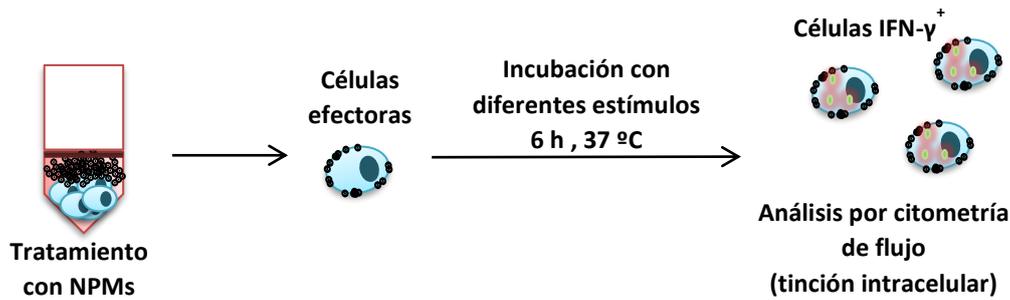


Fig. M14. Diseño experimental de los ensayos de producción de IFN- γ . Se trataron las células efectoras con las NPMs, posteriormente se estimularon de diversas maneras y finalmente se analizó la producción de IFN- γ intracelular por citometría de flujo.

19. ENSAYOS DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES

$3-4 \times 10^4$ de células endoteliales murinas SVEC4-10 se sembraron sobre cubreobjetos, de 12 mm de diámetro, dispuestos en una placa de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron en condiciones estándar hasta la formación de una monocapa (2-3 días). Una vez formada, se procedió a la activación de la misma con TNF α murino (250 U/ml, Peprotech) durante 6-7 h. Por otro lado, las células OT-I o NK murinas, tras haber sido expandidas, se marcaron con la sonda CellTrace CFSE (2.5 μ M, ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez marcadas, se trataron con diferentes concentraciones de APS-NPMs durante 2 h en condiciones estándar, tras lo cual, 5×10^4 de células se sembraron sobre la monocapa de endotelio activada y se incubaron durante 1 h (Fig. M15). Después, se lavaron con PBS, se fijaron con PFA 4% durante 20 min y se procedió a teñir los filamentos de actina con faloidina-TRITC (1:500, Sigma-Aldrich) durante 45 min a TA en oscuridad, para así poder diferenciar la monocapa en microscopía. Finalmente, se lavó con PBS y se montaron sobre portaobjetos con Fluoromont-G para su observación mediante microscopía confocal. Las imágenes se adquirieron con el microscopio confocal Leica TCS SP5, utilizando los objetivos 10x y 20x, barriendo toda la monocapa en cortes de 1 μ m. El software de imagen ImageJ fue utilizado para el análisis de las imágenes obtenidas.

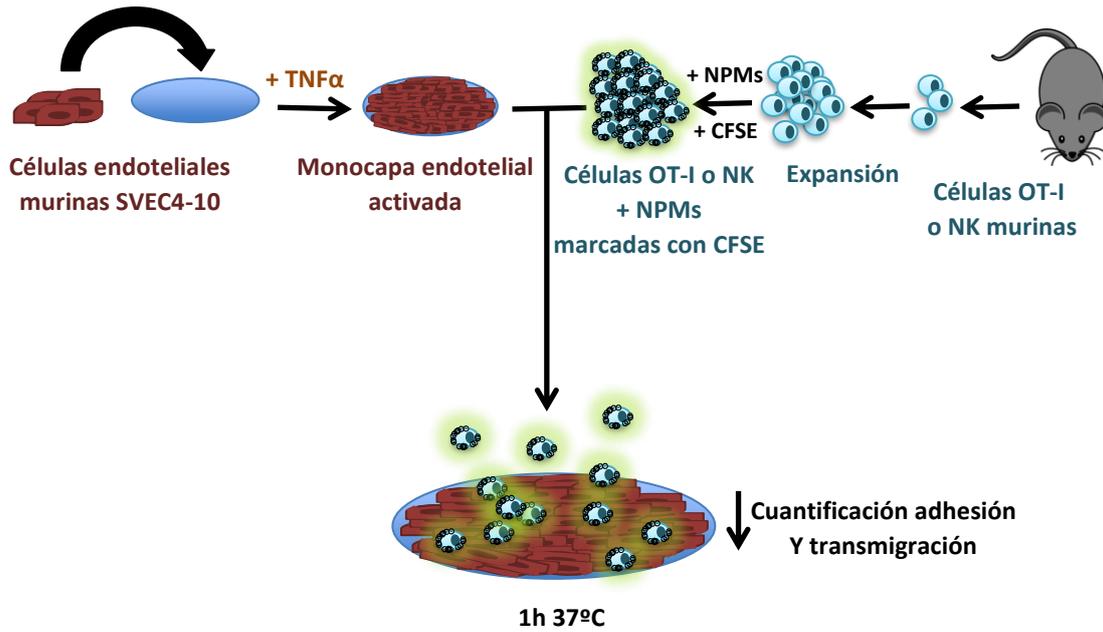


Fig. M15. Diseño del experimento de adhesión y trans migración. Se preparó y activó la monocapa de células endoteliales murinas. Posteriormente, se expandieron las células OT-I o NK murinas y se trataron con NPMs y marcaron fluorescentemente. Finalmente, se sembraron sobre la monocapa de endotelio.

20. MODELO TUMORAL EG7-OVA

Con el fin de determinar la dosis adecuada de células EG7-OVA para la generación de un tumor subcutáneo, se inyectaron 3 dosis diferentes de células (0.5 , 1 o 3×10^6 células), resuspendidas en PBS, en un volumen de $100 \mu\text{l}$, en el flanco derecho o izquierdo de un grupo de ratones. Su crecimiento fue monitorizado dos-tres veces por semana, midiendo su anchura (x) y longitud (y) con un calibre, y calculando el volumen tumoral en base a la siguiente fórmula: $(x^2 * y)/2$.

Finalmente, para el modelo de tratamiento, se decidió inyectar 0.5×10^6 células EG7-OVA, en un volumen de $100 \mu\text{l}$ de PBS, en el flanco derecho de un grupo de ratones. Se monitorizó su crecimiento y cuando se alcanzaron los $100\text{-}200 \text{ mm}^3$ se comenzó el tratamiento.

21. TRANSFERENCIA ADOPTIVA DE CÉLULAS OT-I

21.1. Administración de los tratamientos

Una vez alcanzados tumores de alrededor de $100\text{-}200 \text{ mm}^3$ se prepararon 4 grupos de ratones y se procedió a la inoculación de los diferentes tratamientos (**Fig. M16**):

- **Grupo 1, PBS:** grupo control.
- **Grupo 2, células OT-I:** 8×10^6 células OT-I.
- **Grupo 3, células OT-I + APS-NPMs:** 8×10^6 células OT-I tratadas con APS-NPMs ($150 \mu\text{g Fe/ml}$).
- **Grupo 4, células OT-I + APS-NPMs + CME:** 8×10^6 células OT-I tratadas con APS-NPMs ($150 \mu\text{g Fe/ml}$) y aplicación de un CME sobre el tumor durante unos 90 min. Para poder fijar el imán sobre el tumor, los ratones tuvieron que ser anestesiados previamente, mediante inyección

intraperitoneal de una mezcla de ketamina (121 $\mu\text{g/g}$) y xilacina (14 $\mu\text{g/g}$). Se vigiló el estado de los animales hasta su completa recuperación.

Las células OT-I utilizadas fueron obtenidas de unos 7 ratones OT-I, aisladas 5 días antes y activadas y expandidas según se indica en el Apartado 4 de Materiales y Métodos. Una vez expandidas, se preparó un pool de células, a partir de lo cual se prepararon los diferentes tratamientos para los grupos 2, 3 y 4. Además, el imán utilizado en el grupo 4, fue el mismo utilizado en los experimentos de migración *in vitro*, homing, SPIM y microscopía multifotónica (Apartados 14-17 de Materiales y Métodos): imán de neodimio de 8 mm de grosor y 6 mm de longitud (imán B, [Tabla M1](#)).

El tratamiento se administró una única vez, y el tamaño tumoral, así como el estado y peso de los ratones se monitorizó cada 2-3 días durante 2 semanas. Tras el día 14, se procedió al sacrificio de los ratones y se recogieron diversas muestras biológicas para su análisis: tumores, bazo, NLS proximales (aquél NL que drena el tumor) y NLS distales ([Fig. M16](#)).

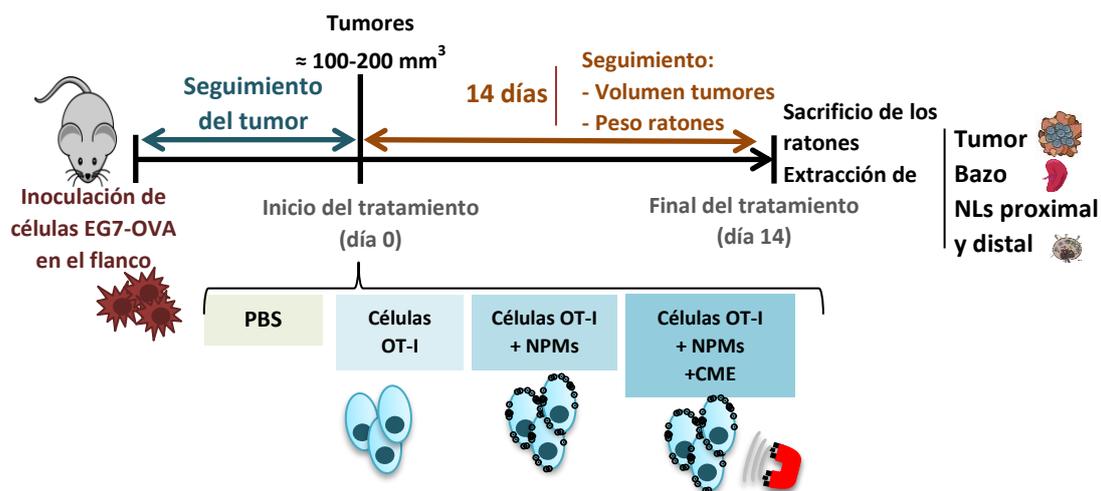


Fig. M16. Diseño del experimento *in vivo* de transferencia celular en un modelo tumoral singénico. Se generó el modelo tumoral singénico, posteriormente se llevaron a cabo los diferentes tratamientos, en presencia o ausencia de NPMs y CMEs, y finalmente se sacrificaron los ratones y se analizaron las diversas muestras biológicas (tumor, bazo y NLS).

21.2. Procesamiento de las muestras biológicas recogidas

Para el procesamiento de los **tumores**, se seccionó un trozo de entre 0.3 y 0.4 g y se cortó en cubos pequeños de alrededor de 1 mm³. Cada trocito de tumor se introdujo en un falcon de 15 ml y se añadieron 2 ml del siguiente medio de digestión: RPMI 1640 suplementado con HEPES (20 mM, Biowest), colagenasa I (2 mg/ml, Worthington Biochemical Corporation), dispasa II (2.5 mg/ml, Roche) y DNasa I (0.1 mg/ml, Roche). Se dejó en agitación a 37°C durante 20 min, tras los cuales se disgregaron en un filtro de 70 μm de poro (Corning) y finalmente se procedió a la lisis eritrocitaria (5 min, TA). Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS suplementado

con 5% FBS, se contaron y se separaron 5×10^6 células por muestra para su tinción y análisis por citometría de flujo.

Para el procesamiento de los **bazos** y **NLs**, se llevó a cabo la disgregación de los mismos en un filtro de 40 μm de poro y se lisaron los eritrocitos (5 min, TA) en las muestras de bazo. Posteriormente se realizaron varios lavados con PBS suplementado con 5% FBS, se contaron y se separaron 2×10^6 células en las muestras de bazo y 1×10^6 células en las muestras de NLs para su tinción y análisis por citometría de flujo.

21.3. Análisis por citometría de flujo

Para el análisis por citometría de flujo, se llevó a cabo según el procedimiento explicado en el Apartado 9 y se utilizaron los siguientes anticuerpos anti-ratón: anti-CD45 (30-F11), -IA/IE (M5/114.15.2), -CD11b (M1/70), -NKp46 (29A.1), -CD44 (IM7) y -CD4 (GK1.5) de Biolegend, anti-CD11c (H13), -Ly6G (148), -V β 5 (MR9-4) y -CD25 (7D4) de Pharmingen y anti-F4/80 (BM8), -CD19 (eBio D3), -CD3 (17A2), -CD8 (53-6.7), -V α 2 (B20.1), -CD69 (H1.2F3), -IFN- γ (XMG1.2) y -CD62L (Mel-14) de eBioscience.

Para el análisis de la producción de IFN- γ , previamente se llevó a cabo una estimulación de las células en presencia del péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 μM) y brefeldina A (1X) durante 5-6 h en condiciones estándar de incubación. En todos los casos las muestras fueron fijadas tras la tinción y guardadas a 4°C hasta su análisis. Se analizaron todas las muestras utilizando el citómetro de flujo Gallios (Beckman Coulter) y el software de análisis Kaluza.

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron con el software Prism 5.0 (GraphPad). Se aplicaron dos tipos de análisis estadísticos según el tipo de experimento, two-tailed unpaired Student t-test o two-way ANOVA. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

VII. RESULTADOS

Los linfocitos T son un tipo celular del sistema inmune muy dinámico y con una migración altamente regulada. Las terapias basadas en la transferencia de células T son consideradas aproximaciones terapéuticas muy prometedoras pero que suelen tener una eficacia limitada debido al bajo porcentaje de células administradas que consigue llegar a la región de interés. Manipular la localización de estas células T con el objetivo de incrementar este porcentaje supondría un aumento en la efectividad de este tipo de terapias. Actualmente, la nanotecnología se ha utilizado con éxito en la liberación específica de fármacos y biomoléculas. En concreto, estudios previos muestran el uso conjunto de NPMs cargadas con biomoléculas y la aplicación de CMEs, como sistema de liberación específica de las mismas. En esta primera parte de la Tesis se muestra una primera evaluación de la interacción entre estas NPMs y un tipo de células linfoides (células T) y sobre el potencial de estas NPMs y los CMEs para la retención o acumulación específica de dichas células en una región de interés, tanto *in vitro* como *in vivo*.

PARTE 1: INTERACCIÓN DE CÉLULAS T CON NPMs Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA

1.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NPMs CON DIFERENTES CARGAS SUPERFICIALES PARA DIRECCIONAMIENTO MAGNÉTICO

En primer lugar, se llevó a cabo la preparación de NPMs con diferentes recubrimientos mediante el método de síntesis por co-precipitación en medio alcalino descrito por Massart [191] para posteriormente analizar su interacción con células linfoides y su posible aplicación en la retención específica de dichas células en una zona de interés. Se obtuvieron NPMs de morfología casi esférica, que fueron posteriormente caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión, revelando un núcleo de óxido de hierro de (12.5 ± 2.6) nm de diámetro (Fig. R1.A; Tabla R1). El índice de polidispersidad se encontró entre 0.1 y 0.25, indicando que se encuentran en un rango de estrecha distribución de tamaños [204]. Estas NPMs se recubrieron posteriormente con DMSA, APS o DEXT para su funcionalización y estabilización, ya que los núcleos de óxido de hierro son inestables y pueden formar agregados [205, 206]. Los diferentes recubrimientos empleados dieron lugar a NPMs con una diversidad de carga superficial y tamaño hidrodinámico. El tamaño medio de los núcleos una vez recubiertos, así como el estado de agregación de las NPMs resultantes, se comprobó de nuevo por microscopía electrónica de transmisión (Fig. R1.B). Posteriormente, para evaluar la naturaleza de cada recubrimiento y su asociación con la superficie de las NPMs, se llevó a cabo un estudio por FTIR (Fig. R1.C). Las NPMs recubiertas mostraron picos entre 1000 y 1400 cm^{-1} asociadas con enlaces C-C y C-O

debido a los correspondientes recubrimientos en la superficie de las NPMs. Además, algunos picos extra característicos de cada recubrimiento fueron identificados [192, 207]:

- DMSA-NPMs: picos de absorción a 1625, 1400 y 1140 cm^{-1} correspondientes con el enlace ácido carboxílico – hierro y los enlaces C=O.
- APS-NPMs: picos de absorción a 1095 y 998 cm^{-1} correspondientes con la formación de los enlaces Si-O-Fe y Si-O-Si.
- DEXT-NPMs: picos de absorción en el rango de 1000 – 1500 cm^{-1} y 1400 cm^{-1} debido a los enlaces C-O-C y C=O y a las deformaciones CH_2 y C-O-H.

La intensa absorción en todos los casos en el rango de frecuencias entre 500 y 600 cm^{-1} se corresponde con la presencia del enlace Fe-O. El pico intenso a 1381 cm^{-1} en el caso del espectro de APS-NPMs se debe a presencia de ácido nítrico utilizado durante la oxidación de las NPMs y el ajuste del pH [208].

Posteriormente, se procedió a la caracterización físico-química del tamaño hidrodinámico y la carga superficial por DLS. Los tamaños hidrodinámicos de las NPMs recubiertas con DMSA, APS o DEXT fueron 83 nm, 82 nm y 120 nm respectivamente (Tabla R1). Como era esperable, la carga superficial (en base al potencial ζ) demostró ser altamente positiva debido a la presencia de APS (+38 mV), negativa en el caso de DMSA (-34 mV) y casi neutra para DEXT (-2 mV). La cuantificación del recubrimiento se realizó mediante un análisis por termogravimetría. El porcentaje en peso varió desde el 10% para las NPMs recubiertas con DMSA o APS hasta el 38% en el caso de aquellas recubiertas con DEXT (Tabla R1). Además, la concentración de hierro en cada muestra se midió por ICP-OES. Los niveles de endotoxina encontrados en estas preparaciones fueron menores de 0.1 EU/ml (Tabla R1). Finalmente, las medidas de magnetización confirmaron las propiedades magnéticas de las NPMs, las cuales presentaban una magnetización de alrededor de 96 emu/g Fe (Fig. R1.D).

De esta manera se han obtenido y caracterizado diversas NPMs de diferente carga superficial y tamaño hidrodinámico, que serán utilizadas durante el desarrollo de este trabajo para el estudio de su interacción principalmente con células linfoides y su potencial para promover la acumulación específica de las mismas mediante la aplicación de un CME.

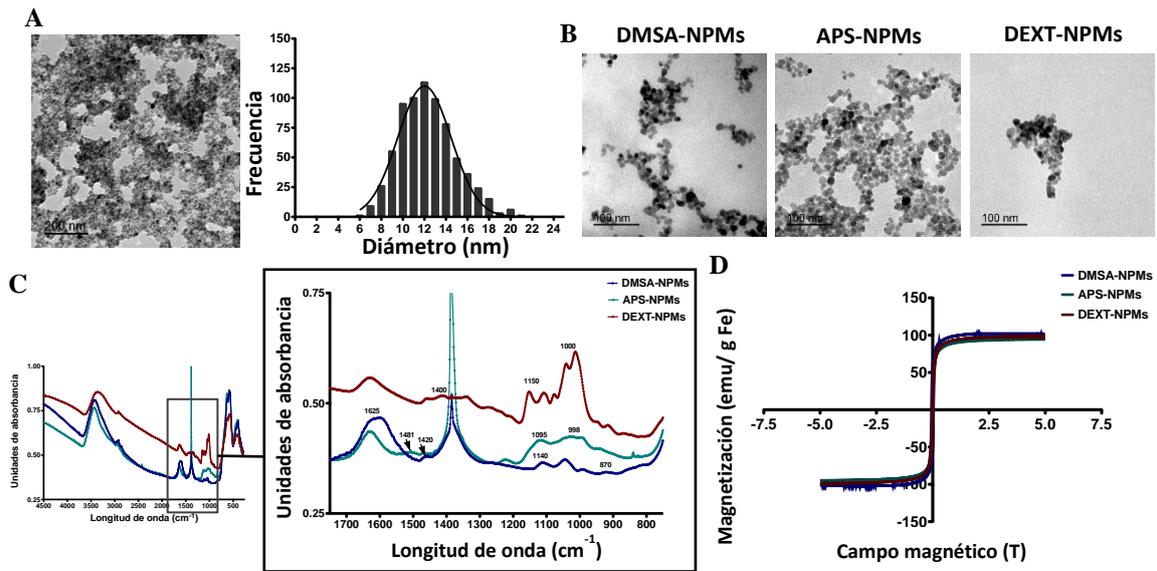


Fig. R1. Caracterización físico-química de las NPMs. A) Imágenes de TEM de los núcleos de óxido de hierro preparados por co-precipitación y la distribución gaussiana del tamaño de diámetro de los mismos. B) Imágenes de TEM de las diferentes NPMs obtenidas tras los recubrimientos (DMSA-NPMs, APS-NPMs y DEXT-NPMs). C) Espectro FT-IR de DMSA-NPMs, APS-NPMs y DEXT-NPMs. D) Curva de magnetización de las diferentes NPMs mostrando el comportamiento superaparamagnético de las mismas.

NPMs	Recubrimiento	Diámetro del núcleo (nm)	Diámetro hidrodinámico (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)	Recubrimiento (%)	Nivel de endotoxina (EU/ml)
DMSA-NPM	Ácido dimercapto-succínico	12.5 ± 2.6	83	0.17	-34.3 ± 1.0	10	<0.1
APS-NPM	3-aminopropil-trietoxisilano	12.5 ± 2.6	82	0.25	+38.0 ± 1.5	10	<0.1
DEXT-NPM	dextrano 6 kDa	12.5 ± 2.6	119	0.12	-1.8 ± 0.3	38	<0.1

Tabla R1. Resumen de las principales características de las diversas NPMs sintetizadas.

1.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE INCUBACIÓN CON LAS NPMs

Para determinar la condición óptima de incubación, se realizó un estudio preliminar utilizando el modelo de células Jurkat y diferentes tipos de incubaciones. Se llevó a cabo, en primer lugar, la **incubación estándar (incubación A)**, sembrando las células en placas de 24 pocillos y añadiendo las diferentes NPMs a una concentración moderada (20-50 $\mu\text{g Fe/ml}$), procediendo a una incubación de 24 h. También se llevó a cabo el mismo experimento añadiendo un **agente transfectante (incubación B)** con el objetivo de favorecer la captación de las NPMs por parte de las células linfoides. Finalmente, se procedió a una incubación en **poco volumen, con altas concentraciones de NPMs (50-150 $\mu\text{g Fe/ml}$) y de células durante un tiempo corto (2 h) (incubación C)**. Los resultados obtenidos mostraron que la mayor asociación de las NPMs con las células linfoides se obtenía durante esta última incubación (7.7 ± 3.2 veces mayor en DMSA-NPMs, 12.3 ± 4.4 veces mayor en APS-NPMs y 4.3 ± 1.4 veces mayor en DEXT-NPMs) (Fig. R2.A).

Además, se observó que la presencia de un agente transfectante no parecía mejorar significativamente la captación de NPMs (**Fig. R2.A**). Asimismo, se probó a colocar un **CME bajo el pocillo** sobre el cual se encontraban sembradas las células (**incubación D**), para intentar favorecer su interacción de esta manera con las NPMs presentes en el medio. Esta condición provocó la formación de grandes acúmulos y agregados de NPMs que se adherían al pocillo y provocaban, además, la agregación celular (**Fig. R2.B**), por lo que también se excluyó esta condición.

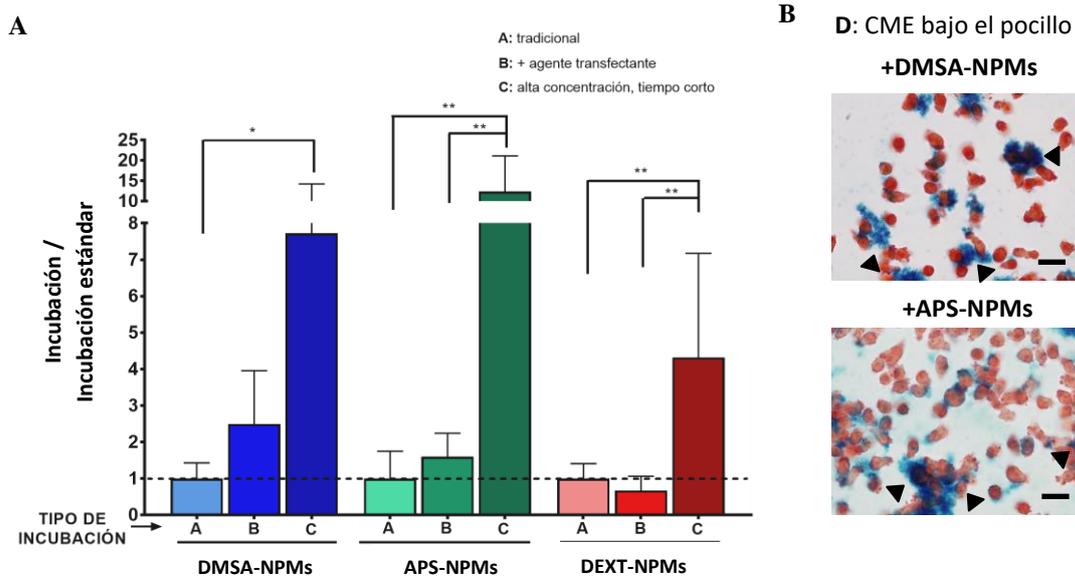


Fig. R2. Optimización del tratamiento de células linfoides con NPMs. A) Gráfica comparativa de las diferentes incubaciones llevadas a cabo durante la optimización de la carga de células linfoides con NPMs. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes utilizando el modelo de células Jurkat, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **B)** Imágenes representativas tras la tinción de Azul de Prusia y contratinción con rojo neutro tras la incubación de células Jurkat con las NPMs en presencia de un CME bajo el pocillo (escala = 10 μ m). Las flechas indican los grandes agregados de NPMs formados debido a la presencia de un CME.

1.3. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON MODELOS DE CÉLULAS T HUMANAS Y MURINAS

Para estudiar la asociación con las diferentes NPMs y evaluar los efectos de las mismas sobre células T en esta primera parte, se utilizaron dos modelos de células T: la línea celular humana Jurkat y células T primarias aisladas de bazo y NLS de ratones C57BL/6. La purificación de células T primarias fue evaluada en todos los casos por citometría de flujo (**Fig. R3**).

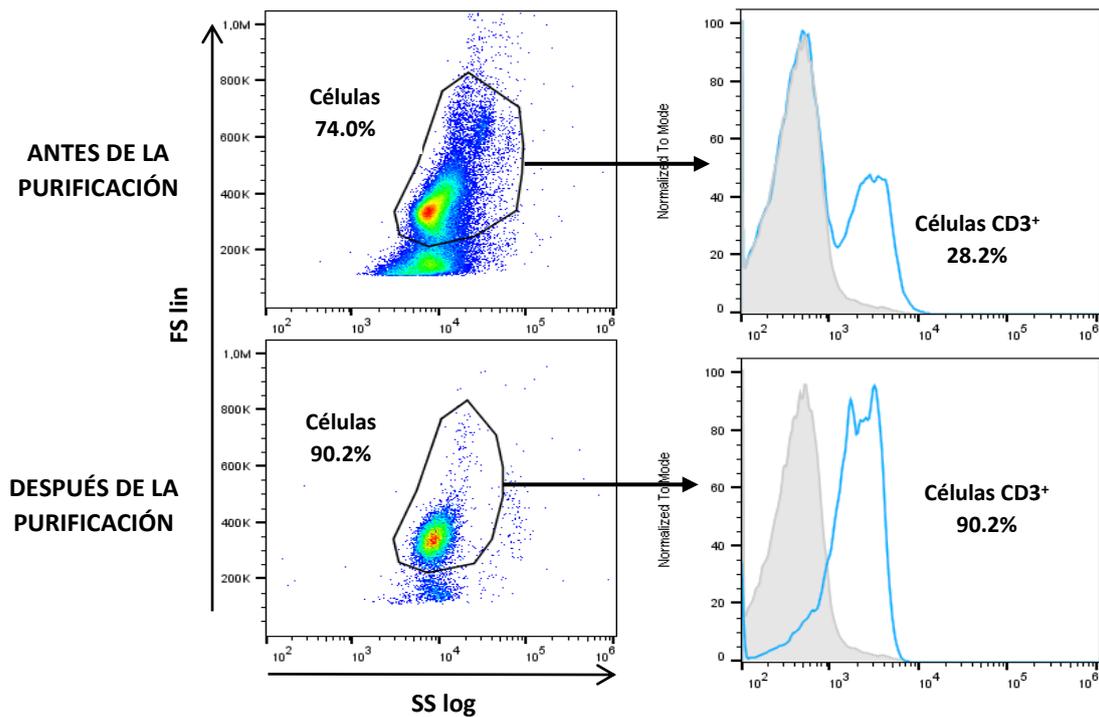


Fig. R3. Purificación y expansión de las células T primarias murinas. Gráficas representativas, obtenidas con el software FlowJo, de las diferentes poblaciones obtenidas antes y después de purificar la población de células T primarias. Histograma gris sombreado: control de isotipo; línea azul: marcaje con el anticuerpo anti-CD3 murino.

1.3.1. Evaluación de la toxicidad en los modelos de células T

En primer lugar, se analizó si la presencia de estas NPMs afectaba a la viabilidad celular de estos dos modelos de células T mediante diferentes ensayos. Para ello, se incubaron con concentraciones crecientes de las diferentes NPMs, entre 0 y 150 $\mu\text{g Fe/ml}$, durante 24h a 37°C y 5% CO_2 . Se midió la viabilidad y proliferación celular tras la incubación con las NPMs empleando el reactivo Alamar blue, que utiliza, como se comentó previamente, una reacción óxido-reducción que sólo tiene lugar en células viables gracias al metabolismo mitocondrial. Este análisis mostró que las diferentes concentraciones de NPMs utilizadas no causaban toxicidad en ambos tipos celulares (**Fig. R4.A,B**). De hecho, la presencia de NPMs dio lugar a valores de fluorescencia mayores durante este ensayo, indicando, por tanto, un ligero incremento en el metabolismo mitocondrial de estas células. Análisis preliminares del fenotipo metabólico de las células T primarias murinas utilizando el analizador de flujo extracelular (XFp) de Seahorse mostraron un aumento principalmente en la respiración mitocondrial cuando estaban asociadas a NPMs (-23.2 ± 7.3 pmol/min vs 34.8 ± 31.3 pmol/min en el estado basal y 9.2 ± 22.6 pmol/min vs 54.29 ± 48.19 pmol/min en el estado estresado), aunque una tendencia parecida se encuentra en la glicólisis (-0.8 ± 1.1 mpH/min vs 2.7 ± 5.0 mpH/min en el estado basal y 4.4 ± 4.5 mpH/min vs 7.4 ± 7.7 mpH/min en el estado estresado) (**Fig. R5**).

De igual manera, se llevó a cabo el ensayo por citometría de flujo de anexina V/PI para determinar si las células eran viables o entraban en apoptosis o necrosis tras su asociación con las distintas NPMs. No se detectó un incremento significativo en el número de células apoptóticas o necróticas en las diferentes concentraciones de NPMs utilizadas (Fig. R4.C,D). Tras estos estudios se concluyó que estas NPMs no producen una toxicidad significativa a las concentraciones utilizadas.

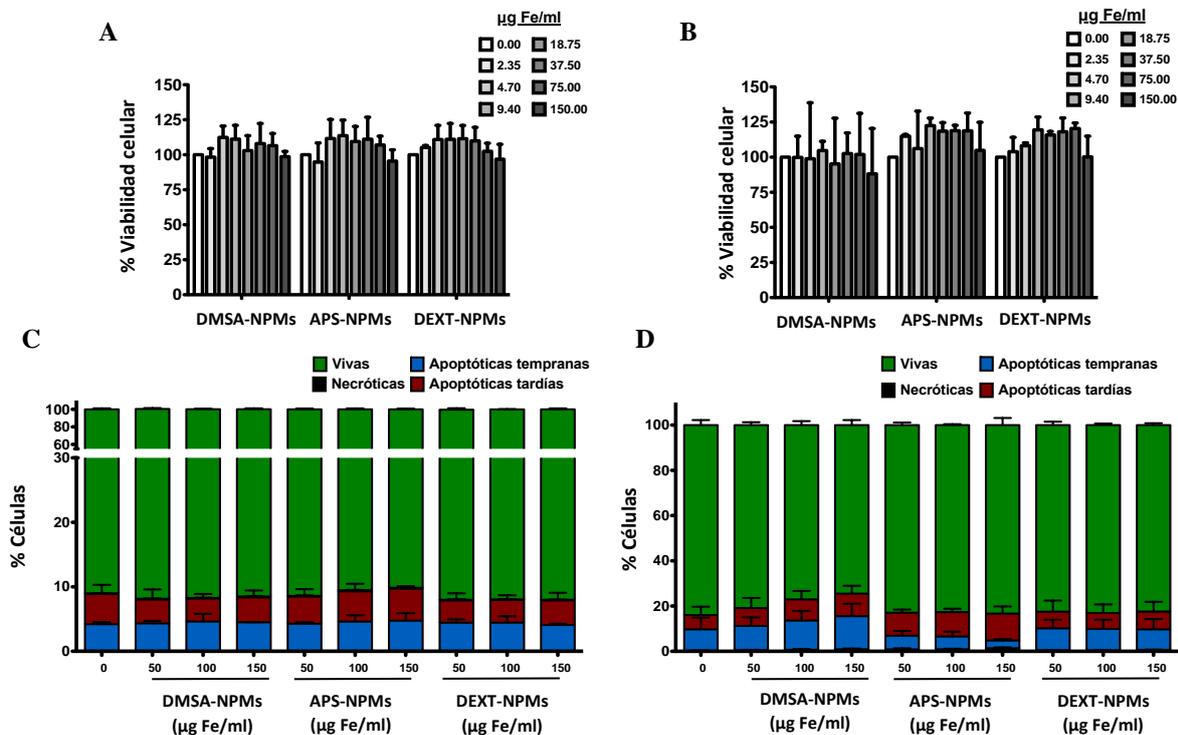


Fig. R4. Evaluación de la toxicidad de las NPMs recubiertas en modelos de células T. Viabilidad celular de las A) células Jurkat o B) células T murinas después del tratamiento con NPMs, medida mediante el ensayo fluorimétrico AlamarBlue. Análisis mediante citometría de flujo de la formación de células apoptóticas o necróticas tras la incubación con NPMs en las C) células Jurkat o D) células T murinas, a través de la tinción de Anexina V/PI. Los resultados mostrados (media ± DE) son representativos de tres experimentos independientes en todos los análisis.

1.3.2. Cuantificación del hierro asociado a los modelos de células T

Posteriormente, se cuantificó la cantidad de hierro asociado a ambos tipos celulares después de su incubación con las NPMs mediante ICP-OES, con el objetivo de determinar qué tipo de NPM se asocia en mayor cantidad. La asociación óptima entre las NPMs y las células se obtuvo tras la incubación durante 2 horas a 37°C y 5% CO₂ en un volumen reducido (Fig. R2). Los resultados obtenidos revelaron que ambos tipos celulares eran capaces de asociarse mejor con APS-NPMs (14.6 ± 1.4 pg Fe/célula en células Jurkat y 8.8 ± 0.5 pg Fe/ml en células T murinas) que con DMSA-NPMs (3.9 ± 0.2 pg Fe/célula en células Jurkat y 3.3 ± 0.2 pg Fe/ml en células T murinas) o DEXT-NPMs (3.0 ± 0.1 pg Fe/célula en células Jurkat y 4.3 ± 0.4 pg Fe/ml en células T murinas) (Fig. R6.A,B). Debido a esta mayor asociación a las células T, probablemente por la presencia de

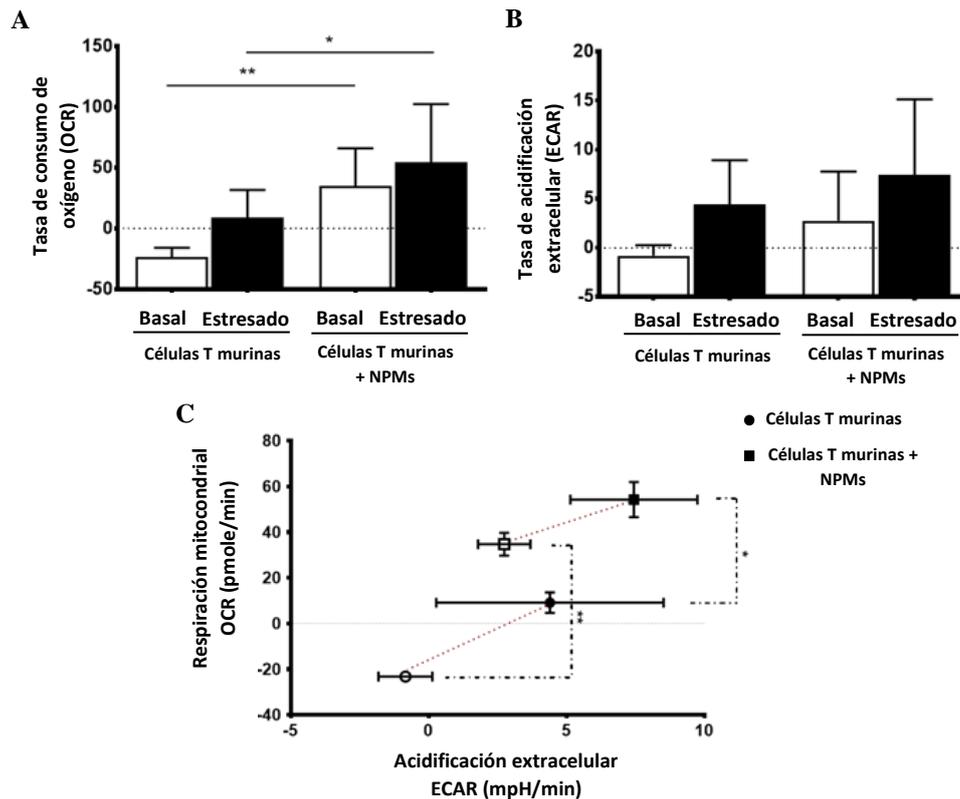


Fig. R5. Análisis del fenotipo metabólico de las células T murinas en presencia de NPMs. A) Tasa de consumo de oxígeno (OCR) y B) Tasa de acidificación extracelular (ECAR) en células T murinas libres o asociadas con NPMs. C) Potencial energético celular (OCR vs ECAR) en células T murinas libres o asociadas con NPMs. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

una carga superficial positiva que favorece su interacción con la carga negativa de la membrana plasmática, estas NPMs (APS-NPMs) se postularon como las mejores candidatas para el posterior estudio en la retención magnética de dichas células. Cabe destacar además que, la línea celular humana Jurkat presenta una mayor asociación con las NPMs que las células T primarias aisladas de ratón, probablemente debido a su mayor tamaño, y, por tanto, mayor superficie de unión.

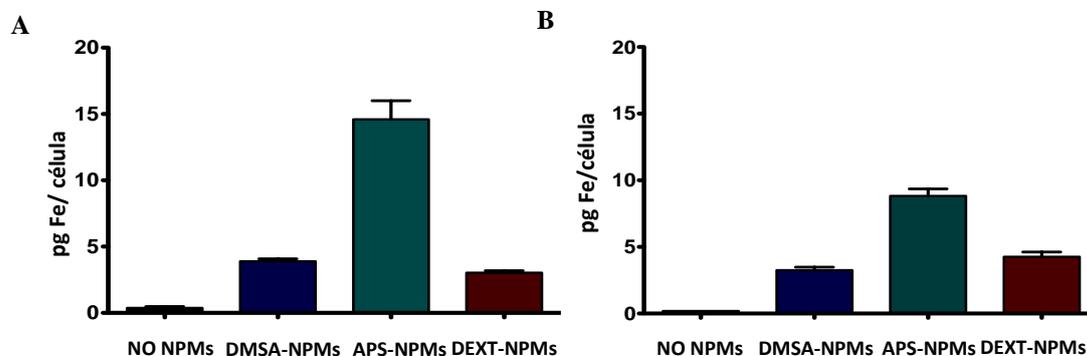


Fig. R6. Evaluación de la asociación de NPMs a los modelos de células T. Cuantificación del hierro asociado a las A) células Jurkat o B) células T murinas tras la incubación con las diferentes NPMs, mediante ICP-OES. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes.

1.3.3. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en los modelos de células T

A continuación, se analizó la localización subcelular de estas NPMs mediante diferentes aproximaciones en microscopía. La tinción de Azul de Prusia y estudios en microscopía confocal revelaron que, independientemente de su recubrimiento polimérico, las NPMs permanecían asociadas con la membrana plasmática (Fig. R7.A,B).

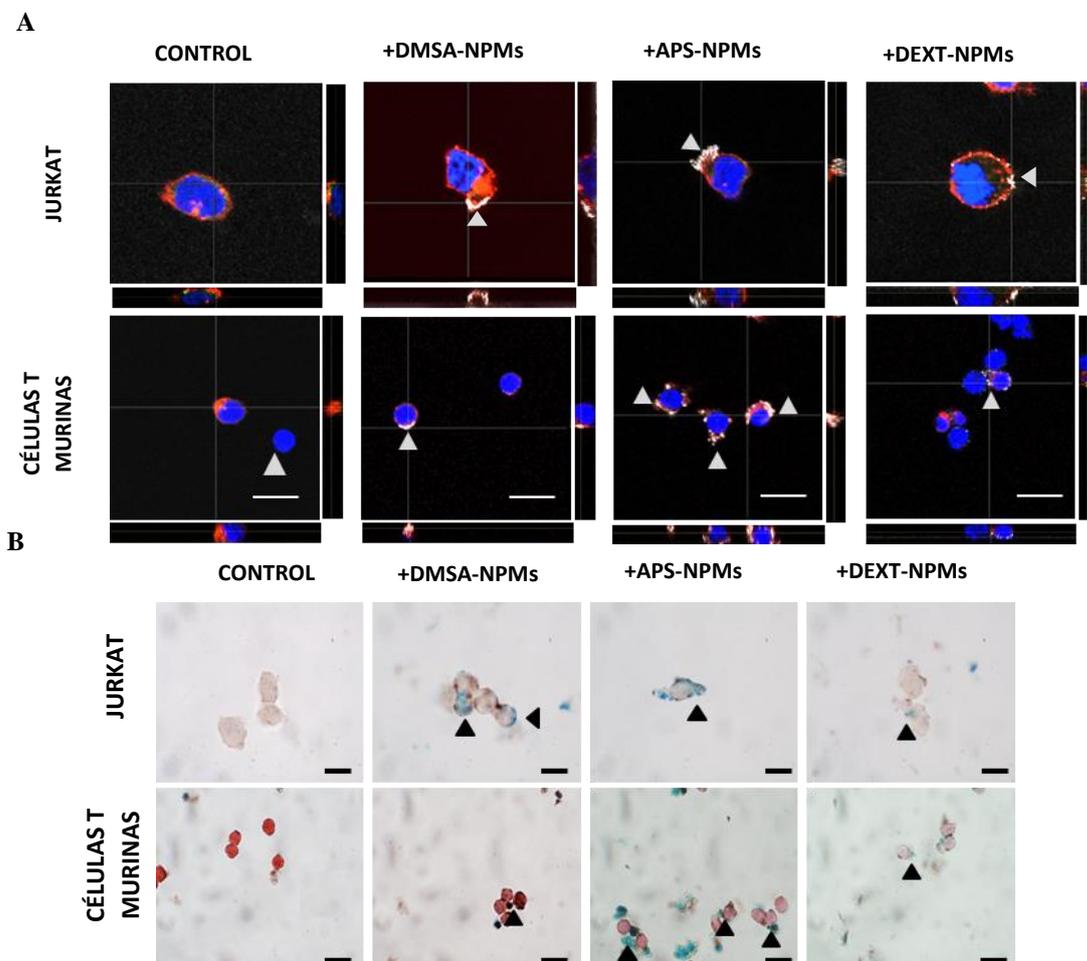


Fig. R7. Localización subcelular de las NPMs en los modelos de células T (I). **A)** Imágenes representativas de las células Jurkat y las células T murinas tras el tratamiento con las diversas NPMs adquiridas por microscopía confocal (membrana celular (rojo), NPMs (gris) y núcleo (azul)) (escala = 10 μ m). Las proyecciones ortogonales se compusieron mediante el software ImageJ. **B)** Tinción de Azul de Prusia y contratinción en rojo neutro de las células Jurkat y las células T murinas tras su asociación con las NPMs. (escala = 10 μ m). Las flechas indican la presencia de NPMs asociadas a las células.

Estos resultados fueron confirmados por microscopía electrónica de transmisión (Fig. R8). La mayor parte de las NPMs permanecen en la periferia de las células, probablemente asociadas a través de interacciones electrostáticas con la membrana. Además, estas imágenes confirmaron que APS-NPMs eran las que se asociaban en mayor medida con ambos tipos celulares, apoyando los resultados obtenidos por ICP-OES (Fig. R6). Las imágenes de células T primarias murinas obtenidas por microscopía electrónica de transmisión, después de su incubación con las NPMs,

revelaron un incremento en el número de mitocondrias, apoyando la idea comentada previamente sobre un aumento en el metabolismo de estas células debido a las NPMs.

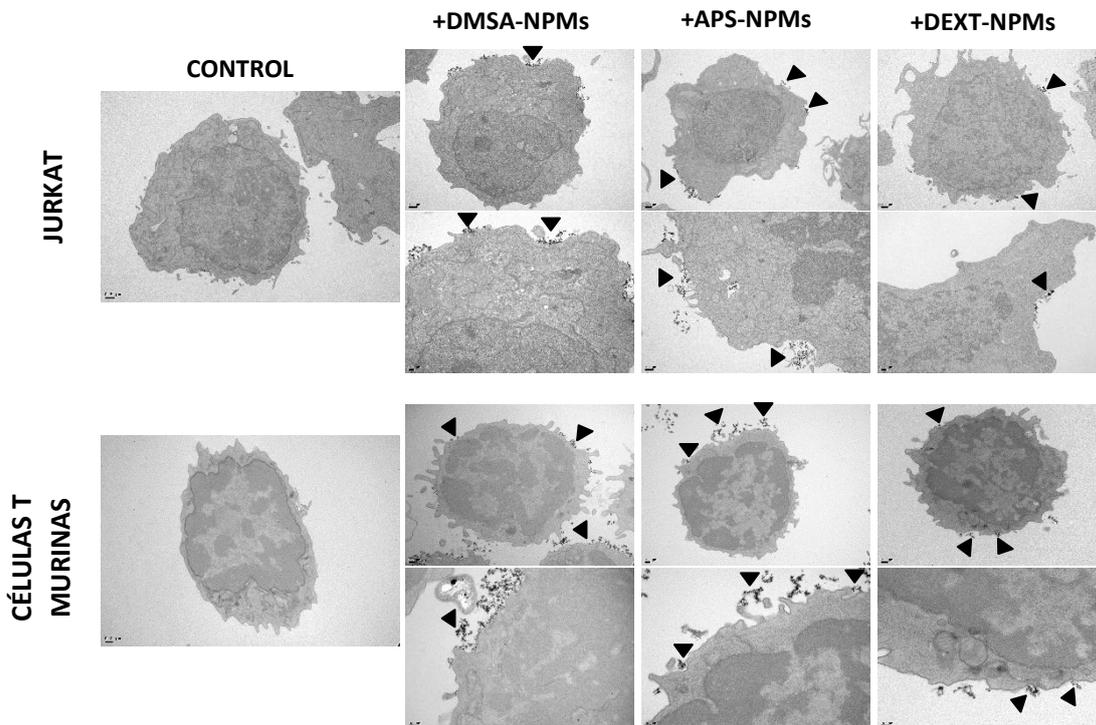


Fig. R8. Localización subcelular de las NPMs en los modelos de células T (II). Imágenes representativas obtenidas por TEM de las células Jurkat y las células T murinas tras el tratamiento con las NPMs. Los paneles superiores en cada caso ofrecen una visión global de la célula, mientras que los paneles inferiores muestran en mayor detalle regiones celulares para ilustrar mejor las interacciones entre las NPMs y la membrana celular. Las flechas indican la presencia de NPMs asociadas a las células.

Finalmente, cabe destacar que, al contrario que los macrófagos, las células mesenquimales o las células tumorales, que son capaces de internalizar diferentes tipos de NPMs [178, 184, 209, 210], incluidas las utilizadas en este trabajo en estudios previos [211] o actuales (Fig. R9 (Tesis Doctoral: Y. Portilla)), las células linfoides tienen una capacidad limitada de hacerlo (Figs. R7-8).

1.3.4. Análisis fenotípico de los modelos de células T tras su asociación con NPMs

Para evaluar si la presencia de NPMs en las células T pudiera afectar a su funcionalidad, se realizó un análisis por citometría de flujo para determinar si los niveles de expresión de marcadores de superficie relevantes en estas células se veían afectados tras la incubación con NPMs. En el caso de la línea celular Jurkat, se evaluó la expresión de los marcadores de adhesión CD62L y activación CD44, la integrina CD11a (cadena α de LFA-1) y el marcador general leucocitario CD45 (Fig. R10.A). Para las células T primarias murinas, también se analizaron los niveles del receptor de quimioquinas CCR7 (Fig. R10.B). En ningún caso se observaron diferencias significativas en la expresión de estos marcadores de superficie tras la incubación con concentraciones crecientes de las NPMs seleccionadas previamente en este trabajo: APS-NPMs.

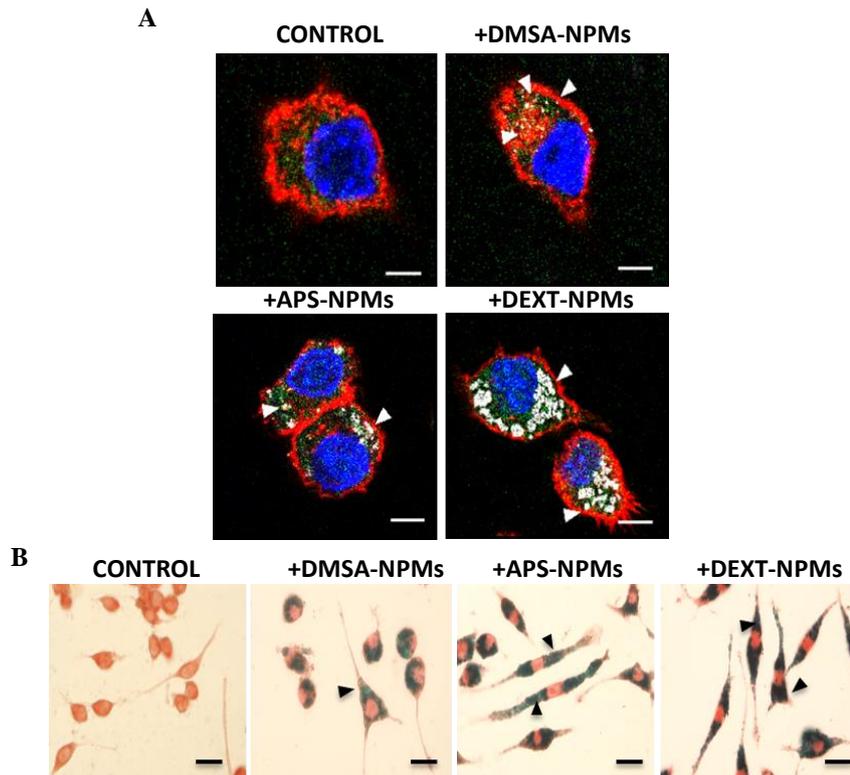


Fig. R9. Localización subcelular de las NPMs en la línea celular macrofágica murina RAW264.7. Imágenes representativas de las células RAW264.7 tras el tratamiento con las diferentes NPMs mediante **A)** microscopía confocal (membrana celular (rojo), NPMs (gris), lisosomas (verde) y núcleo (azul) (escala = 25 μ m) y **B)** tinción de Azul de Prusia y contratinción con rojo neutro (escala = 20 μ m). Las flechas indican las NPMs en el interior celular y asociadas principalmente a los lisosomas. (Fotos: Yadileiny Portilla)

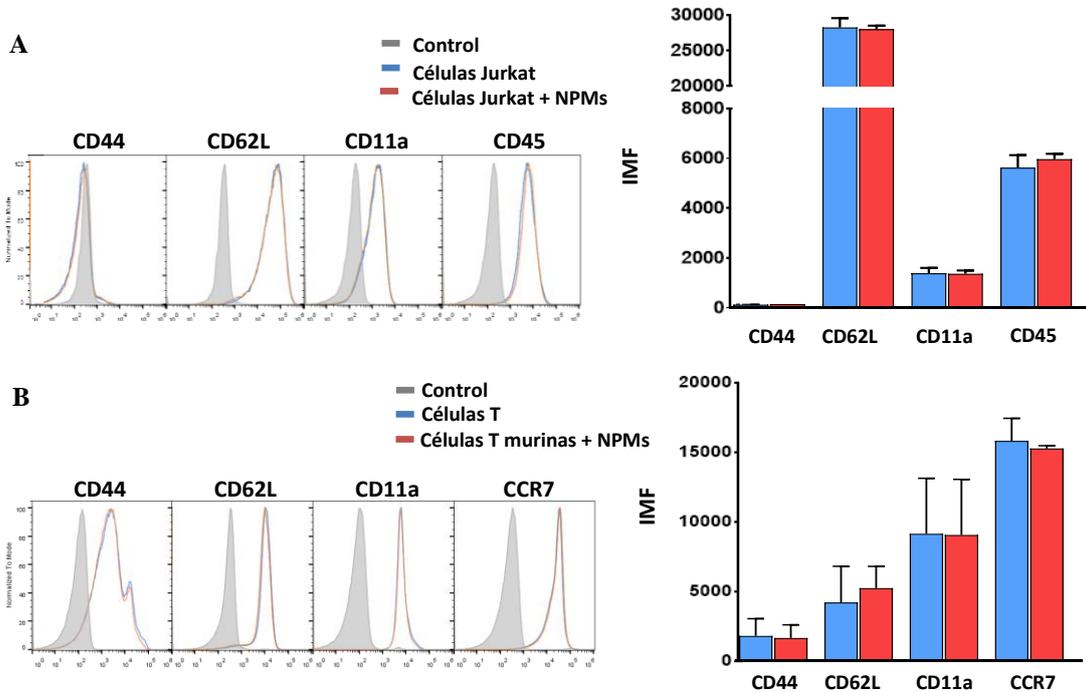


Fig. R10. Análisis fenotípico de los modelos de células T tras su asociación con las NPMs. Histogramas representativos e IMF (intensidad media de fluorescencia) de la expresión de marcadores de superficie relevante en **A)** células Jurkat y **B)** células T murinas, tras la incubación con NPMs. Células sin tratar, línea azul; células tratadas con NPMs, línea naranja; control de tinción, histograma gris. Estos histogramas son representativos de tres experimentos independientes.

1.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN *IN VITRO*

1.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo)

Como se comentó anteriormente, la migración de las células T entre tejidos periféricos y órganos linfoides secundarios es esencial para el correcto funcionamiento de la inmunidad adaptativa. El desplazamiento en el interior de órganos o tejidos es relativamente lento, mientras que la circulación sanguínea y linfática permiten a las células T, entre otras, recorrer rápidamente largas distancias [212]. Por este motivo, se evaluó la capacidad de un CME de promover la retención de células T asociadas con NPMs en condiciones hemodinámicas. Para ello, se analizó en experimentos en cámaras de flujo si las células T, tras su incubación con NPMs, podían ser retenidas *in vitro* mediante el uso de imanes, en un sistema de flujo dinámico. Para poder llevar a cabo este tipo de análisis, fueron necesarias ciertas modificaciones en cámaras de flujo comerciales, de tal manera que un CME pudiera ser aplicado al mismo nivel que las células, como se comentó anteriormente en la sección de “Materiales y Métodos”. Además, se diseñó un sistema de dos imanes, ya que de esta manera se puede obtener y aplicar un gradiente magnético mayor y más homogéneo [213, 214] (Fig. M6). Se realizó un primer análisis utilizando células Jurkat y concentraciones crecientes de NPMs, para determinar cuál sería la mínima cantidad de NPMs necesaria para promover la retención magnética de estas células. Se observó que las células se movían únicamente en la dirección del flujo cuando no estaban asociadas con NPMs, o la cantidad de éstas era muy pequeña (vídeo 1). A medida que se incrementó la dosis de NPMs, las células comenzaron a moverse en la dirección del gradiente magnético (Fig. R11; vídeo 2). De hecho, estas células necesitaron una mínima cantidad de NPMs (> 5 pg Fe/célula en nuestro sistema) para comenzar a ser retenidas por el gradiente magnético creado al usar, en esta primera aproximación, el imán A (Tabla M1; Fig. R11).

Una vez establecidas ciertas condiciones de retención mínimas, se llevó a cabo un análisis más focalizado utilizando diferentes concentraciones de NPMs y diversos gradientes magnéticos (Tabla M1) para ambos tipos celulares.

Al igual que en el análisis anterior, la retención de células debido al gradiente magnético aumentó con el incremento de NPMs asociadas, así como con la aplicación de un gradiente magnético mayor con el imán B (Tabla M1; Fig. R12.A,B). Como puede observarse, el desplazamiento de las células Jurkat hacia el imán fue superior al incrementar la concentración de NPMs al utilizar el imán A ($96 \pm 187 \mu\text{m}$ vs $134 \pm 203 \mu\text{m}$ al preincubar con $100 \mu\text{g Fe/ml}$ y $150 \mu\text{g Fe/ml}$ de APS-NPMs respectivamente) así como al incrementar la fuerza magnética utilizando el imán B y manteniendo la dosis ($96 \pm 187 \mu\text{m}$ vs $133 \pm 252 \mu\text{m}$ en el caso de preincubar con $100 \mu\text{g Fe/ml}$ de APS-NPMs) (Fig. R12.A). El desplazamiento observado en las

células T murinas no dependió tanto de la dosis, aunque sí fue superior al aumentar la fuerza magnética con el imán B ($82 \pm 105 \mu\text{m}$ vs $103 \pm 132 \mu\text{m}$ en el caso de preincubar con $150 \mu\text{g}$ Fe/ml de APS-NPMs) (Fig. R12.B). Asimismo, en la mayoría de los casos, un mayor número de células se desplazó al aumentar la dosis y la fuerza del campo, como se puede ver reflejado en el incremento de la desviación estándar.

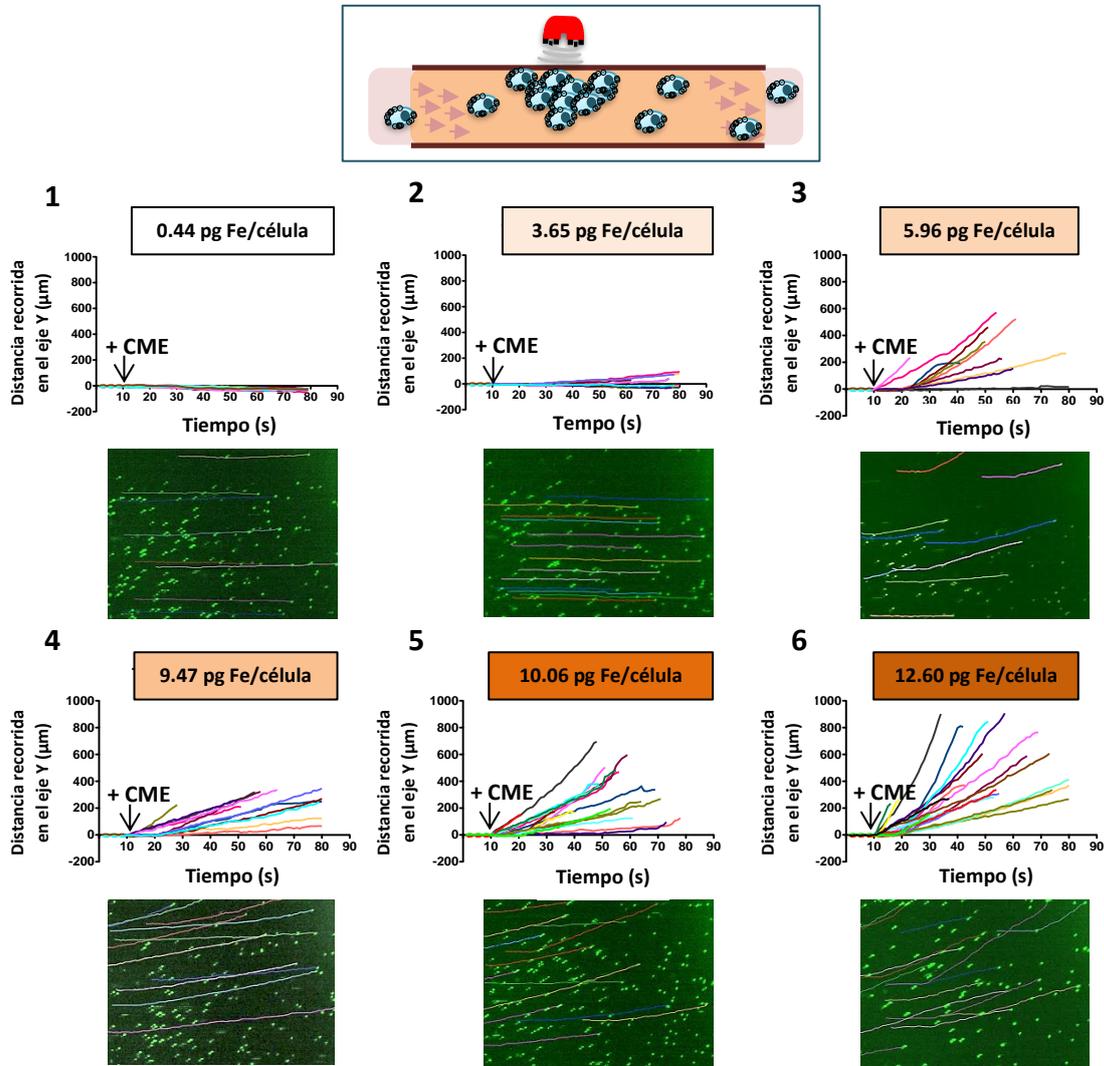


Fig. R11. Retención *in vitro* de células Jurkat asociadas con diferentes cantidades de NPMs en ensayos en cámaras de flujo. La cuantificación del desplazamiento de las células en la dirección del gradiente magnético (eje Y) tras la aplicación del mismo, se llevó a cabo mediante el software de análisis de imagen ImageJ. Una captura con las trayectorias seguidas por las células durante cada experimento se expone bajo la cuantificación del vídeo correspondiente (1-6).

Además, como puede observarse en la Fig. R12.C, las células permanecen cerca de la pared de la cámara de flujo (donde se encuentra el imán) durante la aplicación del CME, pero continúan siguiendo la dirección del flujo una vez que se ha retirado el mismo. Los resultados fueron similares en ambos tipos celulares, aunque cabe destacar que la retención magnética en el caso de la línea celular Jurkat fue mayor que para las células T primarias murinas ($143 \pm 218 \mu\text{m}$ en

células Jurkat vs $103 \pm 132 \mu\text{m}$ en células T murinas utilizando $150 \mu\text{g Fe/ml}$ de APS-NPMs y el imán B) (Fig. R12.A,B), probablemente debido al mayor número de NPMs por célula en el caso de la línea celular Jurkat (Figs. R6-R8).

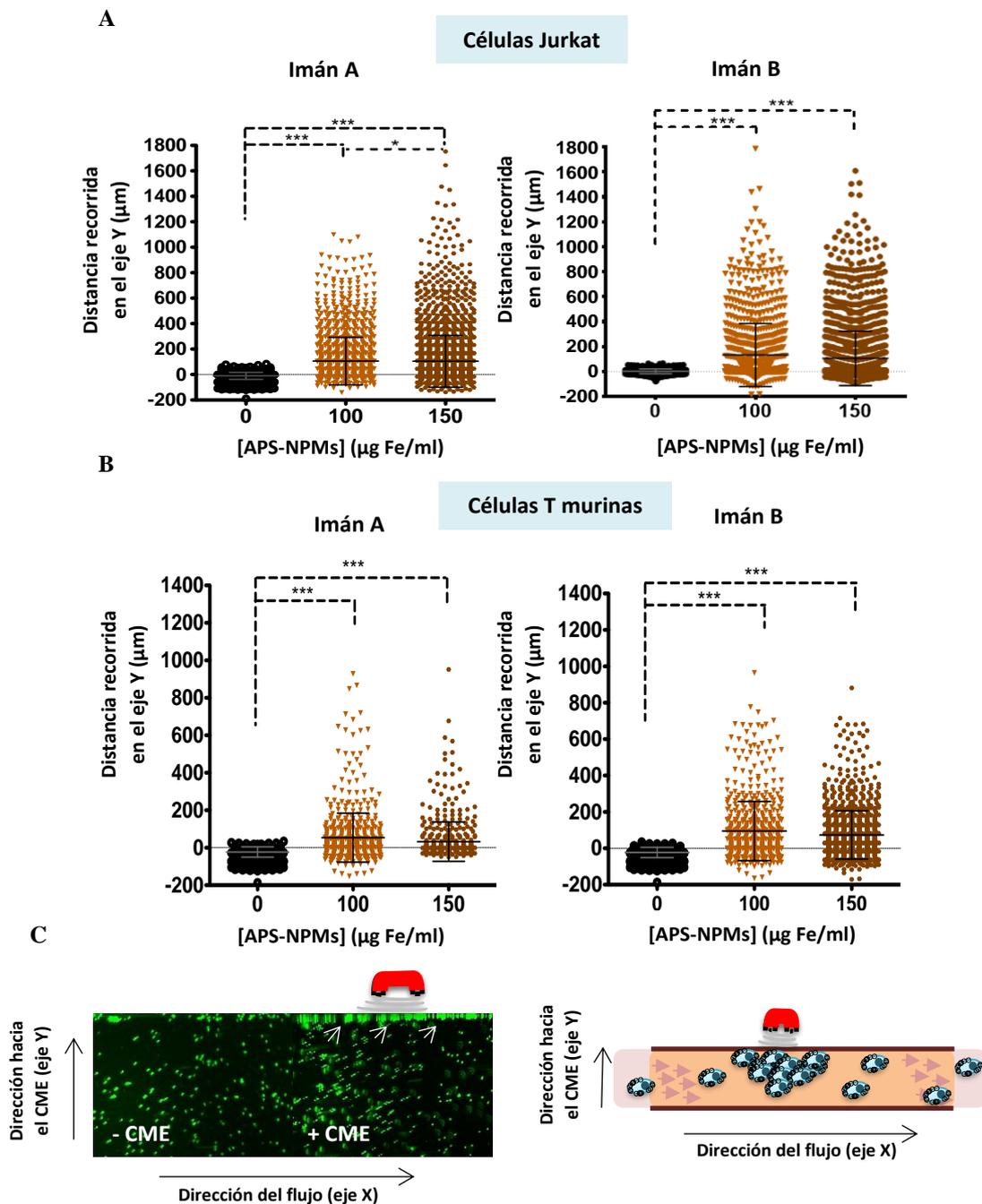


Fig. R12. Retención *in vitro* de los modelos de células T tras su asociación con NPMs mediante la aplicación de un CME en cámaras de flujo. Desplazamiento en la dirección del gradiente magnético (eje Y) de las **A)** células Jurkat y de las **B)** células T murinas tras ser tratadas o no con NPMs y expuestas a diversos CMEs. El desplazamiento celular fue cuantificado mediante el análisis de al menos 100 células por vídeo mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **C)** Capturas de un vídeo representativo obtenido durante estos ensayos, antes y durante la aplicación de un CME y esquema modelo del mismo. Las flechas señalan aquellas células retenidas en la pared de la cámara de flujo debido a la presencia de un gradiente magnético.

1.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico)

Por otro lado, para desarrollar correctamente su papel en la vigilancia inmune y en la respuesta inmunológica, los linfocitos deben responder a una gran diversidad de factores quimiotácticos que les permiten entrar y salir de órganos linfoides y tejidos específicos [215, 216]. Por ello, medimos la respuesta a un gradiente concreto de quimioquina (CXCL12 en el caso de las células Jurkat y CCL21 en el caso de células T primarias murinas) en presencia o ausencia de APS-NPMs, a través de diversos ensayos *in vitro* de migración en transwell, aplicando o no un CME (Fig. R13.A). Se observó que un menor número de células Jurkat asociadas con NPMs era capaz de migrar hacia la cámara inferior debido al gradiente de quimioquina (27 ± 4 % de migración), en comparación con aquellas libres de NPMs (33 ± 4 % de migración) (Fig. R13.B). Una tendencia similar se encontró en el caso de las células T primarias murinas, sobre todo en las células T CD4⁺ (43 ± 10 % en las células libres de NPMs vs 37 ± 4 % en las células asociadas a NPMs) (Fig. R13.C). Esta disminución en la respuesta migratoria pudo ser corregida, sin embargo, mediante la aplicación de un CME en la misma dirección que el gradiente quimiotáctico (37 ± 7 % vs 33 ± 9 % en las células Jurkat y 44 ± 5 % vs 48 ± 6 % en las células T CD4⁺ murinas) (Fig. R13.B,C). La aplicación de un CME probablemente facilitaría la migración de aquellas células asociadas con NPMs que no lograban responder al gradiente quimiotáctico por sí solo.

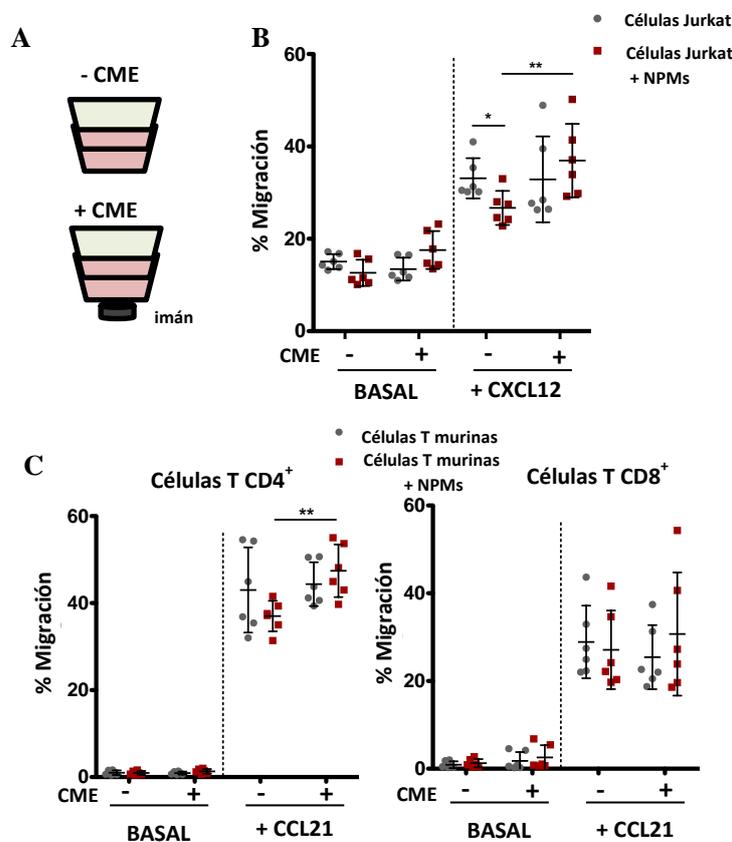


Fig. R13. Análisis de la respuesta quimiotáctica de los modelos de células T tras la asociación con NPMs. A) Aplicación de un CME en el ensayo transwell. Capacidad migratoria de las B) células Jurkat o C) células T murinas tras el tratamiento con NPMs en respuesta a un gradiente quimiotáctico específico y en presencia o ausencia de un CME en la misma dirección. Los resultados se normalizaron frente a un pocillo control (en ausencia de transwell). Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres o cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Aparte de su respuesta a un gradiente quimiotáctico en un ensayo de migración transwell, se llevó a cabo otro estudio, de manera preliminar, para evaluar el comportamiento *in vitro* de las células T en presencia de un factor quimiotáctico y un CME, pero en este caso, en un sistema de confinamiento *in vitro*. Para ello, se evaluó la migración de las células T bajo una capa de agarosa, la cual ejerce cierta presión sobre las células T, que se polarizan y migran debido a la presencia de CCL21 sobre la superficie en la que se encuentran. Las células T, tanto libres como asociadas con NPMs, mostraron un desplazamiento medio menor en el tiempo a distancias pequeñas con respecto al CME (Fig. R14.A). El comportamiento de las células en el punto más alejado del CME (Fig. R14.A) era muy similar al encontrado en el ensayo realizado en ausencia de CME (Fig. R14.B). En ambos casos, las células T asociadas a NPMs presentaban un desplazamiento menor con respecto al obtenido en las células T libres de NPMs (Fig. R14.A,B). Así mismo, la velocidad de las células T, tanto libres como asociadas a NPMs ($10.7 \pm 3.2 \mu\text{m}/\text{min}$ y $9.9 \pm 2.1 \mu\text{m}/\text{min}$ respectivamente), se veía reducida de manera significativa en presencia de un CME ($6.7 \pm 0.8 \mu\text{m}/\text{min}$ en las células T y $6.6 \pm 0.9 \mu\text{m}/\text{min}$ en las células T con NPMs) (Fig. R14.C). El porcentaje de células T que migraban no se vio alterado significativamente (Fig. R14.D).

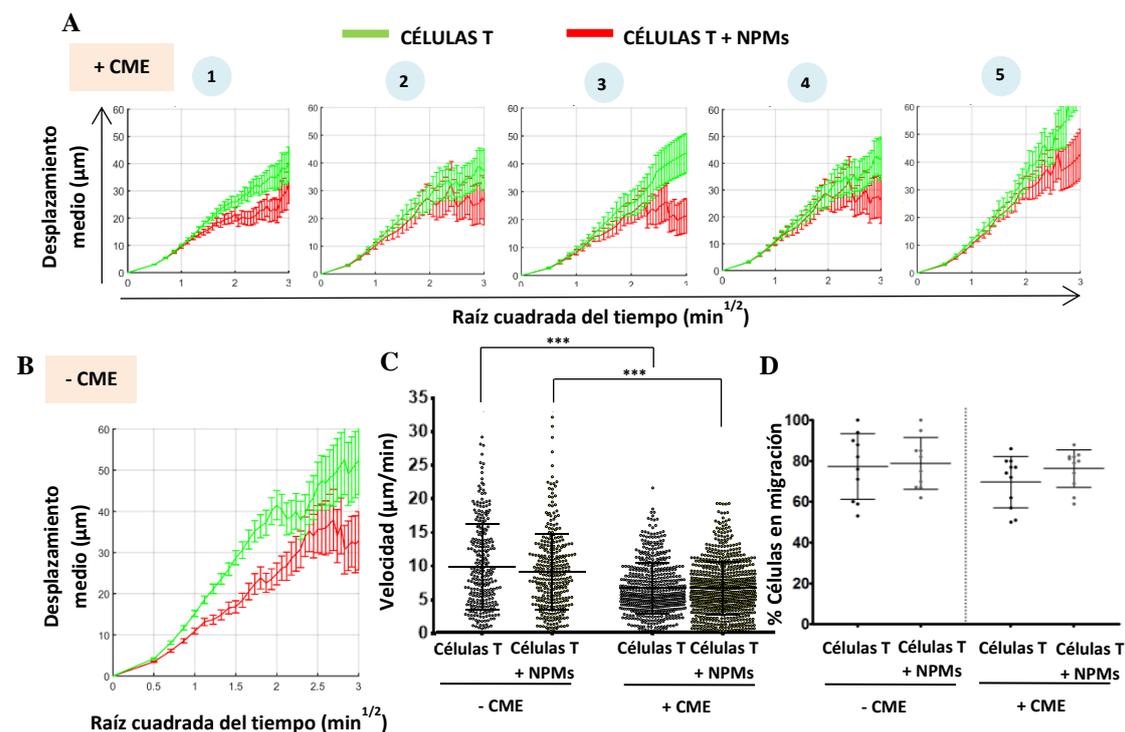


Fig. R14. Análisis de la capacidad migratoria de las células T murinas tras la asociación con NPMs y en presencia de un CME, bajo un confinamiento *in vitro*. Gráficas del desplazamiento medio vs tiempo de las células T en el ensayo “under agarose” **A**) a distancias crecientes del CME y **B**) en ausencia de CME. Cuantificación de la **C**) velocidad celular y del **D**) porcentaje de células que migra, en todas las condiciones, tras el análisis de los vídeos mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de dos experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.5. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN *IN VIVO*

1.5.1. Evaluación de la capacidad de homing en ausencia o presencia de CMEs

Por otra parte, las células T están continuamente migrando y desplazándose entre los diferentes órganos linfoides secundarios, tales como los NLs, para mantener la homeostasis inmunológica [217]. Por este motivo, se decidió realizar el siguiente estudio como prueba de concepto de retención magnética *in vivo*, y así determinar si la aplicación de un CME podría afectar a la capacidad de realizar homing de estas células y a la retención de dichas células asociadas a NPMs en un determinado NL. La concentración de NPMs (150 µg Fe/ml) así como la fuerza magnética (imán permanente de neodimio B, **Tabla M1**) fueron seleccionadas teniendo en cuenta los resultados óptimos obtenidos durante los ensayos en cámaras de flujo previos (**Fig. R12.A,B**).

En primer lugar, se analizó si la capacidad de homing, en ausencia de un CME, de las células asociadas con NPMs se veía afectada y si éramos capaces de detectar este tipo de células en diversos órganos tras su inoculación en ratones. Para llevar a cabo este estudio, primero se preparó una combinación de células libres de NPMs y asociadas con NPMs en proporción 1:1 y marcadas fluorescentemente de manera diferente para poder discriminar unas de otras en posteriores análisis (**Fig. R15.A**). Además, con el fin de evitar posibles efectos de retención inespecífica debido al marcaje fluorescente, se alternaron los marcajes en los diferentes experimentos. Una vez preparada esta combinación de células, se inyectaron de manera intravenosa 10^7 células de la misma en ratones de 5-6 semanas de edad y se permitió su distribución en el organismo durante ciertos períodos de tiempo, tras lo cual se procedió al sacrificio del animal y a la recogida de diversos NLs (periféricos (NL_{per}) y mesentéricos (NL_{mes})) y del bazo (**Fig. R15.A**), para su análisis por citometría de flujo. Los ratones utilizados fueron ratones inmunocomprometidos en el caso del estudio con células Jurkat, para así evitar el rechazo interespecie, y ratones C57BL/6 para el caso de las células T primarias murinas. Independientemente de su origen, tanto en el caso de células Jurkat como de células T primarias murinas, aquellas que estaban asociadas con NPMs se encontraron en mayor número en los NLs y bazos recogidos (**Fig. R15.B,C**). Esto podría indicar que la presencia de NPMs en la superficie celular podría aumentar su retención en los órganos linfoides secundarios. Esta diferencia fue más notable y significativa en el caso de las células Jurkat y a tiempos más largos (**Fig. R15.B**). Además, las células asociadas a NPMs no mostraron una distribución o localización preferente.

Una vez comprobado que la capacidad de homing de estas células en presencia de NPMs no se ve afectada negativamente, se procedió a repetir el análisis, esta vez en presencia de un CME sobre uno de los NLs para determinar si es posible promover la acumulación específica de estas células asociadas a NPMs en esa localización específica (**Fig. R16.A**). Los análisis por citometría

de flujo después de la recogida y disgregación de los NLs revelaron que en ausencia de un CME habían llegado cantidades similares de células (libres y asociadas a NPMs) tanto al NL del flanco izquierdo como al NL del flanco derecho (ratio de células entre ambos NLs de 0.8 ± 0.3 para células libres de NPMs vs 0.8 ± 0.4 en células asociadas a NPMs y 1.0 ± 0.3 vs 0.9 ± 0.2 en el caso de las células Jurkat a 30 y 90 min respectivamente y 0.9 ± 0.3 vs 0.8 ± 0.4 y 0.7 ± 0.4 vs 0.7 ± 0.2 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ murinas respectivamente).

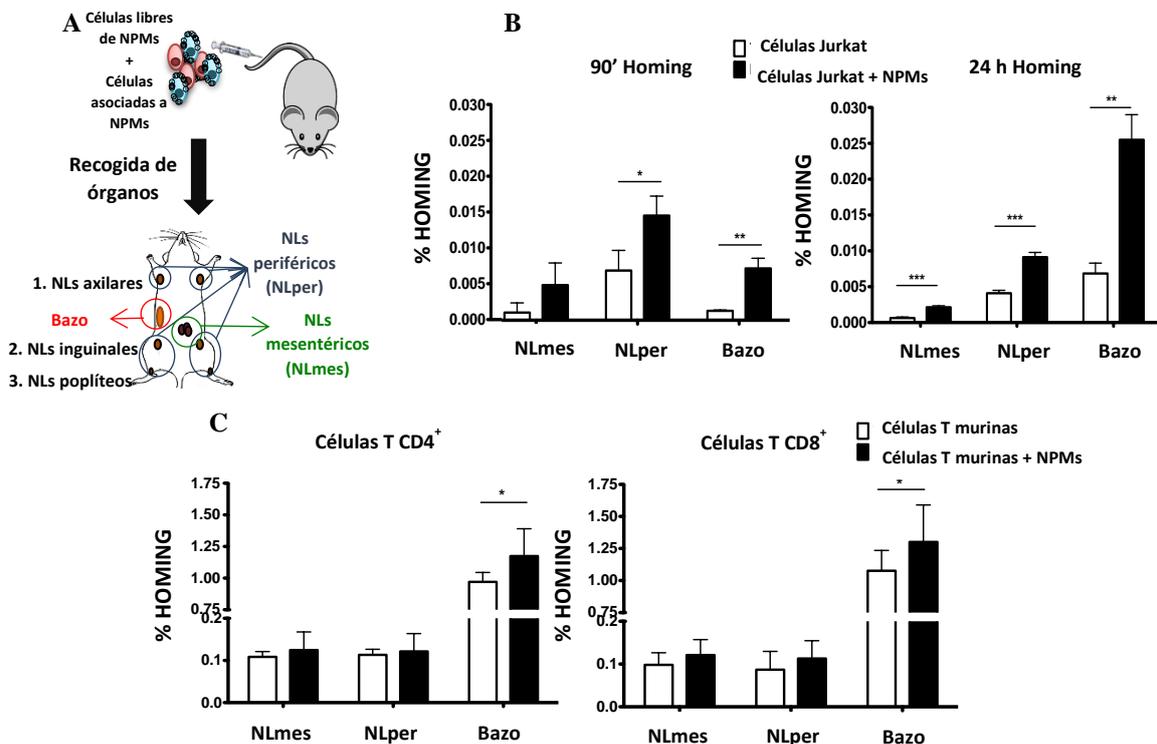


Fig. R15. Análisis *in vivo* de la capacidad de homing de los dos modelos de células T tras el tratamiento con NPMs en ausencia de un CME. A) Diseño experimental para determinar si el homing de las células T se ve afectado únicamente por la presencia de NPMs. Capacidad de homing de las B) células Jurkat y de las C) células T murinas en ausencia de gradientes magnéticos. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes (n = 6), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Sin embargo, la aplicación de un CME, mediante la disposición de un imán sobre un NL situado en uno de los flancos, aumentó la cantidad de células, principalmente asociadas a NPMs, detectadas en dicho NL (ratio de células asociadas a NPMs entre ambos NLs de 2.4 ± 1.5 y 2.3 ± 0.8 en las células Jurkat a 30 y 90 min respectivamente y 2.1 ± 1.3 y 1.7 ± 1.2 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ murinas respectivamente) (Fig. R16.B,C). El ligero incremento observado también en el caso de células libres de NPMs (ratio de células libres de NPMs entre ambos NLs de 1.9 ± 1.0 en las células Jurkat y 1.4 ± 0.7 y 1.1 ± 0.5 en las células T CD4⁺ y CD8⁺ murinas respectivamente) podría deberse a la interacción previa con las células asociadas a NPMs durante su preparación y mezcla, resultando en cierta transferencia de NPMs o asociación entre las células no tratadas y tratadas con NPMs. De hecho, los resultados tras la inoculación

únicamente de células libres de NPMs y tras la aplicación de un CME sobre un NL específico no mostraron ningún tipo de incremento en el número de células debido a la aplicación magnética (ratio de células en los NLs de 1.0 ± 0.2 en ausencia de CME y 1.1 ± 0.3 en presencia de un CME sobre uno de los NLs) (Fig. R16.D).

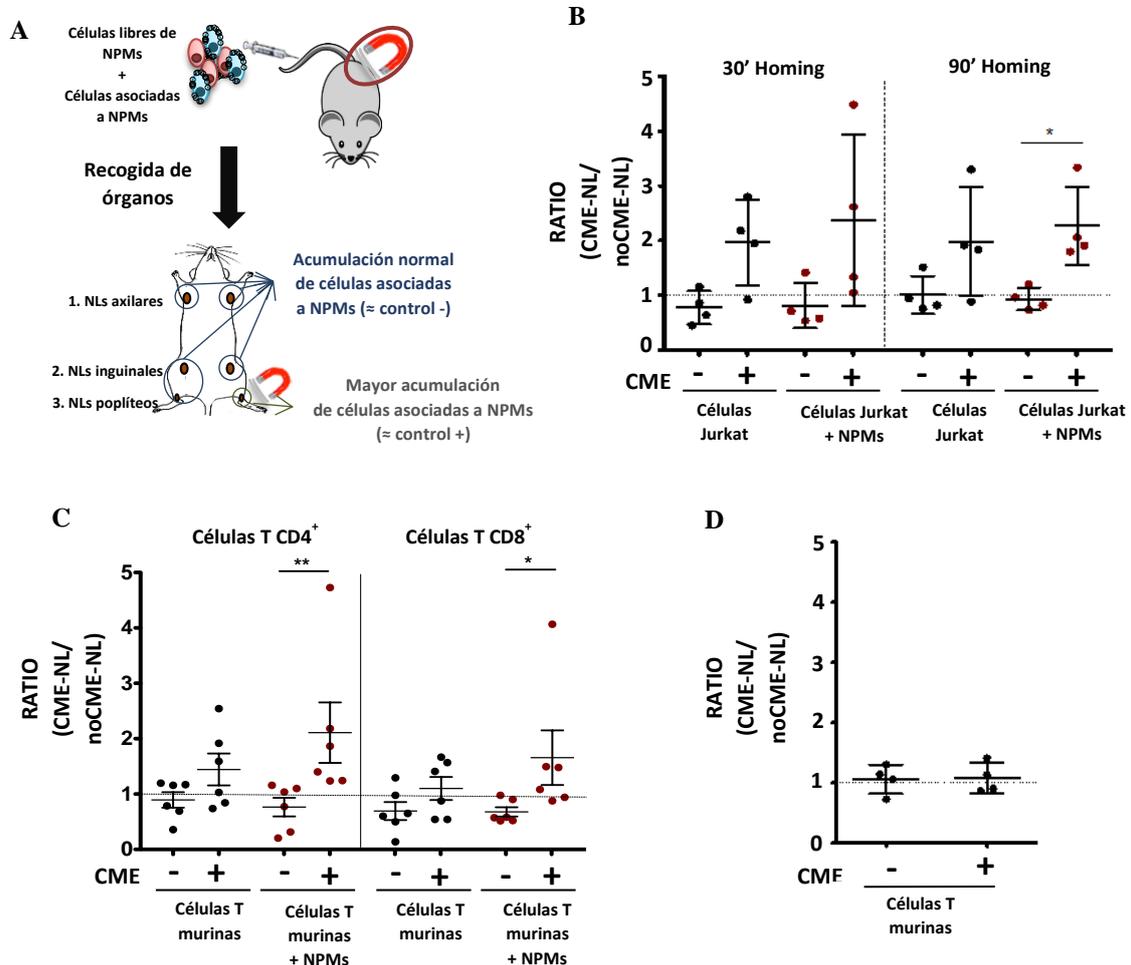


Fig. R16. Análisis *in vivo* de la capacidad de homing de los dos modelos de células T tras el tratamiento con NPMs en presencia de un CME. A) Diseño experimental para determinar si el homing de las células T se puede favorecer hacia un NL específico mediante la aplicación de un CME. Cociente entre **B)** células Jurkat o **C)** células T murinas, libres y asociadas con NPMs en el NL expuesto al CME frente al no expuesto, normalizando siempre frente al cociente en la inoculación. **D)** Cociente entre las células T murinas, libres de NPMs y administradas solas como control, en el NL expuesto al CME frente al no expuesto. Los cocientes mostrados (media \pm DE) son representativos de dos-tres experimentos independientes (n = 4 (células Jurkat), n = 6 (células T murinas)), *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Finalmente se recogieron los NLs poplíteos expuestos o no a un CME en ensayos similares al que acabamos de comentar, y se prepararon para su observación por SPIM. Los resultados tras el análisis de imagen mostraron que una mayor cantidad de células transferidas asociadas con NPMs eran retenidas en aquel NL expuesto al CME, en comparación con el no expuesto (Fig. R17.A,B). Estos datos apoyan los resultados previos obtenidos durante la evaluación *in vivo* de la capacidad de homing.

respectivamente) en comparación con aquellas libres de NPMs (11.1 ± 3.9 , 10.7 ± 5.1 y 7.8 ± 3.6 $\mu\text{m}/\text{min}$ en ausencia de CME, o en presencia de 1 o 2 CMEs respectivamente), incluso en ausencia de un CME (Fig. R18.A,B; Tabla R2).

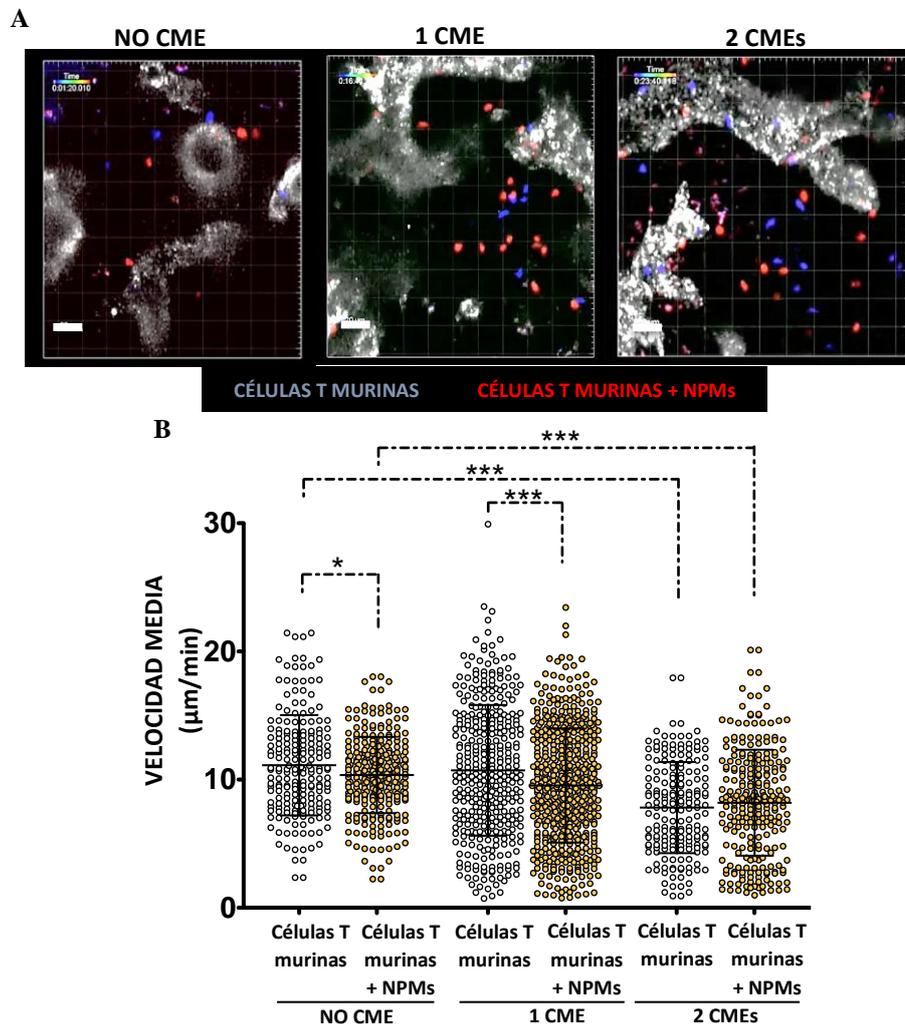


Fig. R18. Comportamiento *in vivo* de las células T murinas, libres o asociadas a NPMs, en el NL poplíteo en presencia o ausencia de uno o dos CMEs. A) Capturas representativas de los vídeos 2PM obtenidos en cada condición (no CME, 1 CME o 2 CMEs) (azul: células T libres de NPMs, rojo: células T asociadas a NPMs, gris: HEVs). **B)** Cuantificación de la velocidad celular en todas las condiciones, tras el análisis de los vídeos mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de dos-tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

		CÉLULAS EN EL NL	VELOCIDAD ($\mu\text{m}/\text{min}$)
NO CME	Células T murinas	43 %	11.1 ± 3.9
	Células T murinas + NPMs	57 %	10.4 ± 2.9
1 CME	Células T murinas	42 %	10.7 ± 5.1
	Células T murinas + NPMs	58 %	9.5 ± 4.4
2 CMEs	Células T murinas	43 %	7.8 ± 3.6
	Células T murinas + NPMs	57 %	8.2 ± 4.1

Tabla R2. Resumen de los resultados obtenidos tras el análisis de los vídeos 2PM de células T mediante el uso del software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de dos-tres experimentos independientes.

Asimismo, los análisis del recorrido de las células dentro del NL no mostraron una trayectoria preferencial hacia el lado del CME mientras éste estaba siendo aplicado, debido a una posible atracción magnética (Fig. R19.A,B). Esto indica que la asociación con NPMs no influencia a la trayectoria seguida por el linfocito una vez que está dentro del NL, incluso en presencia de un CME. Los resultados también mostraron que el balance entre las células transferidas libres de NPMs y asociadas con NPMs siempre se inclinaba hacia estas últimas (~58% de células asociadas a NPMs vs ~42% de células libres de NPMs) (Tabla R2) confirmando los datos obtenidos con anterioridad, que mostraban que la asociación con NPMs resulta en una mejor retención de estas células en los órganos linfoides.

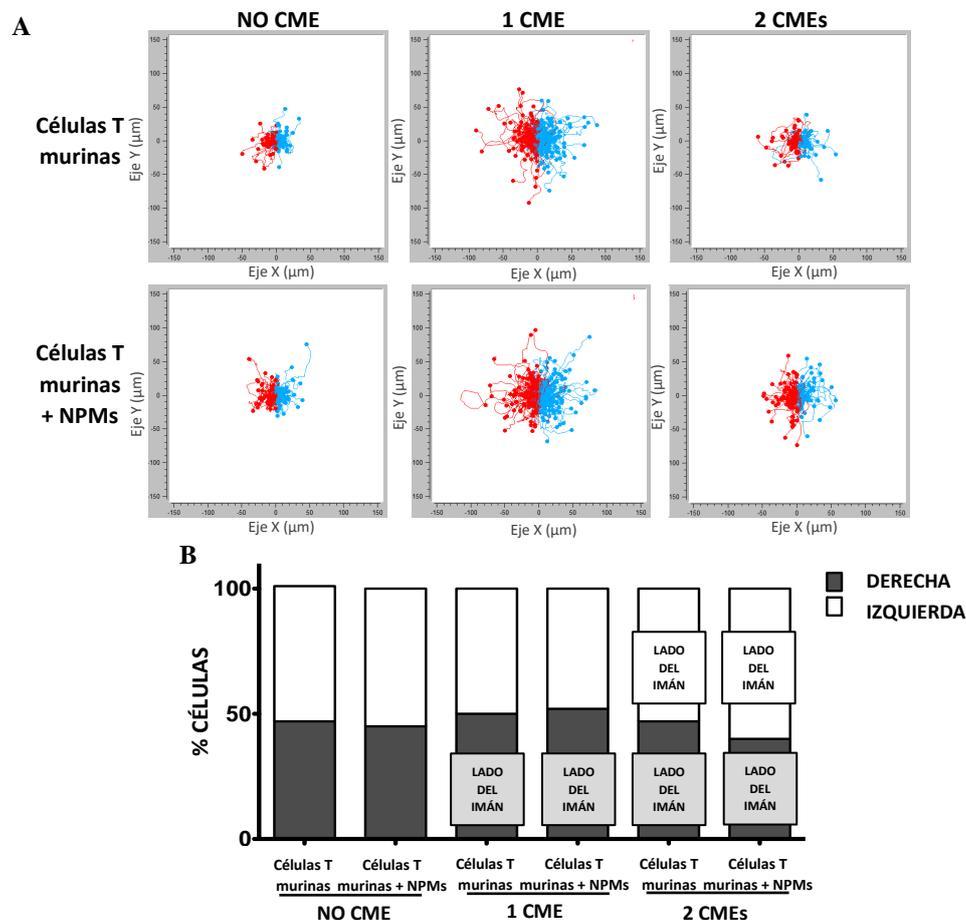


Fig. R19. Evaluación de la direccionalidad de las células T murinas asociadas o no con NPMs en el NL en presencia o ausencia de CMEs. **A)** Trayectorias seguidas por las células T murinas tratadas o no con NPMs en el interior del NL durante los ensayos 2PM (rojo: hacia la derecha, azul: hacia la izquierda), analizadas con el software proporcionado por Ibidi (Chemotaxis and Migration tool). **B)** Porcentaje de células que migran hacia cada lado, en presencia o ausencia de uno o dos CMEs.

También observamos que la velocidad de ambas se vio ligeramente reducida en presencia de un CME ($10.7 \pm 5.1 \mu\text{m}/\text{min}$ en células libres de NPMs y $9.5 \pm 4.4 \mu\text{m}/\text{min}$ en células asociadas a NPMs), hecho incluso aún más pronunciado cuando el gradiente magnético era mayor (con dos CMEs) ($7.8 \pm 3.6 \mu\text{m}/\text{min}$ en células libres de NPMs y $8.2 \pm 4.1 \mu\text{m}/\text{min}$ en células asociadas a NPMs) (Fig. R16.C; Tabla R2). Esto podría deberse en parte a la interacción entre las células

tratadas y no tratadas con NPMs durante la preparación de la mezcla antes de su inoculación en el ratón, como se comentó anteriormente (Fig. R16.B,C,D). Por otro lado, existen estudios publicados sobre la influencia de los campos magnéticos moderados en sistemas biológicos, principalmente debido a alteraciones en los canales iónicos transmembrana, así como en los fosfolípidos presentes en las membranas celulares [218-220]. El análisis del flujo de calcio (tras activación) mediante microscopía confocal nos permitió ver que no había alteraciones significativas en los flujos de calcio, esenciales para la funcionalidad de las células T, ni en la respuesta máxima o el tiempo para alcanzarlo, en el caso de las células Jurkat en presencia de NPMs (Figs. R20.A, R21.A). Las células T primarias murinas, en cambio, mostraron una ligera disminución en las respuestas media (84.6 ± 19.9 vs 39.6 ± 12.9) y máxima (85.6 ± 20.1 vs 38.9 ± 16.2) obtenidas tras un estímulo, en presencia de las NPMs (Figs. R20.B, R21.B).

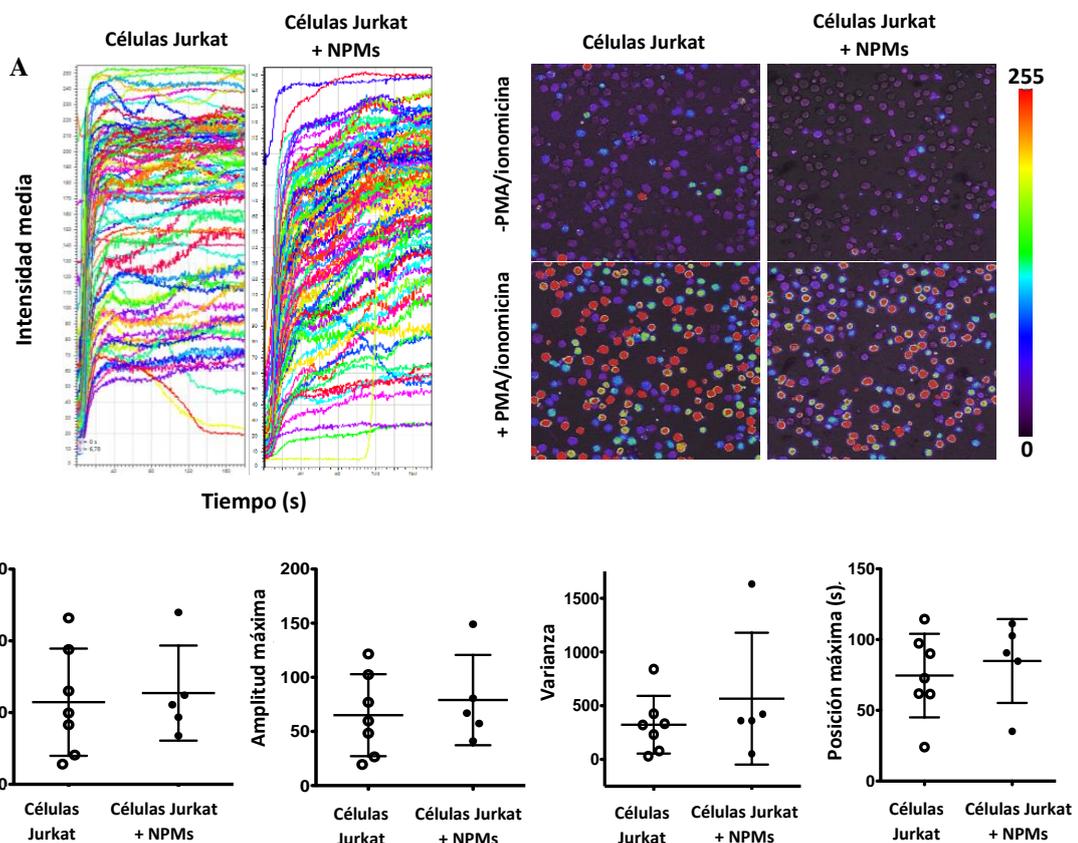


Fig. R20. Variaciones en las fluctuaciones de calcio en células Jurkat tras el tratamiento con NPMs. A) Cinética de los flujos de calcio e imágenes representativas de células Jurkat libres o asociadas con NPMs durante el ensayo, antes y después de la adición del estímulo (PMA/ionomicina). La intensidad de fluorescencia se indica en la escala lineal mostrada en la derecha. **B)** Resumen de los principales parámetros tras el análisis de los vídeos obtenidos con las células Jurkat. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

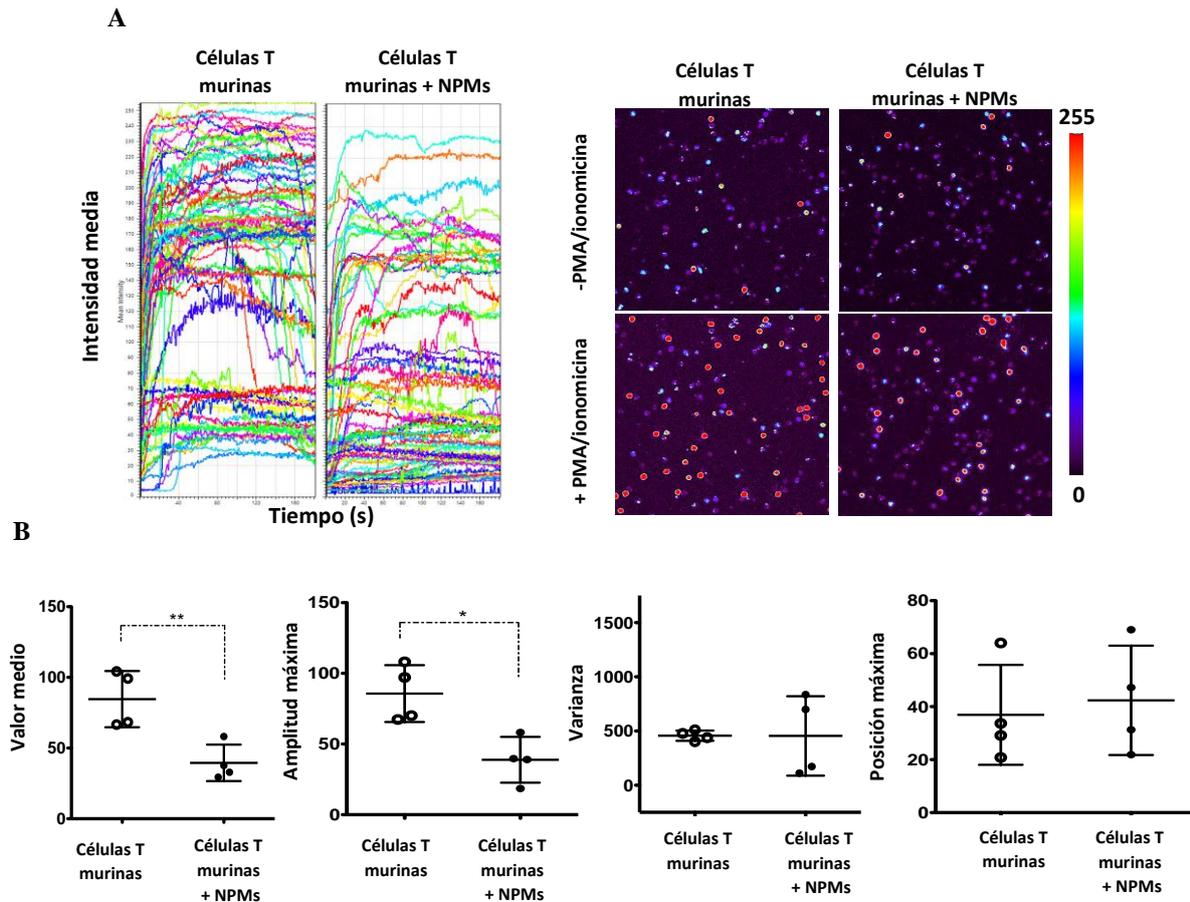


Fig. R21. Variaciones en las fluctuaciones de calcio en células T murinas tras el tratamiento con NPMs.

A) Cinética de los flujos de calcio e imágenes representativas de células T murinas libres o asociadas con NPMs durante el ensayo, antes y después de la adición del estímulo (PMA/ionomicina). La intensidad de fluorescencia se indica en la escala lineal mostrada en la derecha. **B)** Resumen de los principales parámetros tras el análisis de los vídeos obtenidos con las células T murinas. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

1.5.3. Evaluación del comportamiento *in vivo* de DCs asociadas a NPMs en el NL

Finalmente, se realizó una pequeña prueba para determinar, por microscopía multifotónica, si el comportamiento *in vivo* de otro tipo celular, como las DCs, capaz de internalizar gran cantidad de NPMs, se veía alterado y podía ser manipulado mediante la aplicación de un CME. En primer lugar, se comprobó que el fenotipo de las DCs tras ser tratadas con NPMs y activadas con LPS no se veía afectado debido a la presencia de NPMs (Fig. R22).

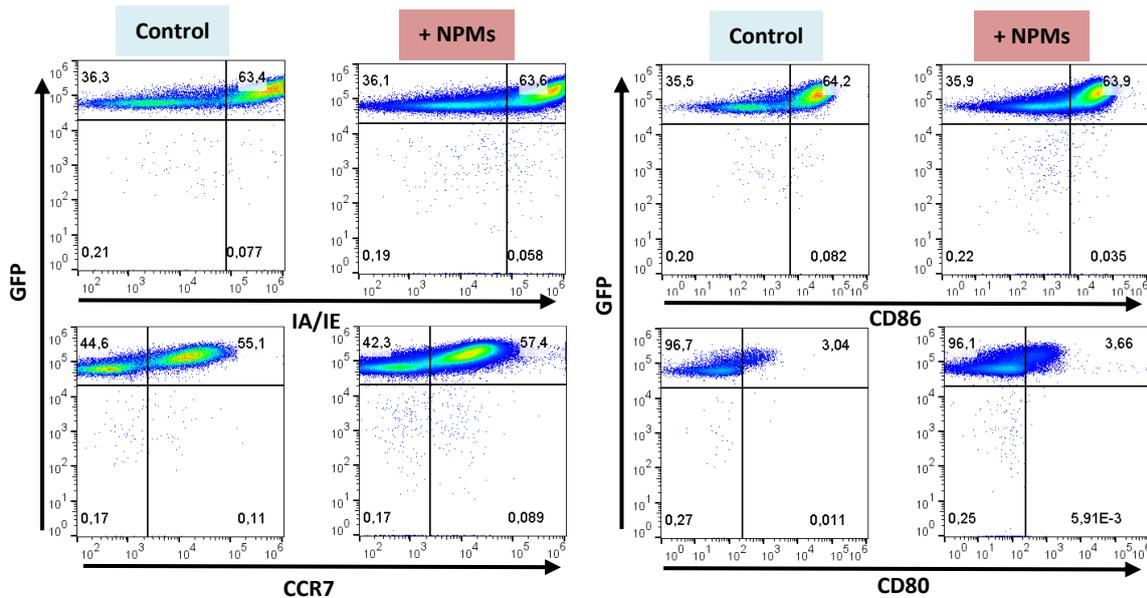


Fig. R22. Análisis fenotípico de las DCs murinas tras su asociación con las NPMs y activación con LPS. Gráfica de puntos (Dot Plot) que muestra la expresión de marcadores de DCs, tratadas o no con NPMs. Las DCs utilizadas procedían en algunas ocasiones de ratones “Ubi-GFP”, por lo que presentaban fluorescencia GFP.

Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia de una combinación de DCs tratadas y no tratadas con NPMs, y al día siguiente se realizó la microscopía multifotónica, en presencia o ausencia de un CME en uno de los lados del NL poplíteo (Fig. R23.A; videos 6 y 7). Tras el análisis de los videos obtenidos, se observó, al igual que en el caso de las células T (Fig. R18; Tabla R2), una disminución en la velocidad de las DCs cuando están asociadas con NPMs ($6.6 \pm 3.5 \mu\text{m}/\text{min}$ en células libres de NPMs vs $5.8 \pm 2.7 \mu\text{m}/\text{min}$ en células asociadas a NPMs) (Fig. R23.B; Tabla R3). En este caso no se encontraron diferencias significativas en la velocidad de las DCs en presencia de un CME (Fig. R23.B; Tabla R3). Sin embargo, el análisis de las trayectorias seguidas por las DCs indicó que podría existir cierto cambio en la direccionalidad de las células debido a la presencia de un CME, independientemente de su asociación o no con NPMs (Fig. R23.C; Tabla R3), aunque haría falta un estudio más en detalle para poder confirmarlo.

Además, se observó que un mayor número de DCs cargadas con NPMs había llegado al NL poplíteo (61-63% de células asociadas a NPMs vs 37-39% de células libres de NPMs) (Tabla R3). Estos resultados son similares a los obtenidos con las células T durante los ensayos de homing y microscopía multifotónica (Figs. R15.C, R17; Tabla R2).

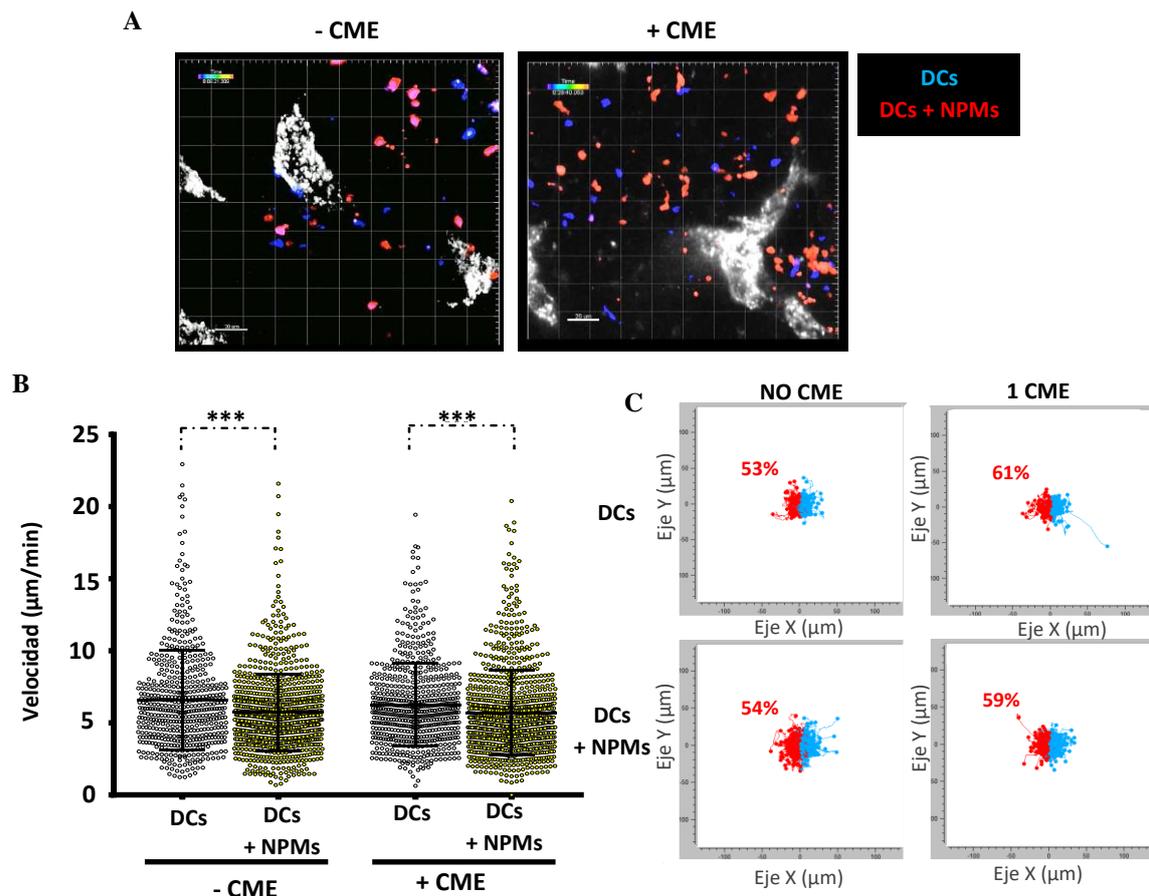


Fig. R23. Comportamiento *in vivo* de las DCs murinas, libres o asociadas a NPMs, en el NL poplíteo en presencia o ausencia de un CME. A) Capturas representativas de los vídeos 2PM obtenidos en cada condición (no CME, 1 CME) (azul: DCs libres de NPMs, rojo: DCs asociadas a NPMs, gris: HEVs). **B)** Cuantificación de la velocidad celular en todas las condiciones, tras el análisis de los vídeos mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de dos-tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **C)** Trayectorias seguidas por las DCs tratadas o no con NPMs en el interior del NL durante los ensayos 2PM (rojo: hacia la derecha, azul: hacia la izquierda), analizadas con el software proporcionado por Ibidi (Chemotaxis and Migration tool).

		CÉLULAS EN EL NL	VELOCIDAD ($\mu\text{m}/\text{min}$)	DIRECCIÓN	
				LADO + CME	LADO - CME
- CME	DCs	37%	$6,6 \pm 3,5$	53%	47%
	DCs + NPMs	63%	$5,8 \pm 2,7$	54%	46%
+ CME	DCs	39%	$6,3 \pm 2,9$	61%	39%
	DCs + NPMs	61%	$5,7 \pm 2,9$	59%	42%

Tabla R3. Resumen de los resultados obtenidos tras el análisis de los vídeos 2PM de DCs mediante el uso del software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de dos-tres experimentos independientes.

1.6. PRINCIPALES OBSERVACIONES

Como se ha comentado a lo largo de esta primera parte, la migración de los linfocitos T es un proceso fuertemente regulado y se considera esencial en el desarrollo de respuestas inmunes efectivas y potentes frente a diversidad de antígenos. Los resultados obtenidos en esta primera parte muestran que el uso de NPMs y CMEs podrían servir para guiar y retener linfocitos T en una región de interés, sin afectar críticamente aspectos biológicos cruciales de estas células. Las células T mantienen su funcionalidad y podrían ser acumuladas de manera específica en un órgano o tejido concreto, aumentando así su actividad en esa zona. Aquí se ha demostrado que las células T asociadas a NPMs pueden ser retenidas magnéticamente en los NLs, lo que podría ser útil en la moderación de respuestas inmunes en un contexto patológico.

Estos estudios, por tanto, revelan una aproximación interesante para promover la acumulación de células T, que podría ser implementada con el objetivo de optimizar terapias de transferencia adoptiva celular. En los capítulos posteriores de este trabajo se evaluará la posibilidad de aplicar esta manipulación magnética en células con capacidad antitumoral (células NK y células T citotóxicas) y su uso en modelos de tratamiento de cáncer.

La transferencia de células NK es una nueva terapia emergente. Esta terapia ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de algunas hemopatías malignas tales como la ALM o la ALL. En ocasiones tras la transferencia de células NK autólogas, si bien se ve un aumento del número de células NK circulantes, éstas expresan en su superficie niveles bajos de marcadores de activación o de receptores activadores, siendo también baja la proporción de células NK que migra a la zona del tumor. La combinación de estas dos circunstancias hace que la eliminación de tumores sea poco eficiente [221]. Por tanto, las investigaciones orientadas al estudio de los mecanismos moleculares durante la maduración de las células NK y su actividad efectora contra células tumorales ayudarán al diseño de protocolos óptimos para la aplicación terapéutica de células NK [222]. De igual manera, la búsqueda de estrategias que permitan la acumulación específica de células NK en el área del tumor permitirán el desarrollo de terapias antitumorales más eficientes [182].

Durante la segunda parte de esta Tesis se evalúa la posibilidad de asociar este tipo celular a NPMs, con el objetivo de determinar, en una primera aproximación *in vitro*, si las NPMs pudieran servir como una plataforma para mejorar la migración/activación de las células NK transferidas hacia la zona del tumor. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis sobre la asociación de las NPMs con este tipo de células, así como sobre la funcionalidad de las mismas y su retención magnética en un modelo *in vitro*, tras la aplicación de un CME.

PARTE 2: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS NPMs SOBRE CÉLULAS NK MURINAS Y HUMANAS Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA *IN VITRO*

2.1. AISLAMIENTO Y EXPANSIÓN DE CÉLULAS NK MURINAS

Para llevar a cabo el estudio de interacción de las NPMs con las células NKs, se utilizaron dos modelos de células NK: la línea celular humana NK-92MI y células NK aisladas de bazo de ratones C57BL/6 y expandidas durante una semana con IL-2. La pureza de estos cultivos primarios se comprobó siempre a día 0, tras el aislamiento, y a día 7, tras la expansión (Fig. R24). Por otro lado, la línea celular NK-92MI deriva de la línea celular NK-92, originada de un paciente con linfoma granular, mediante la transfección del gen que codifica para IL-2, por lo que es independiente de IL-2 [223, 224]. Esta línea celular presenta gran citotoxicidad para una variedad de líneas tumorales [225-227], incluyendo la línea celular K562 [228]. Además, como ya se comentó, es la única línea celular que ha sido aprobada por la FDA para su uso en ensayos

clínicos y ha demostrado ser segura en su uso durante la transferencia celular en seres humanos [133, 229, 230].

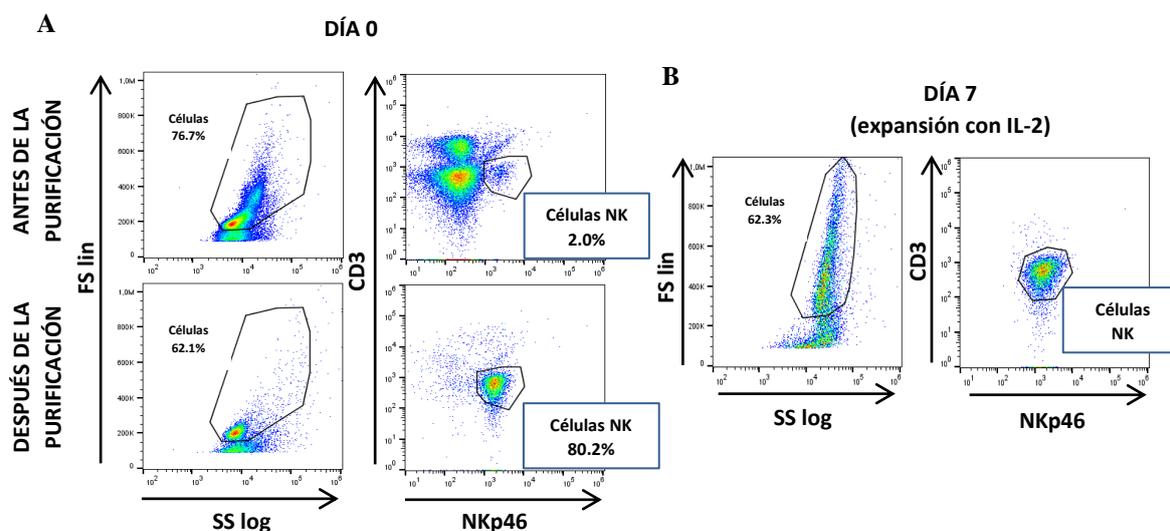


Fig. R24. Purificación y expansión de las células NK murinas. Gráficas representativas, obtenidas con el software FlowJo, de las diferentes poblaciones obtenidas A) a día 0, antes y después de purificar la población de células NK y B) a día 7, tras su expansión con IL-2.

Finalmente, se partió del conjunto de NPMs sintetizadas y caracterizadas al inicio de esta Tesis y se realizó un primer cribado, al igual que en el apartado anterior, para determinar qué tipo de NPM es la más adecuada para este otro tipo celular.

2.2. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON MODELOS DE CÉLULAS NK HUMANAS Y MURINAS

2.2.1. Evaluación de la toxicidad en los modelos de células NK

En primer lugar, se analizó si la asociación de las diferentes NPMs utilizadas en el estudio afectaba a la viabilidad celular de estos dos modelos de células NK. Al igual que en la parte anterior, se llevaron a cabo dos ensayos diferentes: el ensayo AlamarBlue y el estudio por citometría de flujo de anexina/PI. El primer ensayo mostró que, de la misma manera que para los modelos utilizados de células T, las NPMs no mostraban, en la mayoría de los casos, signos de toxicidad en ninguno de los modelos de células NK (Fig. R25.A,B). Sí se encontró una cierta disminución en la viabilidad de las células NK-92MI tras las dosis más altas de DMSA-NPMs ($\sim 82.3 \pm 2.6$ %) (Fig. R25.A) y una ligera disminución en las células NK murinas en presencia de ciertas concentraciones de APS-NPMs ($\sim 83.4 \pm 2.7$ %) (Fig. R25.B). Por otro lado, el aumento encontrado en la señal de fluorescencia que se encontró previamente, y que podría indicar un aumento en el metabolismo mitocondrial y cierta activación celular, sólo tiene lugar, en este caso, en la línea celular NK-92MI (Fig. R25.A).

El análisis de apoptosis/necrosis por citometría de flujo no mostró cambios significativos importantes cuando las células fueron incubadas con las diferentes NPMs (Fig. R25.C,D), sólo un

leve incremento en la apoptosis temprana en presencia de DMSA-NPMs en las células NK murinas (8.8 ± 2.1 % en ausencia de NPMs vs 16.5 ± 2.8 y 14.5 ± 2.6 % tras las dosis más altas de DMSA- y APS-NPMs) (Fig. R25C). Tras estos estudios se concluyó que las NPMs utilizadas en este trabajo tampoco causan una toxicidad significativa importante a las concentraciones usadas en las células NK, tanto de origen humano como murino.

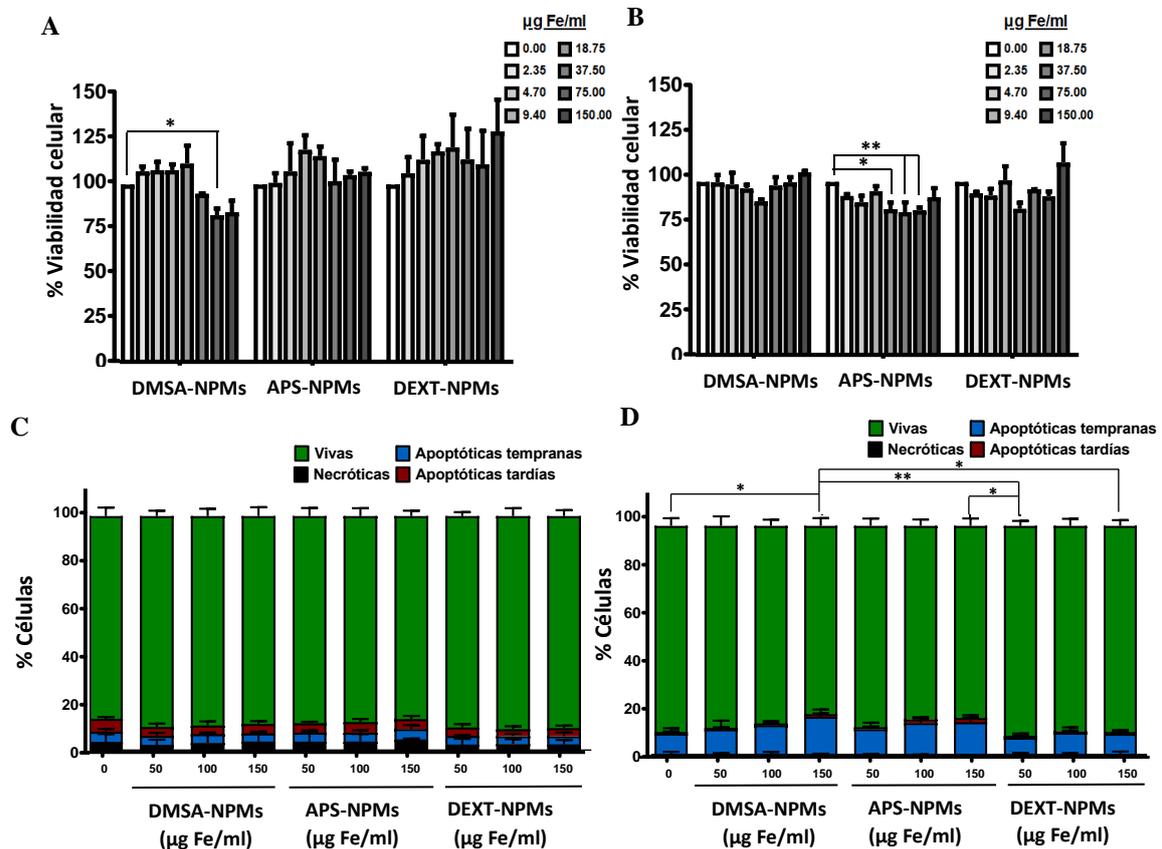


Fig. R25. Evaluación de la toxicidad de las NPMs recubiertas en modelos de células NK. Viabilidad celular de las **A)** células NK-92MI o **B)** células NK murinas después del tratamiento con NPMs, medido mediante el ensayo fluorimétrico AlamarBlue. Análisis mediante citometría de flujo de la formación de células apoptóticas o necróticas tras la incubación con NPMs en las **C)** células NK-92MI o **D)** células NK murinas, a través de la tinción de Anexina V/PI. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.2.2. Cuantificación del hierro asociado a los modelos de células NK

En segundo lugar, se evaluó también la cantidad de NPMs que se asocia a este tipo celular. En el capítulo anterior pudimos observar que las NPMs recubiertas de APS (APS-NPMs) eran las NPMs que se asociaban en mayor medida con las células Jurkat y las células T primarias, probablemente debido a su carga superficial positiva. Tras los análisis obtenidos mediante ICP-OES tras la incubación de estas células con las NPMs, estos fueron los resultados: APS-NPMs daban lugar a una detección de hierro mayor en las muestras celulares analizadas (14.0 ± 4.8 pg Fe/célula en células NK-92MI y 14.6 ± 1.0 pg Fe/célula en células NK murinas con APS-NPMs frente a 1.7 ± 0.4 y 3.5 ± 0.9 pg Fe/célula en el caso de DMSA-NPMs y a 2.4 ± 1.4 y 5.1 ± 2.7 pg

Fe/célula en el caso de DEXT-NPMs) (Fig. R26.A,B). En este caso no se mostraron apenas diferencias en la cantidad de NPMs que se asoció a las células NK-92MI o murinas. En ambos casos fue muy parecido, alrededor de los 14 pg Fe por célula, muy parecido a los ~15 pg encontrados en las células Jurkat (Fig. R6.A). De esta manera, al igual que en el capítulo anterior, seleccionamos las NPMs recubiertas con APS (APS-NPMs) para seguir el estudio.

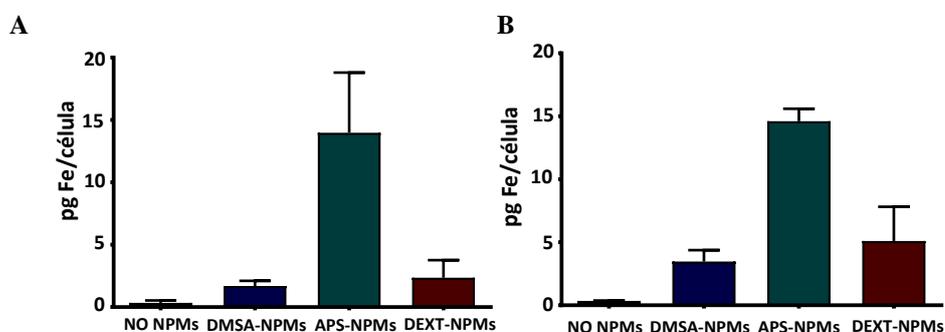


Fig. R26. Evaluación de la asociación de NPMs a los modelos de células NK. Cuantificación del hierro asociado a las **A)** células NK-92MI o **B)** células NK murinas tras la incubación con las diferentes NPMs, mediante ICP-OES. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres-cuatro experimentos independientes.

2.2.3. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en los modelos de células NK

A continuación, se analizó la localización en las células de estas NPMs, mediante las diversas aproximaciones en microscopía ya utilizadas previamente. La tinción de Azul de Prusia y la microscopía confocal, al igual que en el caso de las células T, mostraron que las NPMs se quedaban asociadas a la membrana plasmática en ambos casos (Fig. R27.A,B).

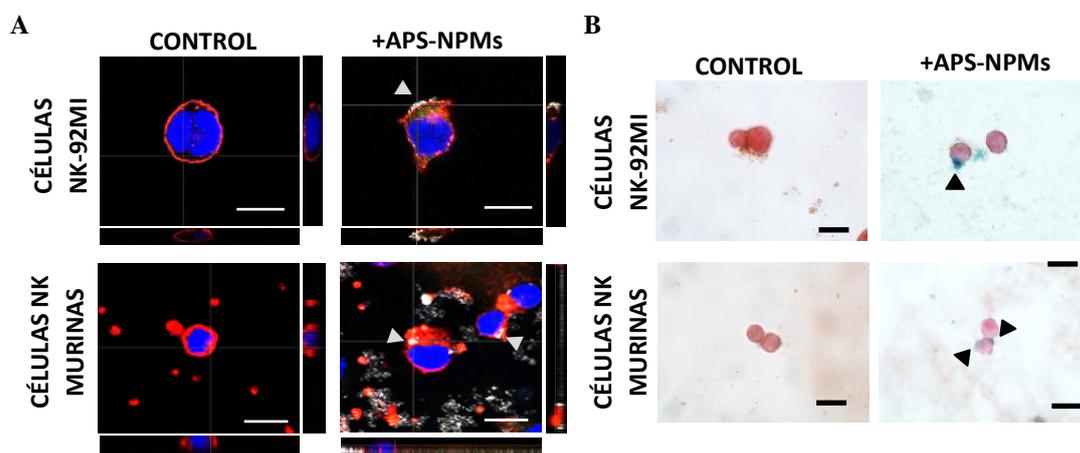


Fig. R27. Localización subcelular de las NPMs en los modelos de células NK (I). **A)** Imágenes representativas de las células NK-92MI y las células NK murinas tras el tratamiento con APS-NPMs adquiridas por microscopía confocal (membrana celular (rojo), NPMs (gris) y núcleo (azul)) (escala = 10 μ m). Las proyecciones ortogonales se compusieron mediante el software ImageJ. **B)** Tinción de Azul de Prusia y contratinción en rojo neutro de las células NK-92MI y las células NK murinas tras su asociación con las NPMs. (escala = 10 μ m). Las flechas indican la presencia de NPMs asociadas a las células.

Un estudio más en detalle se llevó a cabo a través de la microscopía electrónica de transmisión. De igual manera se observó cómo las NPMs permanecían asociadas en el perímetro de las células (**Fig. R28**). Como ya se comentó anteriormente, esto se deba probablemente a una interacción entre cargas entre el recubrimiento polimérico de las NPMs y las membranas celulares. Dado que las células NK son un tipo de linfocitos, aunque en este caso pertenecen al sistema inmune innato, este comportamiento es similar al encontrado en el capítulo anterior con las células T.

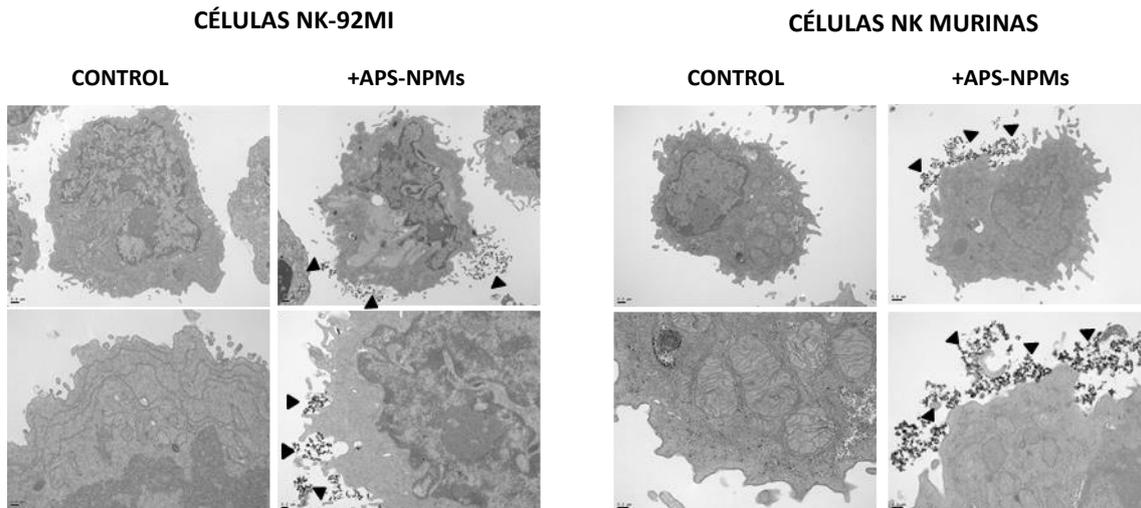


Fig. R28. Localización subcelular de las APS-NPMs en los modelos de células NK (II). Imágenes representativas obtenidas por TEM de las células NK-92MI y las células NK murinas tras el tratamiento con APS-NPMs. Los paneles superiores en cada caso ofrecen una visión global de la célula, mientras que los paneles inferiores muestran en mayor detalle regiones celulares para ilustrar mejor las interacciones entre las NPMs y la membrana celular. Las flechas indican la presencia de NPMs asociadas a las células.

2.1.4. Análisis fenotípico de los modelos de células NK tras su asociación con NPMs

Como ya se comentó, una de las principales características de las células NK es la presencia de receptores inhibidores y activadores en la superficie celular [95, 96]. El estado de activación de las células NK depende del balance de las señales de activación e inhibición mediadas por dichos receptores [231], que son capaces de reconocer tanto proteínas propias como extrañas. Además, otros marcadores de activación temprana como CD69 o tardía como CD25, así como moléculas de adhesión tales como CD54 (ICAM-1), CD11a o CD62L también desempeñan un papel importante en la actividad de estas células. Por todo esto expuesto, la expresión de todos estos receptores y marcadores es importante en la funcionalidad de las células NK, y es necesario analizar la expresión de los mismos tras la asociación de las células NK con las NPMs. Para ello, se analizó por citometría de flujo la expresión de algunos de estos marcadores de superficie relevantes en este tipo celular, después de la incubación con diversas concentraciones de las NPMs elegidas (APS-NPMs). Como se observa en la **Fig. R29.A,B**, no se observaron grandes

diferencias significativas en la expresión de los diferentes marcadores analizados en las células NK-92MI, sólo una leve disminución en la expresión de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1) a dosis altas de NPMs (4246 ± 120 vs 3812 ± 961 de IMF) y un aumento en CD45, relacionado con la maduración de células linfoides (6687 ± 136 de IMF en ausencia de NPMs vs 7232 ± 142 , 7531 ± 166 y 7163 ± 214 de IMF en presencia de concentraciones crecientes de NPMs) [232]. En el caso de las células NK murinas se observó ligera disminución en el marcador de activación CD69 tras el tratamiento con concentraciones altas de NPMs (4974 ± 518 vs 4051 ± 713 de IMF) (Fig. R30.A,B).

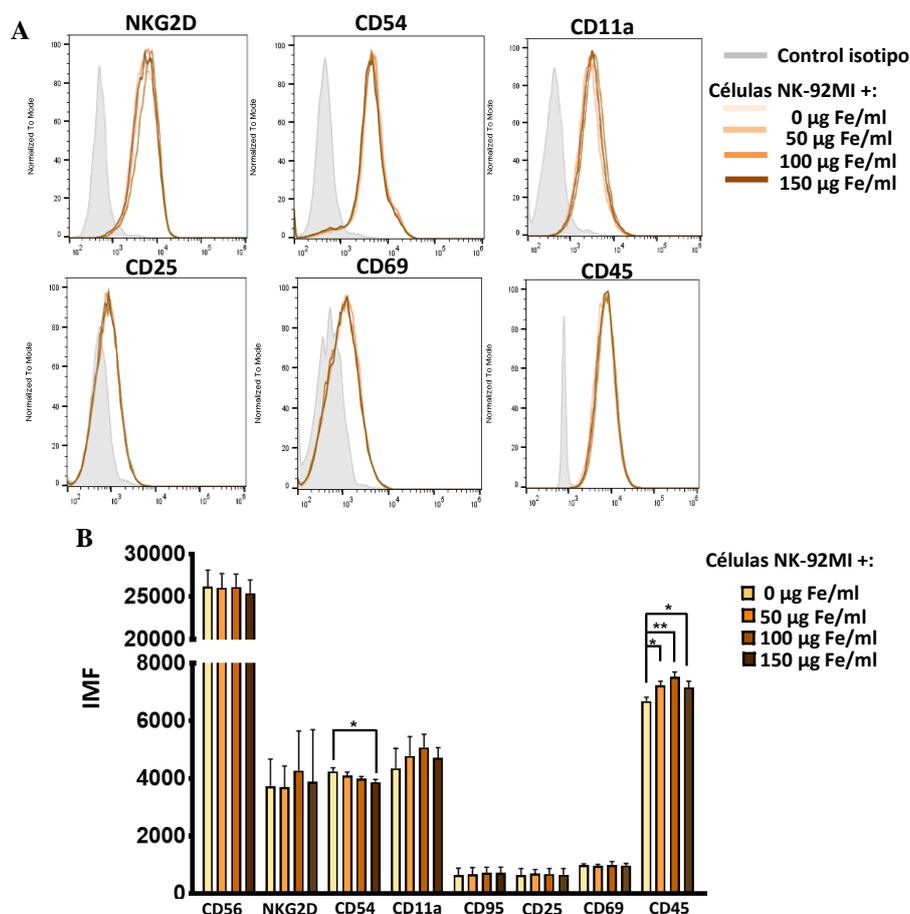


Fig. R29. Análisis fenotípico de las células NK-92MI tras su asociación con las NPMs. A) Histogramas representativos de algunos marcadores obtenidos por citometría de flujo y **B)** cuantificación (IMF) de la expresión de marcadores de superficie relevante en las células NK-92MI tras la incubación con NPMs. Estos resultados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

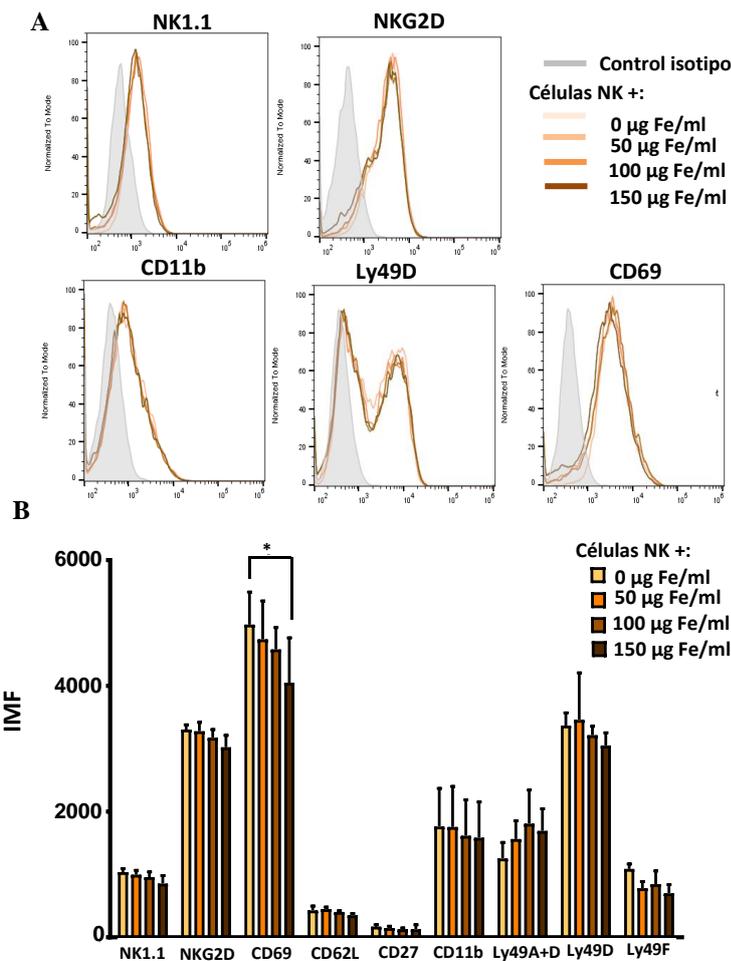


Fig. R30. Análisis fenotípico de las células NK murinas tras su asociación con las NPMs. A) Histogramas representativos de algunos marcadores obtenidos por citometría de flujo y **B)** cuantificación (IMF) de la expresión de marcadores de superficie relevante en las células NK murinas tras la incubación con NPMs. Estos resultados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD *IN VITRO* DE LOS MODELOS DE CÉLULAS NK HUMANAS Y MURINAS TRAS SU ASOCIACIÓN CON NPMs

2.3.1. Capacidad de conjugación con diversas líneas celulares diana

Una vez comprobado el fenotipo de estas células, y con el objetivo de evaluar si las células NK presentaban defectos en su funcionalidad tras su asociación con las NPMs, se llevaron a cabo, en primer lugar, experimentos de conjugación con diferentes células diana, según el tipo de célula NK utilizado. La conjugación con células diana tiene gran relevancia, ya que un paso clave para que las células NK ejerzan su actividad citolítica es la interacción física con estas células [233]. En la **Fig. R31** se observa la cinética de conjugación entre la línea celular humana NK-92MI y la línea celular K562. No se detectaron diferencias significativas entre la conjugación obtenida entre las células NK libres de NPMs o asociadas con diferentes concentraciones de APS-NPMs.

Los resultados fueron similares para el caso de las células NK murinas con las líneas celulares YAC-1 y RMA-S, susceptibles de ser lisadas por las células NK murinas (Fig. R32). En ninguno de los casos se observó una diferencia o defecto en la conjugación de estas células aún en presencia de NPMs, tanto a tiempos cortos (2-5 min), siempre en torno al 2-4%, como a tiempos más largos (45 min), en torno al 30-40% en ambos casos.

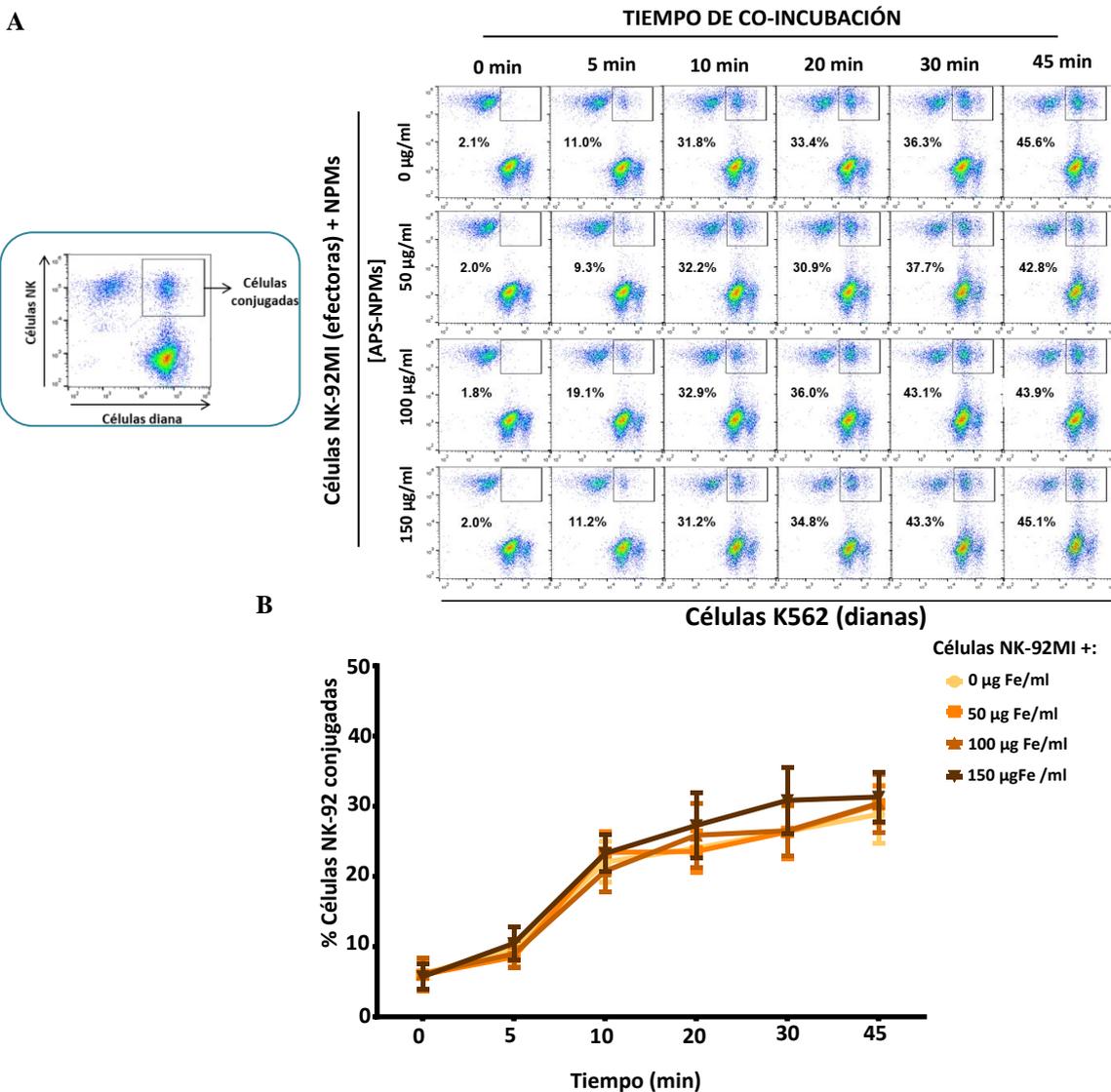


Fig. R31. Evaluación de la capacidad de conjugación de las células NK-92MI tras su asociación con NPMs. **A)** Dotplots representativos de la cinética de conjugación de las células NK-92MI, tras ser incubadas con diferentes concentraciones de APS-NPMs, con la línea celular K562, en proporción 2:1 (célula efectora : célula diana). Cada fila representa la cinética obtenida tras haber incubado previamente las células NK-92MI con concentraciones crecientes de NPMs. **B)** Cinética de conjugación de las células NK-92MI, tras ser tratadas con NPMs, con la línea celular K562, co-incubadas en proporción 2:1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

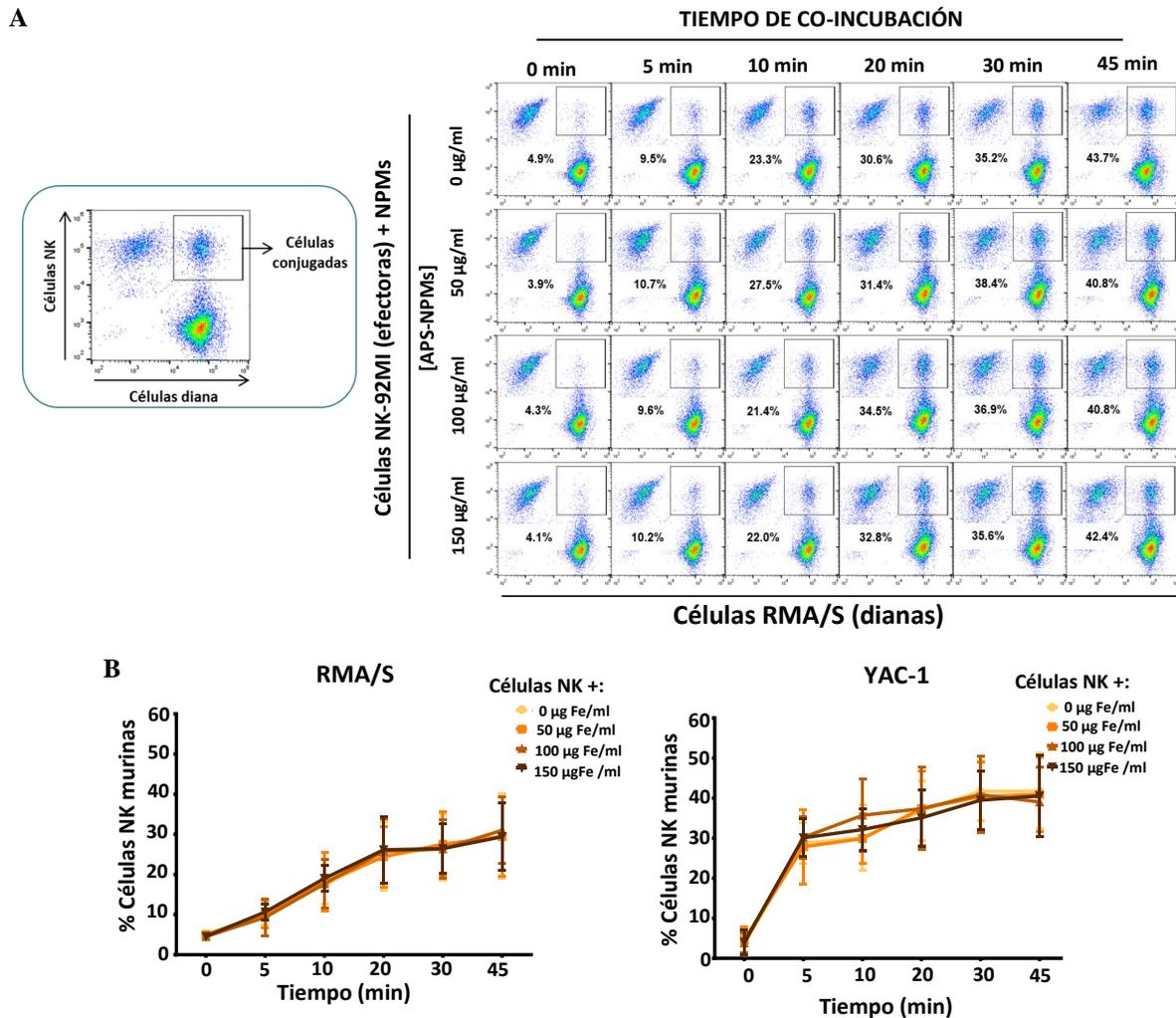


Fig. R32. Evaluación de la capacidad de conjugación de las células NK murinas tras su asociación con NPMs. **A)** Dotplots representativos de la cinética de conjugación de las células NK murinas, expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, con la línea celular RMA/S, en proporción 2:1 (célula efectora : célula diana). Cada fila representa la cinética obtenida tras haber incubado previamente las células NK murinas con concentraciones crecientes de NPMs. Cinéticas de conjugación de las células NK murinas, tras ser expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, con la línea celular **B)** RMA/S o **C)** YAC-1, co-incubadas en ambos casos en proporción 2:1. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, se llevó a cabo microscopía confocal para determinar si existía alguna diferencia en la interacción entre las células NK y su diana o la formación del centro de organización de microtúbulos, pero no se observaron diferencias significativas en los diferentes tiempos de co-incubación (**Fig. R33**).

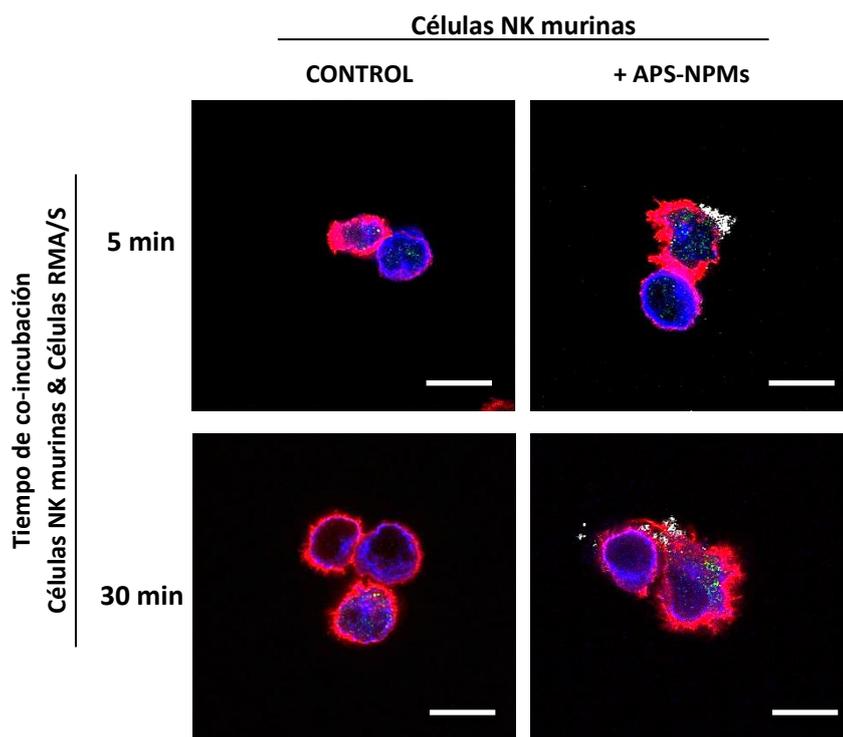


Fig. R33. Conjugación de las células NK murinas, tratadas o no con NPMs, con su diana celular RMA/S. Imágenes representativas de la conjugación entre las células NK murinas, en presencia o ausencia de NPMs, con las células RMA/S a diferentes tiempos de incubación, adquiridas por microscopía confocal (actina (rojo), microtúbulos (azul), perforina (verde)). Escala: 10 μ m.

2.3.2. Capacidad de desgranulación frente a diferentes estímulos

Por otro lado, como ya se comentó, la proteína de membrana asociada a lisosomas CD107a se encuentra incrementada en la superficie de las células NK tras su desgranulación y activación por parte de aquellas células diana capaces de inducir una respuesta citolítica. La expresión de CD107a se correlaciona con la secreción de citoquinas y la lisis mediada por las células NK, por lo que se utiliza como marcador para determinar si estas células sufren defectos en su función citolítica [234]. Tras la estimulación con las células diana (células K562 en el caso de la línea celular NK-92MI), o a través del entrecruzamiento con ligandos de los receptores activadores de las células NK (como NKG2D, NK1.1 y NKp46) [235, 236], se evaluó la presencia de este marcador en las células NK asociadas a concentraciones crecientes de APS-NPMs. No se observaron diferencias significativas en la desgranulación de estas células en presencia de las NPMs tras los diferentes estímulos, aunque sí se incrementó la desgranulación basal o inespecífica tanto en la línea celular NK-92MI (2.9 ± 0.3 % en ausencia de NPMs vs 3.6 ± 0.3 %, 4.1 ± 0.5 % y 4.7 ± 0.7 % en presencia de las concentraciones crecientes de NPMs) como en las células NK primarias (12.0 ± 2.5 % en ausencia de NPMs vs 19.3 ± 4.1 % y 23.5 ± 7.0 % en presencia de las concentraciones

más altas de NPMs) (Figs. R34-35). También se observó un ligero incremento en la desgranulación obtenida tras la estimulación con α -NKG2D en las células NK-92MI a la dosis más alta de APS-NPMs (7.2 ± 0.2 % en ausencia de NPMs vs 8.1 ± 0.3 % con la dosis más alta de NPMs).

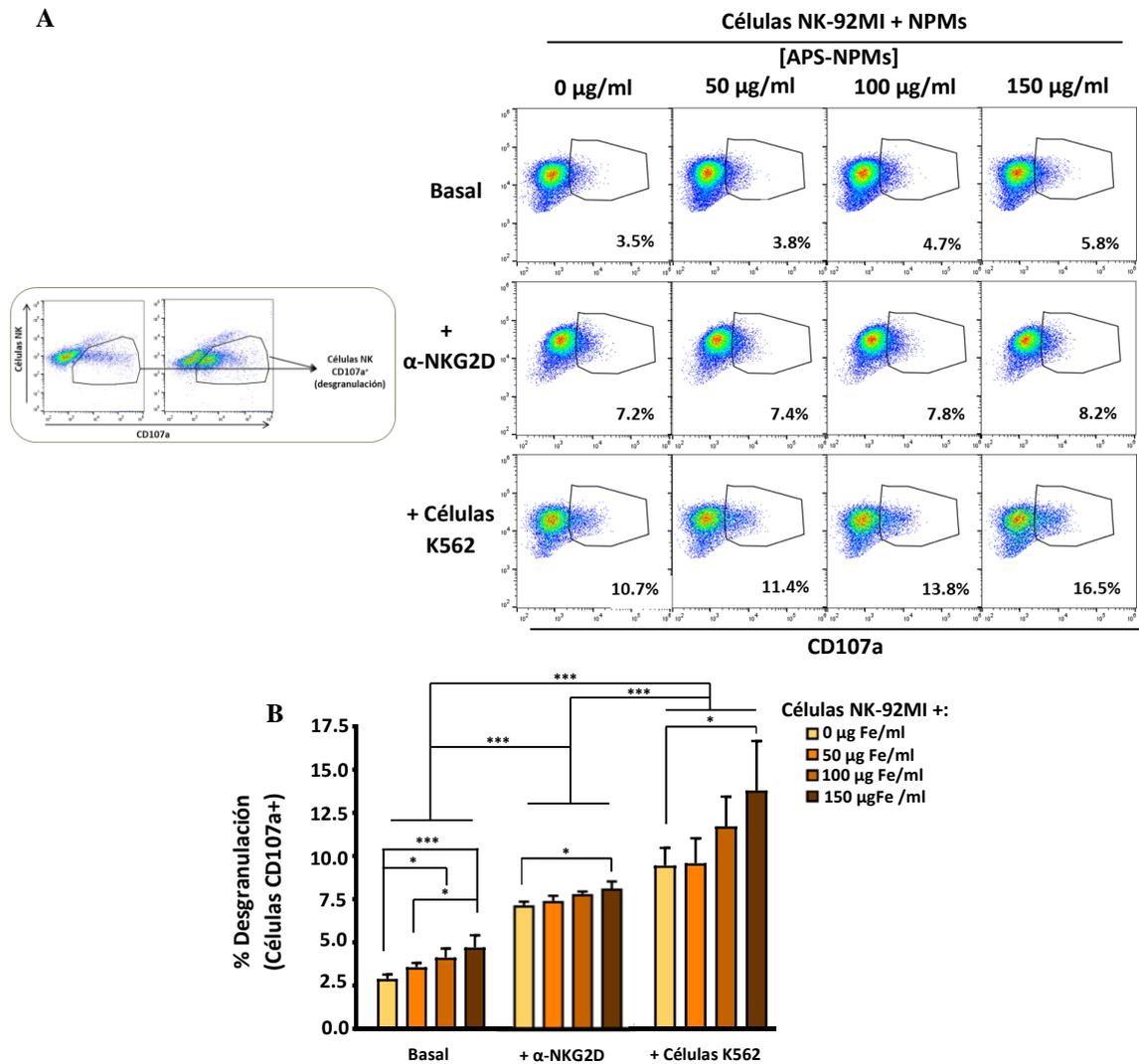


Fig. R34. Evaluación de la capacidad de desgranulación de las células NK-92MI tras su asociación con NPMs. A) Dotplots representativos de la capacidad de desgranulación de las células NK-92MI, tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, sin estimular o estimuladas con anti-NKG2D humano o la línea celular diana K562. **B)** Capacidad de desgranulación de las células NK-92MI, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, sin estimular o estimuladas con anti-NKG2D humano o la línea celular diana K562. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

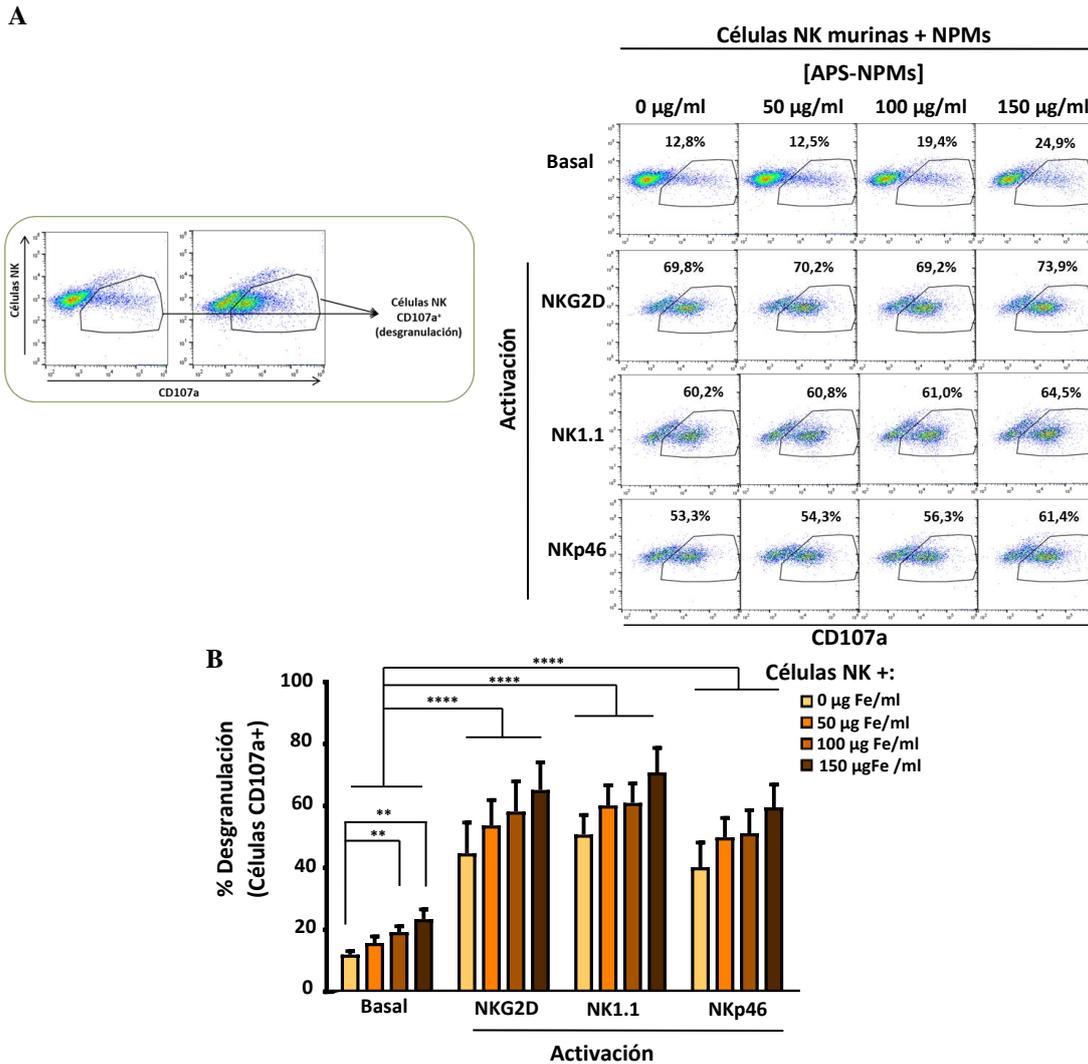


Fig. R35. Evaluación de la capacidad de desgranulación de las células NK murinas tras su asociación con NPMs. A) Dotplots representativos de la capacidad de desgranulación de las células NK murinas, expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, sin estimular o estimuladas con anti-NKG2D, -NK1.1 o -NKp46 murinos. **B)** Capacidad de desgranulación de las células NK murinas, tras ser expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, sin estimular o estimuladas con anti-NKG2D, -NK1.1 o -NKp46 murinos. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

2.3.3. Capacidad citotóxica frente a diversas líneas celulares diana

Finalmente, se evaluó si la asociación de las NPMs con las células NK afectaba a la capacidad citolítica de las mismas. Para ello, se analizó el porcentaje de células diana lisadas en diferentes ratios de célula efectora y célula diana. No se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células lisadas por parte de las células NK tras su asociación con concentraciones crecientes de NPMs, en las diversas proporciones utilizadas, ni en la línea celular NK-92MI (9.3 ± 5.5 % lisis en ausencia de NPMs vs 7.1 ± 3.7 % lisis en la dosis más alta de NPMs a ratios menores y 21.8 ± 7.4 % lisis vs 22.0 ± 8.2 % lisis a ratios mayores) (Fig. R36) ni en las células NK murinas (34.7 ± 4.1 % lisis en ausencia de NPMs vs 29.9 ± 4.1 % lisis en la dosis más alta de NPMs

a ratios menores en co-cultivo con RMA/S y 54.8 ± 5.0 % lisis vs 50.9 ± 3.2 % lisis a ratios mayores) (Fig. R37). De esta manera, se comprueba que la presencia de NPMs no afecta a la capacidad lítica y/o citotoxicidad de las células NK, tanto de origen humano como murino.

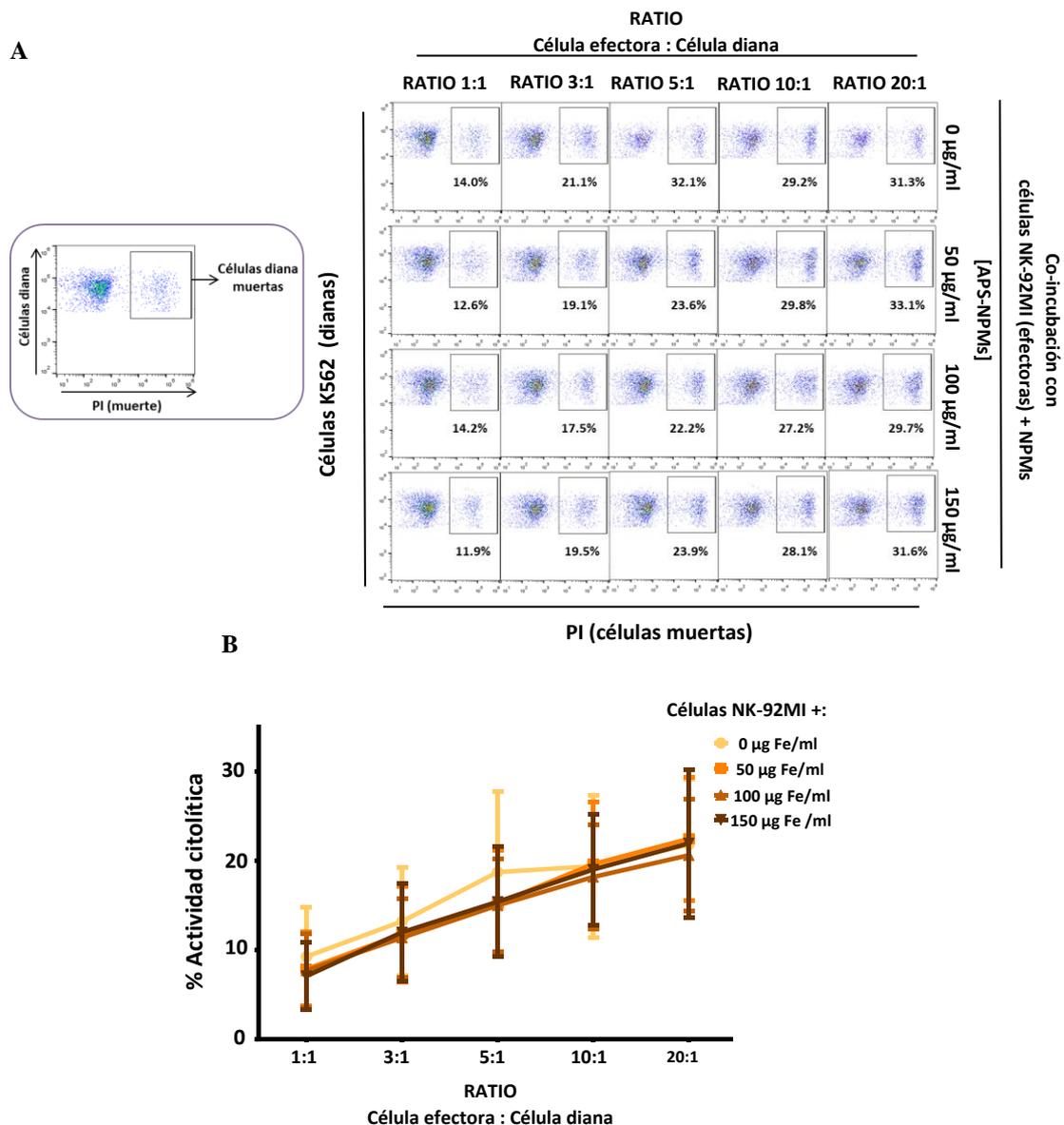


Fig. R36. Evaluación de la actividad citotóxica de las células NK-92MI tras su asociación con NPMs. A) Dotplots representativos de la capacidad citotóxica de las células NK-92MI, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente la línea celular K562, co-incubadas en diferentes ratios durante 4 h. Cada fila representa la lisis obtenida tras haber incubado previamente las células NK-92MI con concentraciones crecientes de NPMs. **B)** Actividad citolítica de las células NK-92MI, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente a la línea celular K562, co-incubadas en diversas proporciones durante 4 h. Los datos son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

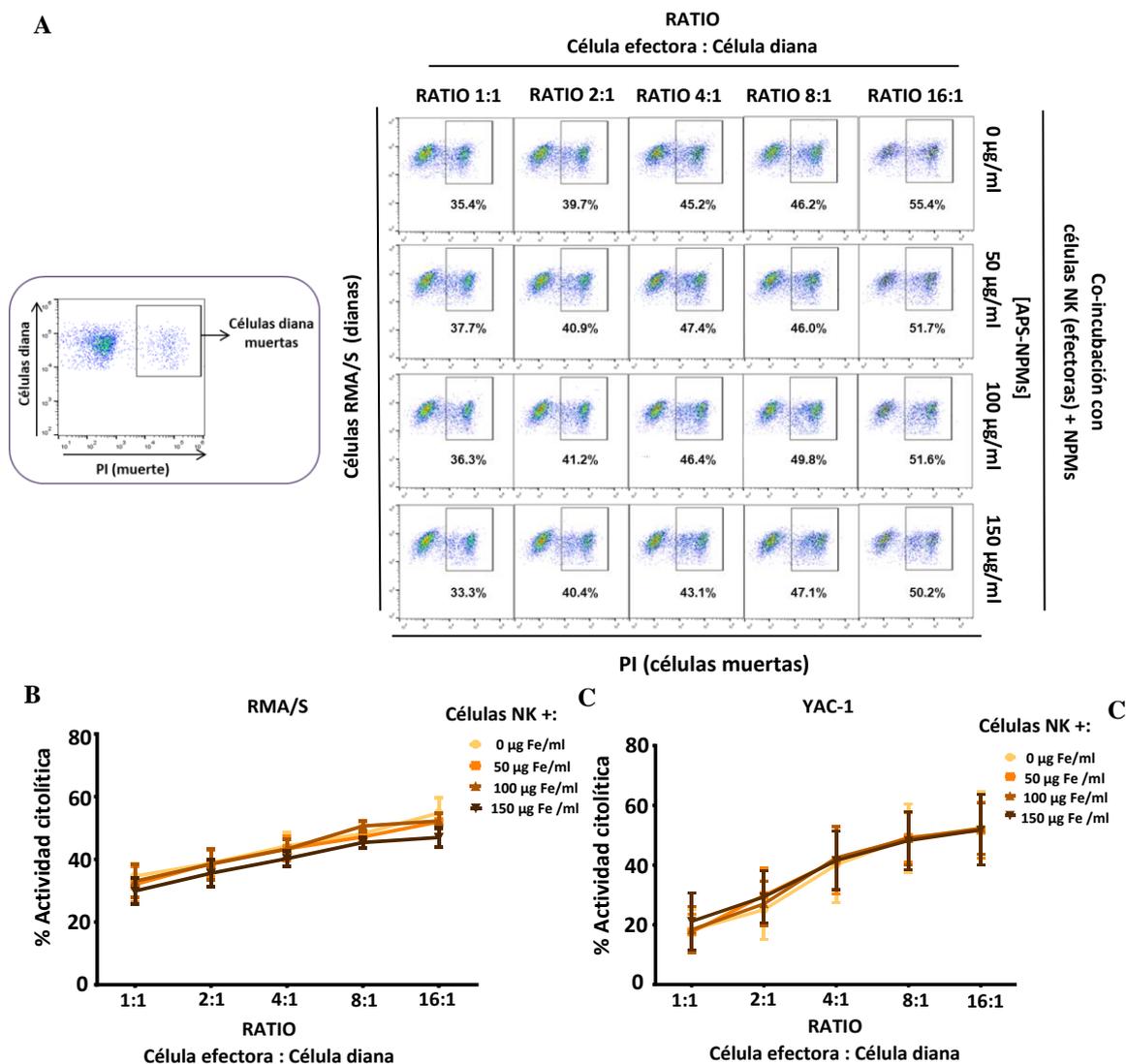


Fig. R37. Evaluación de la actividad citotóxica de las células NK murinas tras su asociación con NPMs. A) Dotplots representativos de la capacidad citotóxica de las células NK murinas, tras ser expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente la línea celular RMA/S, co-incubadas en diferentes ratios durante 4 h. Cada fila representa la lisis obtenida tras haber incubado previamente las células NK murinas con concentraciones crecientes de NPMs. Actividad citolítica de las células NK murinas, tras ser expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente a la línea celular **B)** RMA/S o **C)** YAC-1, co-incubadas en diversos ratios durante 4 h. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.3.4. Capacidad de producción de IFN- γ tras su exposición a diferentes estímulos

Otro aspecto importante en la funcionalidad de las células NK es la rápida producción de diversas citoquinas proinflamatorias, siendo una de las más importantes IFN- γ [109]. Por ello, se analizó la producción de esta citoquina por parte de las células NK-92MI, en presencia de diferentes concentraciones de NPMs, tras ser expuestas a diversos estímulos. El porcentaje de células NK-92MI IFN- γ^+ fue ligeramente incrementado tras el tratamiento a dosis altas de NPMs y ser expuestos a PMA/ionomicina (64.5 ± 4.6 % en ausencia de NPMs y 72.1 ± 2.4 % a la dosis más alta de NPMs) (Fig. R38.A,B).

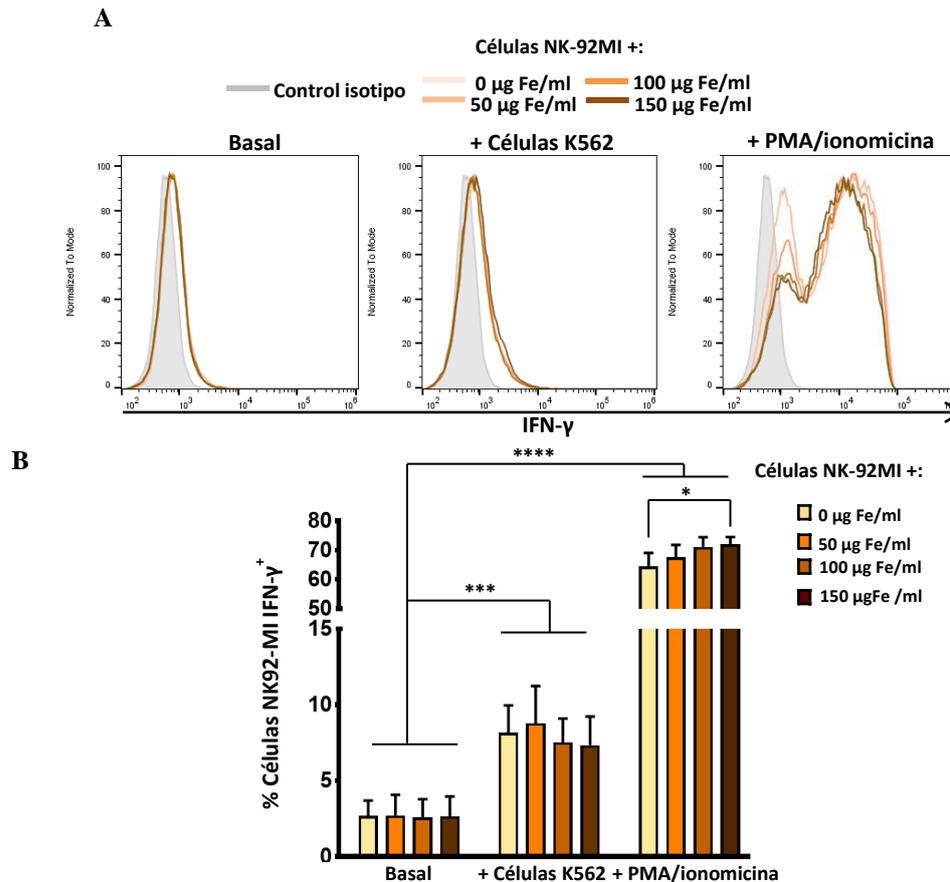
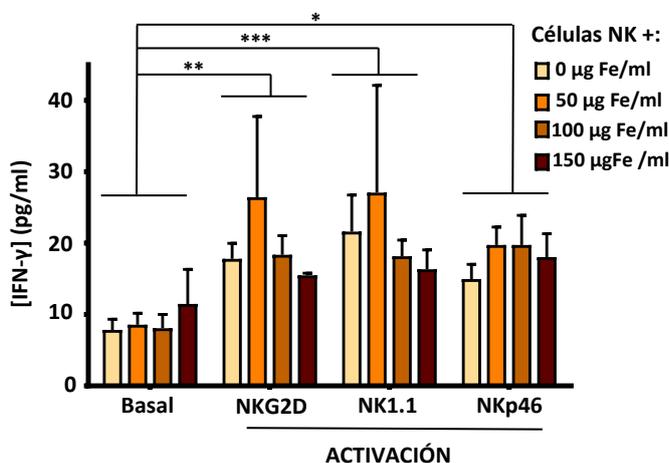


Fig. R38. Evaluación de la producción de IFN- γ de las células NK-92MI tras su asociación con NPMs. A) Histogramas representativos de la expresión de IFN- γ intracelular en las células NK-92MI, tras su asociación con diferentes concentraciones de NPMs y activación mediante diferentes estímulos. **B)** Cuantificación del porcentaje de células NK-92MI IFN- γ^+ . Los datos (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Además, se evaluó mediante un ensayo ELISA, la capacidad de las células NK murinas, tras ser tratadas con diversas concentraciones de NPMs, de producir esta citoquina, tras la activación mediante entrecruzamiento con ligandos de diferentes receptores activadores (NKG2D, NK1.1 y NKp46) [235, 236]. No se observaron diferencias significativas en la producción de IFN- γ tras incubación con las NPMs (Fig. R39), por lo que la presencia de NPMs no parece afectar esta



propiedad de las células NK murinas.

Fig. R39. Evaluación de la producción de IFN- γ de las células NK murinas tras su asociación con NPMs. Producción de IFN- γ (medida por un ensayo ELISA) por parte de las células NK murinas después de ser expandidas durante 7 días con IL-2 y tratadas con diferentes concentraciones de NPMs y tras ser expuestas a diversos estímulos. Los datos son representativos de cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN *IN VITRO*

2.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo)

Al igual que las células T, las células NK también circulan de manera continua entre la circulación sanguínea y los diferentes tejidos, por lo que se procedió a estudiar si la retención magnética en un sistema de flujo dinámico era posible en este tipo celular. De la misma manera que en el primer capítulo, se utilizaron diferentes concentraciones de NPMs así como diversas fuerzas magnéticas (**Tabla M1**) y se analizó el desplazamiento de estas células hacia el gradiente magnético al que se encontraban expuestas. Como ocurría con las células T, la retención aumentó en ambos modelos celulares al incrementar la cantidad de NPMs asociadas a las células ($56 \pm 97 \mu\text{m}$ con $100 \mu\text{g Fe/ml}$ vs $124 \pm 236 \mu\text{m}$ con $150 \mu\text{g Fe/ml}$ en células NK-92MI con el imán A y $36 \pm 106 \mu\text{m}$ con $100 \mu\text{g Fe/ml}$ vs $72 \pm 145 \mu\text{m}$ con $150 \mu\text{g Fe/ml}$ en células NK murinas con el imán B) así como la fuerza del gradiente magnético (**Fig. R40.A,B**). En este caso la retención también fue algo mayor en el caso de la línea celular humana NK-92MI en comparación con las células NK murinas ($89 \pm 184 \mu\text{m}$ en células NK-92MI vs $72 \pm 145 \mu\text{m}$ en células NK murinas a la dosis mayor con el imán B) (**Fig. R40.A,B**), a pesar de que la cantidad de hierro asociada a ambas por célula era similar en este caso. Además, un mayor número de células se desplazó al aumentar la dosis y la fuerza del campo, como se puede ver reflejado en el incremento de la desviación estándar.

2.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico)

Tras evaluar la retención magnética de las células NK asociadas a NPMs en presencia de un flujo similar al flujo sanguíneo, se procedió a evaluar la capacidad de estas células de responder a un factor biológico como un gradiente quimiotáctico. De igual manera que en las células T, las células NK también responden a diversas quimioquinas, lo que afecta directamente a su localización tanto durante su desarrollo y maduración como durante una respuesta inmune [237]. En los diferentes ensayos traswell realizados (**Fig. 41.A**), se observó que la presencia de NPMs en las células NK afectaba de manera leve pero no significativa la migración de las mismas en respuesta a un gradiente quimiotáctico ($17.2 \pm 1.9 \%$ de migración en ausencia de NPMs vs $15.4 \pm 1.6 \%$ de migración en presencia de NPMs en las células NK-92MI y $51.6 \pm 14.3 \%$ vs $50.4 \pm 10.5 \%$ de migración en células NK murinas) (**Fig R41.B,C**). Además, la aplicación de un CME en el mismo sentido que en el gradiente quimiotáctico, producía un aumento en la migración de las células asociadas con las NPMs, de manera más notable y significativa en las células NK-92MI ($15.4 \pm 1.6 \%$ vs $19.4 \pm 2.1 \%$ de migración en presencia de NPMs en ausencia y presencia de un CME en las células NK-92MI y $50.4 \pm 10.5 \%$ vs $61.1 \pm 12.7 \%$ de migración en el caso de las células NK murinas) (**Fig. R41.B**).

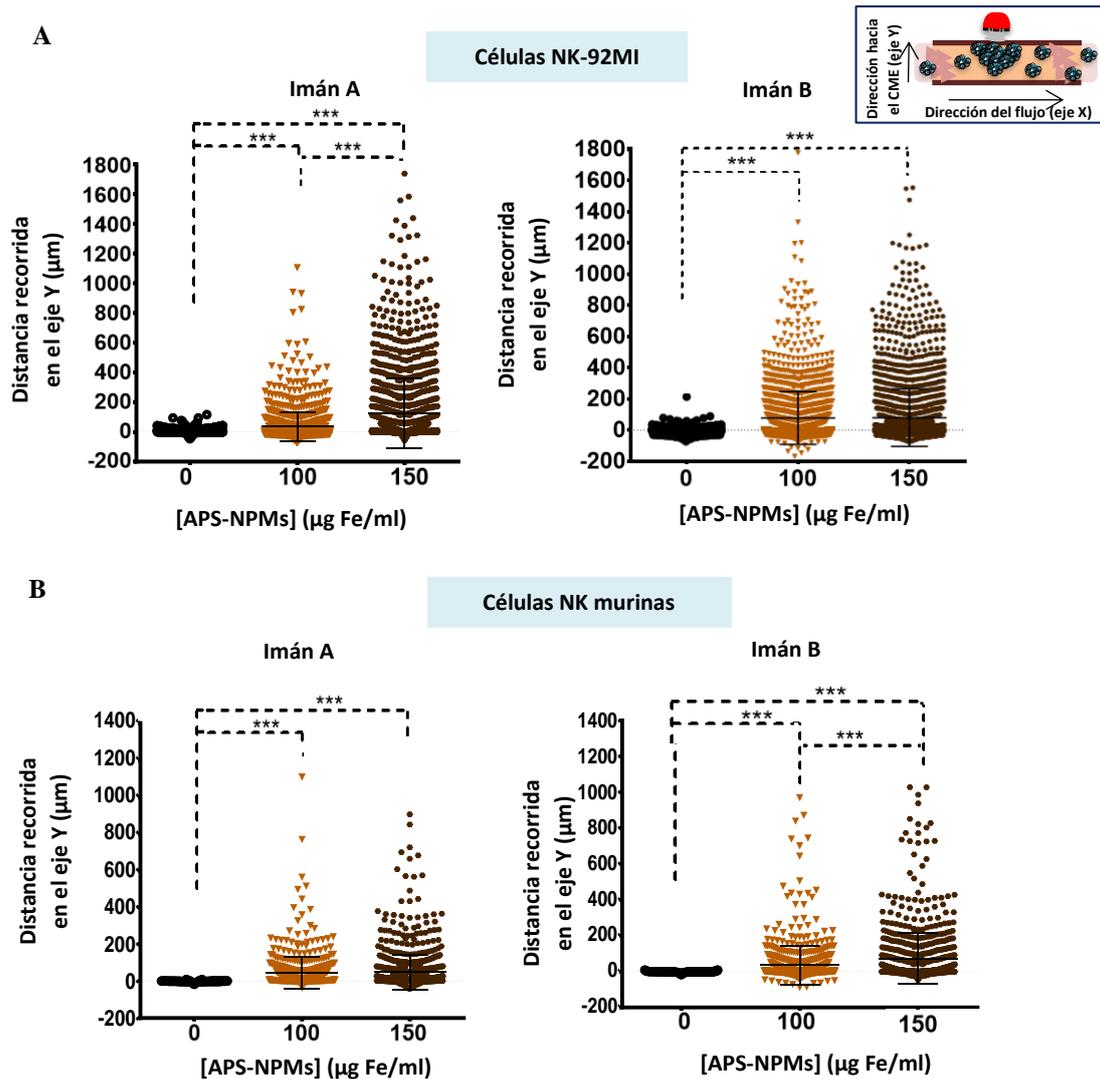


Fig. R40. Retención *in vitro* de los modelos de células NK tras su asociación con NPMs mediante la aplicación de un CME en cámaras de flujo. Desplazamiento en la dirección del gradiente magnético (eje Y) de las **A)** células NK-92MI y de las **B)** células NK murinas tras ser tratadas o no con NPMs y expuestas a diversos CMEs. El desplazamiento celular fue cuantificado mediante el análisis de al menos 100 células por vídeo mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.5. CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS NK MURINAS ASOCIADAS A NPMs SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*

Finalmente, el proceso de reclutamiento de linfocitos juega un papel esencial durante la respuesta inmune a diversos patógenos infecciosos y otras respuestas inflamatorias. Este proceso comprende una compleja cascada de diferentes eventos, comenzando desde la adhesión de las células sobre el endotelio hasta la migración transendotelial [238]. En una serie de ensayos, se evaluó si la presencia de NPMs sobre la superficie de las células NK murinas afectaba a la adhesión de dichas células sobre un endotelio, así como a su capacidad de

transmigración sobre la misma (Fig. R42.A). No se observaron grandes diferencias significativas en la capacidad de adhesión (Fig. R42.B) ni en la capacidad para transmigrar (obteniéndose siempre en torno al 73% de transmigración) (Fig. R42.C). Sí se observó un ligero incremento en la adhesión en presencia de NPMs (16 ± 4 células adheridas /campo en ausencia de NPMs vs 20 ± 7 células adheridas /campo en presencia de la menor dosis de NPMs) (Fig. R42.B), que podría deberse a la presencia de dichas NPMs sobre la superficie, que podrían interactuar a su vez con las células endoteliales.

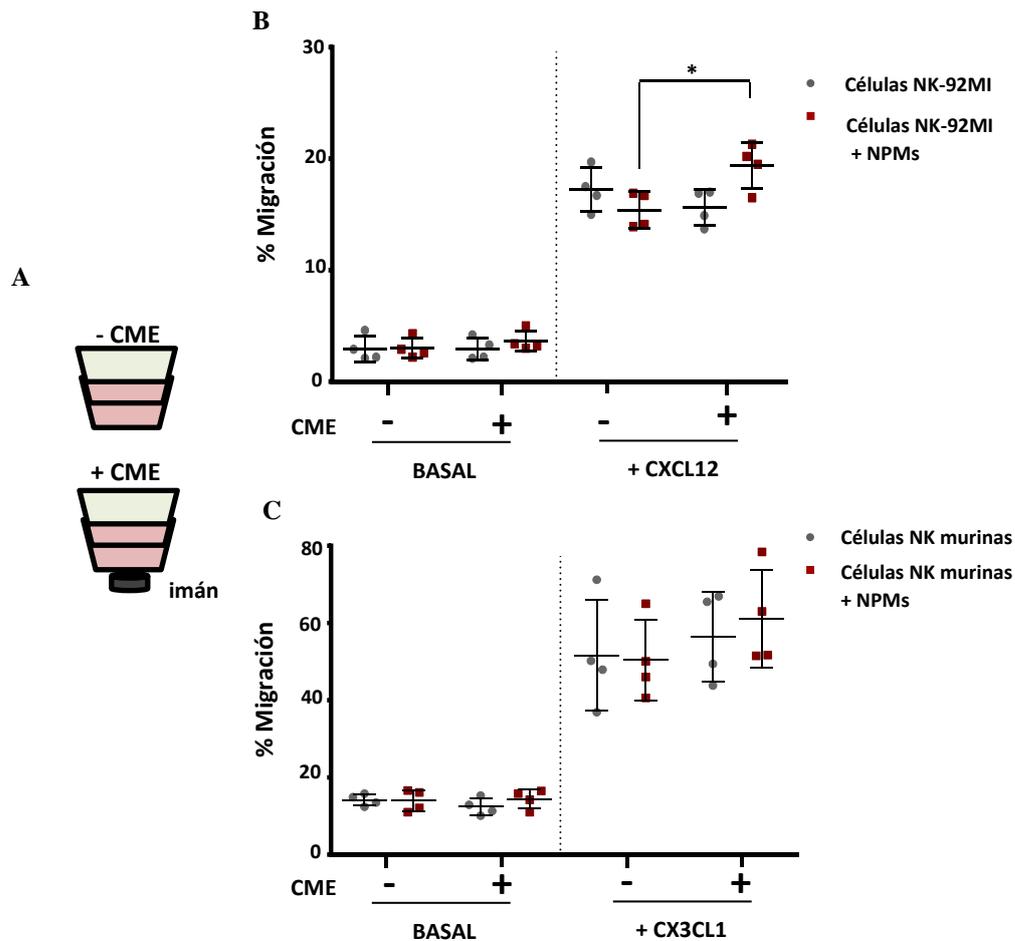


Fig. R41. Análisis de la respuesta quimiotáctica de los modelos de células NK tras la asociación con NPMs. A) Aplicación de un CME en el ensayo transwell. Capacidad migratoria de las **B)** células NK-92MI o **C)** células NK murinas tras el tratamiento con NPMs en respuesta a un gradiente quimiotáctico específico y en presencia o ausencia de un CME en la misma dirección. Los resultados se normalizaron frente a un pocillo control (en ausencia de transwell). Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

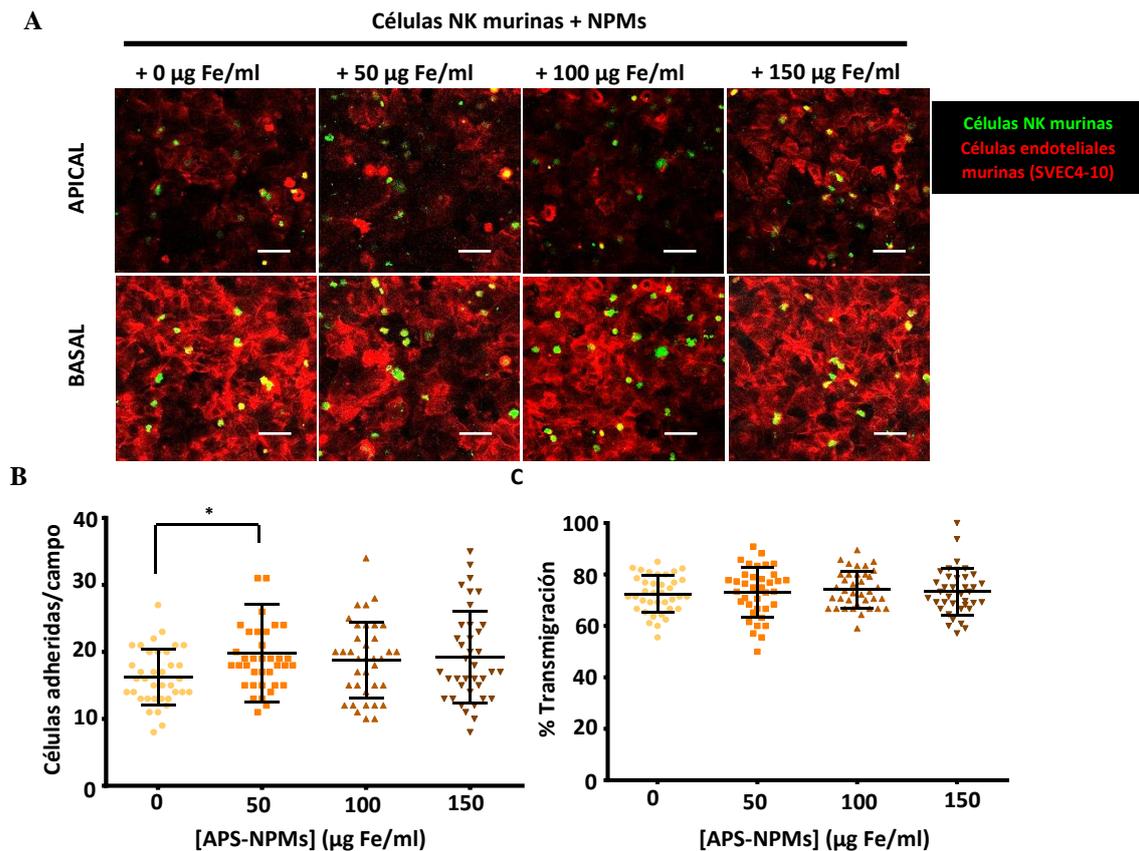


Fig. R42. Adhesión y trans migración de células NK murinas, asociadas o no con NPMs, sobre una monocapa de células endoteliales. **A)** Imágenes representativas de las células NK murinas, tratadas o no con NPMs, migrando sobre una monocapa de células endoteliales murinas (línea celular SVEC-4) adquiridas mediante microscopía confocal. El panel superior representa la parte apical de la monocapa, mientras que el panel inferior representa la parte basal de la misma. (células NK murinas (verde), citoesqueleto en células endoteliales (rojo)). Escala: 50 μm . Cuantificación de **B)** la capacidad de adhesión y **C)** de trans migración de las células NK murinas en presencia de concentraciones crecientes de NPMs sobre células endoteliales murinas. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, analizando al menos 50 campos por condición, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

2.6. PRINCIPALES OBSERVACIONES

Como se ha visto a lo largo de esta segunda parte, la asociación de NPMs con células NK no afecta de manera crucial en los diversos aspectos funcionales evaluados. Las células NK, aún en presencia de NPMs, son capaces de desgranular y producir citoquinas proinflamatorias, de conjugarse con diversas células diana y producir la lisis de las mismas, así como migrar en respuesta a un gradiente quimiotáctico y adherirse a un endotelio. La aplicación de un CME, además, promueve la retención *in vitro* de las células NK asociadas a NPMs, aún en presencia de otros factores como un flujo dinámico. Por tanto, la combinación de NPMs y CMEs podría utilizarse para promover la acumulación específica de células citolíticas, como las células NK que aquí se evalúan, en un modelo *in vivo*, con el fin de mejorar los protocolos de transferencia celular, incrementando el porcentaje de células transferidas en la región de interés.

Como se vio en el capítulo anterior, las NPMs no afectan a la funcionalidad de células linfoides efectoras como las células NK. Con el fin de probar la eficacia *in vivo* de la retención magnética de células citotóxicas asociadas con NPMs, se decidió comenzar utilizando un modelo de tumores que sobreexpresa un antígeno específico, y transferir células T CD8⁺ transgénicas que expresan un receptor específico para dicho antígeno. El modelo de ratón OT-I es un modelo muy utilizado para el estudio de respuestas T a antígenos tumorales [239-242]. Las células T CD8⁺ de los ratones OT-I, como ya se comentó, expresan el TCR transgénico OT-I, que reconoce el péptido SIINFEKL (derivado de OVA), y, por tanto, se activan en presencia de células tumorales que expresen dicho péptido para proceder a su eliminación. El uso de este modelo tumoral, dependiente principalmente de células T CD8⁺ específicas, permitirá determinar si el uso de NPMs y CMEs promueve la retención de estas células en el tumor y, por tanto, si el tratamiento es más eficaz.

Por tanto, durante la tercera y última parte de esta Tesis se evalúa la posibilidad de asociar células T CD8⁺, activadas y específicas de antígeno, a NPMs, con el objetivo de determinar, en una primera aproximación *in vitro*, si las NPMs pudieran servir como una plataforma para mejorar la migración de las células T, totalmente funcionales, hacia una zona de interés. Una vez realizado este primer estudio, se comprobó si este sistema pudiera ser utilizado para mejorar los protocolos de transferencia celular en un modelo tumoral *in vivo*. Para ello, se ha llevado a cabo un análisis sobre la asociación de las NPMs con este tipo de células, así como sobre la funcionalidad de las mismas y su retención magnética, primero en un modelo *in vitro*, y después, *in vivo*, tras la aplicación de un CME.

PARTE 3: EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LAS NPMs SOBRE CÉLULAS T CD8⁺ CITOTÓXICAS Y SU POTENCIAL DE RETENCIÓN MAGNÉTICA *IN VITRO* E *IN VIVO*

3.1. GENERACIÓN DE CÉLULAS T CD8⁺ CITOTÓXICAS ESPECÍFICAS DE ANTÍGENO (OT-I)

3.1.1. Mantenimiento y fenotipaje de la cepa de ratones OT-I

Para llevar a cabo este estudio, se utilizaron células T CD8⁺ procedentes de ratones transgénicos OT-I. Estos ratones fueron previamente fenotipados con el objetivo de mantener y utilizar únicamente aquellos cuyas células expresaban el transgén. Para ello, tras el destete, se llevó a cabo un análisis de muestras de sangre por citometría de flujo. Se analizó, dentro de la población CD90.2⁺, indicativo de células T maduras, la presencia de V α 2 en las células T CD8⁺, específico de este tipo de receptores transgénicos (Fig. R43).

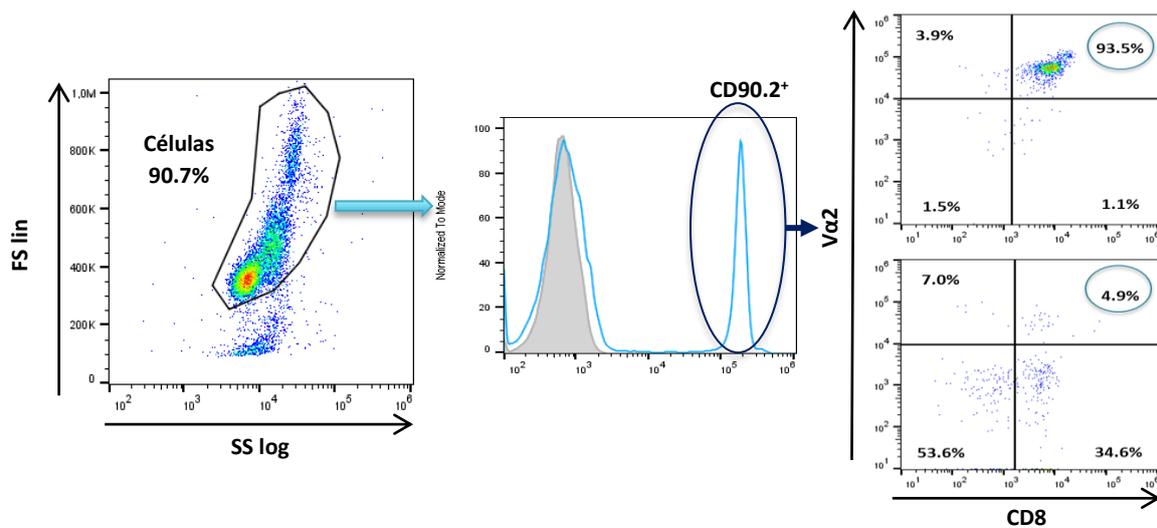


Fig. R43. Fenotipaje de la sangre de los ratones de la cepa transgénica OT-I. Gráficas representativas, obtenidas con el software FlowJo, que muestra, dentro de la población de células T maduras (CD90.2⁺), la presencia de Vα2 en células CD8⁺. El panel superior muestra los resultados obtenidos en un ratón transgénico mientras que el panel inferior muestra los resultados en un ratón que ha perdido el transgén. Histograma gris sombreado: control de isotipo; línea azul: marcaje con el anticuerpo correspondiente.

3.1.2. Aislamiento y expansión de células OT-I

Para la obtención de células OT-I, se procedió al aislamiento y procesamiento de los NLs y el bazo de ratones considerados transgénicos tras el fenotipaje. Después, se activaron por 2 días con el péptido específico de OVA que son capaces de reconocer (OVA₂₅₇₋₂₆₄) y posteriormente, se expandieron con IL-2. El porcentaje de células CD8⁺, así como su perfil de activación basado en la expresión de marcadores como CD69 y CD25, se comprobó por citometría de flujo a día 0 y a día 5, justo antes de su uso en los diferentes experimentos (Fig. R44.A,B). Además, se pudo comprobar la especificidad para el antígeno de estas expansiones con los mismos cultivos en ausencia de los estímulos de activación o expansión (Fig. R44.C).

3.2. INTERACCIÓN DE LAS NPMs CON LAS CÉLULAS OT-I

3.2.1. Evaluación de la toxicidad en las células OT-I y cuantificación del hierro asociado

En primer lugar, se realizó un primer estudio para determinar la toxicidad de las diversas NPMs, así como la cantidad de las mismas asociadas a las células OT-I. La toxicidad se evaluó mediante el ensayo AlamarBlue y el estudio por citometría de flujo de anexina/PI. El primer ensayo mostró que las NPMs no eran tóxicas para estas células en las dosis estudiadas. (Fig. R45.A). En este caso no se encontró un aumento en la señal de fluorescencia y, por tanto, en el metabolismo mitocondrial, como en el caso de los modelos de células T primarias (Fig. R4.A,B) y en la línea celular NK-92MI (Fig. R25.A).

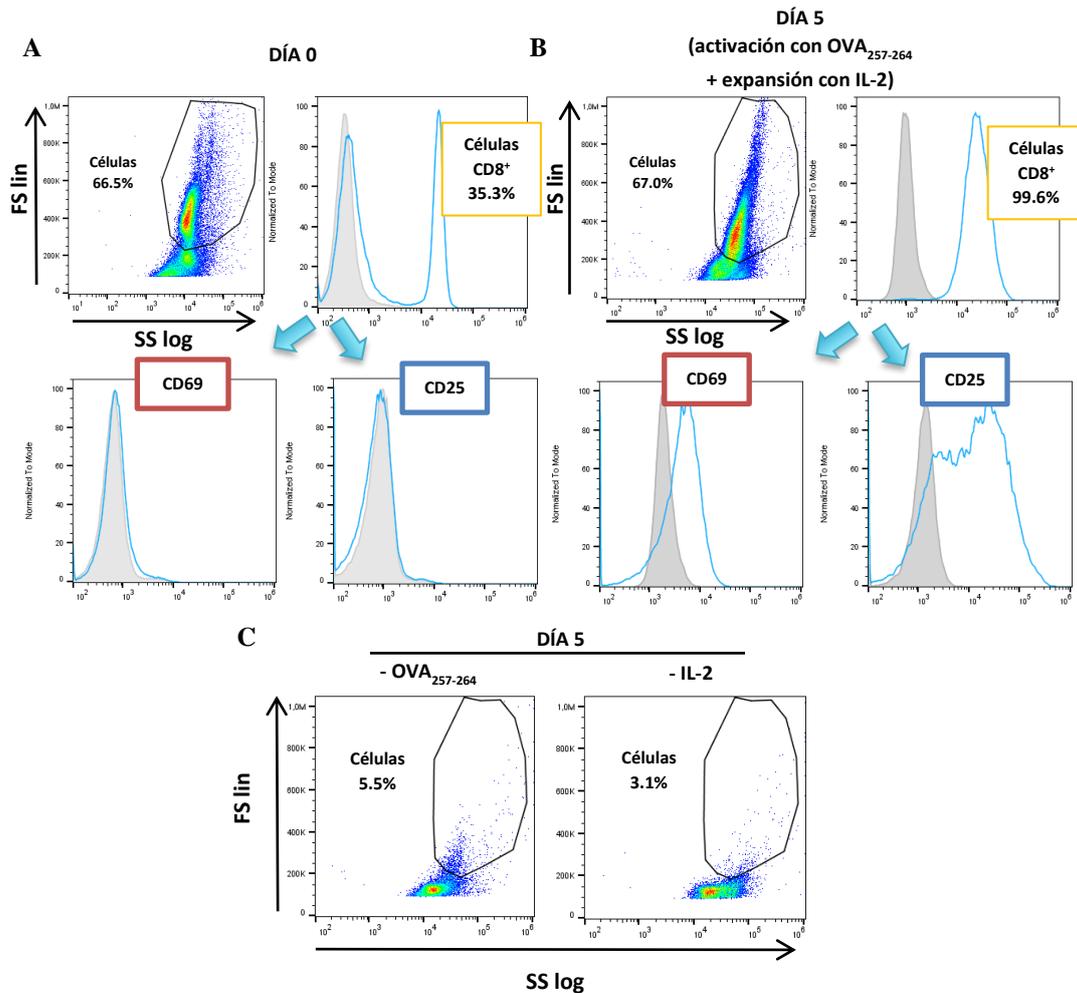


Fig. R44. Purificación y expansión de las células OT-I. Gráficas representativas, obtenidas con el software FlowJo, de las diferentes poblaciones obtenidas **A)** a día 0, tras el procesamiento de bazo y NLS, y **B)** a día 5, tras su activación con OVA₂₅₇₋₂₆₄ y posterior expansión con IL-2. En ambos casos se muestra el porcentaje de células CD8⁺ y su perfil de activación, mediante los marcadores de superficie CD69 y CD25. Histograma gris sombreado: control de isotipo; línea azul: marcaje con el anticuerpo correspondiente. **C)** Gráficas representativas del cultivo, a día 5, en ausencia de los estímulos: OVA₂₅₇₋₂₆₄ o IL-2.

El análisis de apoptosis/necrosis por citometría de flujo no mostró cambios significativos importantes cuando las células fueron incubadas con las diferentes NPMs, ya que no se encontraron cambios en la proporción de células apoptóticas o necróticas en las diversas dosis utilizadas (**Fig R45.B**). Tras estos estudios se concluyó que las NPMs utilizadas en este trabajo tampoco causan una toxicidad significativa importante a las concentraciones usadas en células T CD8⁺ citotóxicas.

Posteriormente, se evaluó también la cantidad de NPMs que se asocia a este tipo celular. En los capítulos anteriores pudimos observar que las NPMs recubiertas de APS (APS-NPMs) eran las que se asociaban en mayor medida con ambos tipos de células T y NK. Los análisis obtenidos mediante ICP-OES tras la incubación de estas células con las NPMs, confirmaron que las APS-

NPMs daban lugar a una detección de hierro mayor en las muestras celulares analizadas (13.7 ± 4.5 pg Fe/célula usando APS-NPMs frente a 4.0 ± 0.7 y 2.5 ± 0.5 pg Fe/célula con DMSA-NPMs y DEXT-NPMs respectivamente) (Fig. R45.C). El resultado fue muy parecido al obtenido en las células Jurkat (Fig. R6.A) y en los modelos de células NK (Fig. R26). De esta manera, seleccionamos las mismas NPMs (APS-NPMs) que en los casos anteriores para seguir el estudio.

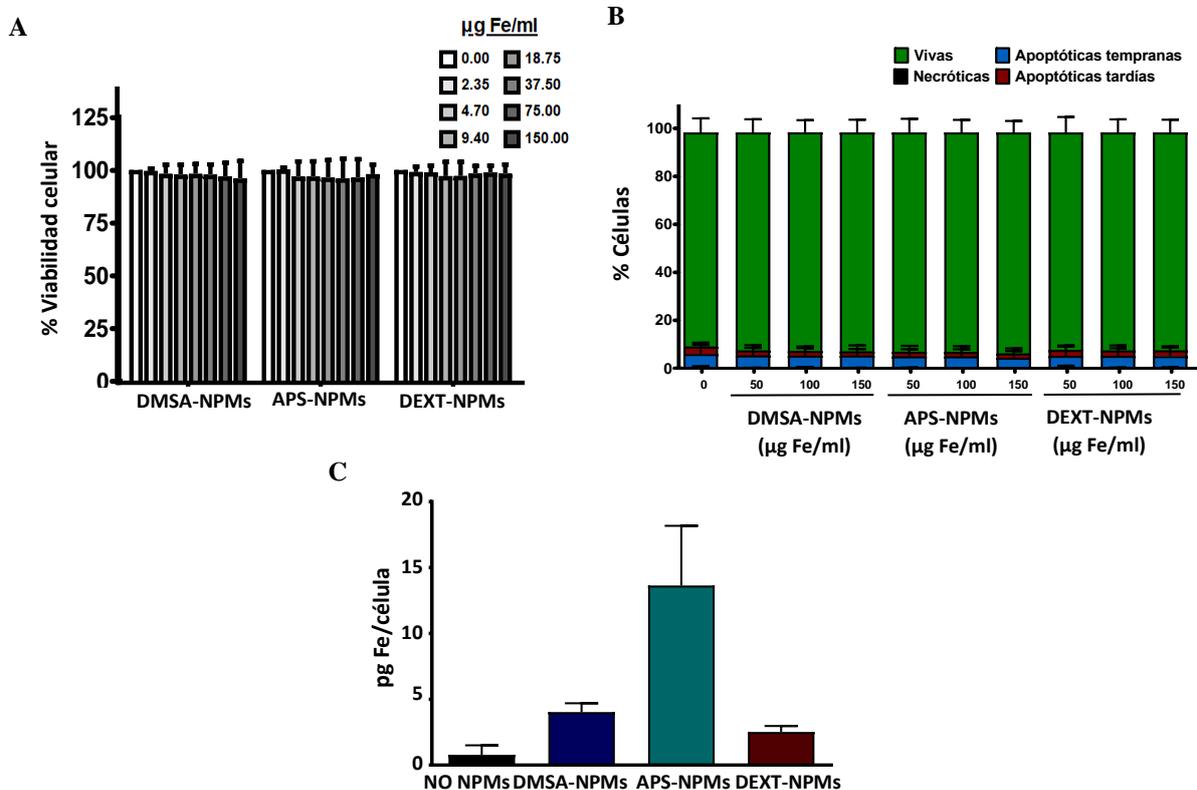


Fig. R45. Evaluación de la toxicidad y cuantificación de la captación de las NPMs recubiertas en las células OT-I. **A)** Viabilidad celular de las células OT-I después del tratamiento con NPMs, medido mediante el ensayo fluorimétrico AlamarBlue. **B)** Análisis mediante citometría de flujo de la formación de células apoptóticas o necróticas tras la incubación con NPMs en las células OT-I, a través de la tinción de Anexina V/PI. **C)** Cuantificación del hierro asociado a las células OT-I tras la incubación con las diferentes NPMs, mediante ICP-OES. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes en todos los análisis, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.2.2. Estudio sobre la localización subcelular de las NPMs en las células OT-I

A continuación, se analizó la localización en las células de estas NPMs, mediante las diversas aproximaciones en microscopía ya utilizadas previamente. La tinción de Azul de Prusia y la microscopía confocal, al igual que en las células T primarias o NK, mostraron que las NPMs se quedaban asociadas a la membrana plasmática (Fig. R46.A,B). Un estudio más en detalle se llevó a cabo a través de la microscopía electrónica de transmisión. De igual manera se observó cómo las NPMs permanecían asociadas en la superficie de las células (Fig. R46.C).

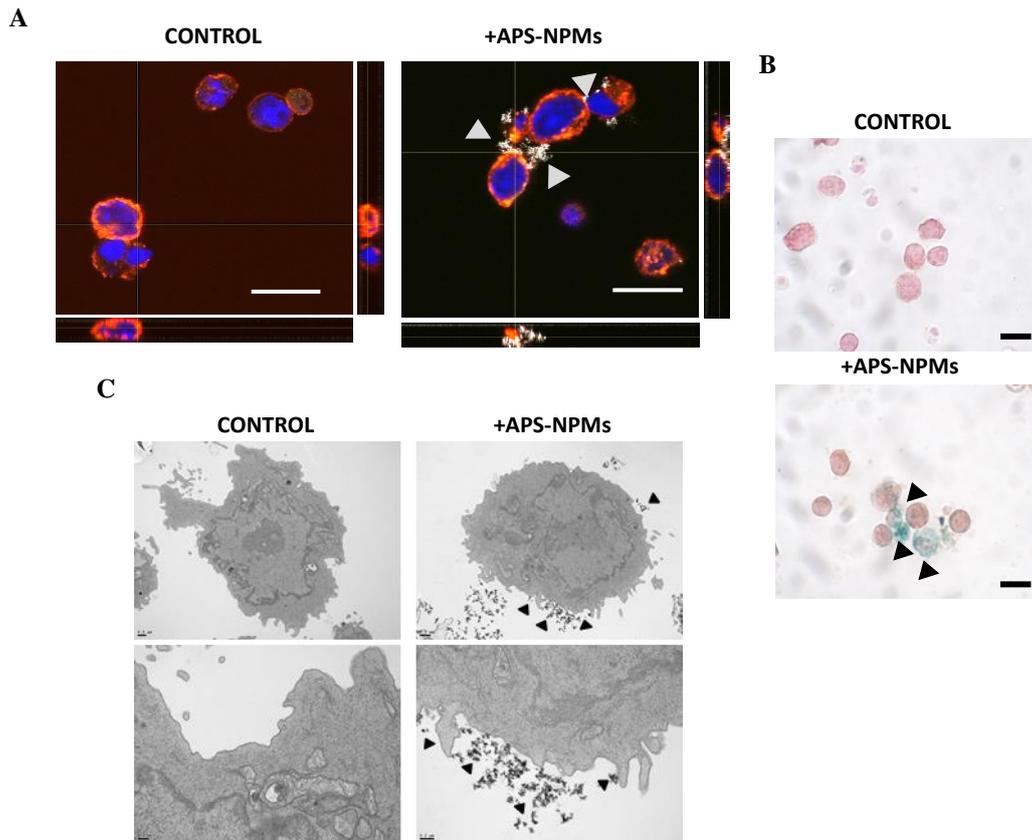


Fig. R46. Localización subcelular de las NPMs en las células OT-I. **A)** Imágenes representativas de las células OT-I tras el tratamiento con APS-NPMs adquiridas por microscopía confocal (membrana celular (rojo), NPMs (gris) y núcleo (azul)) (escala = 10 μ m). Las proyecciones ortogonales se compusieron mediante el software ImageJ. **B)** Tinción de Azul de Prusia y contratinción en rojo neutro de las células OT-I tras su asociación con las NPMs. (escala = 10 μ m). **C)** Imágenes representativas obtenidas por TEM de las células OT-I tras el tratamiento con las NPMs. Los paneles superiores ofrecen una visión global de la célula, mientras que los paneles inferiores muestran en mayor detalle regiones celulares para ilustrar mejor las interacciones entre las NPMs y la membrana celular. Las flechas indican la presencia de NPMs asociadas a las células.

Los resultados obtenidos tras la evaluación de la toxicidad de las NPMs, así como el grado de asociación de las NPMs con las células OT-I, y la interacción de las mismas con la membrana celular, muestra que no existen diferencias significativas entre los diferentes tipos de células linfoides utilizados a lo largo de esta tesis.

3.2.3. Análisis fenotípico de las células OT-I tras su asociación con NPMs

Una vez analizada la capacidad de estas células para asociarse con las NPMs, así como la localización subcelular de las mismas, se analizó la expresión de algunos marcadores de superficie de estas células tras el tratamiento con las NPMs. Se analizaron marcadores de activación temprana y tardía tales como CD69, CD27, CD44 y CD25 y moléculas de adhesión y memoria CD11a, CD62L y CD127. Como se observa en la **Fig. R47.A,B**, no se detectaron grandes diferencias significativas en la expresión de los diferentes marcadores analizados.

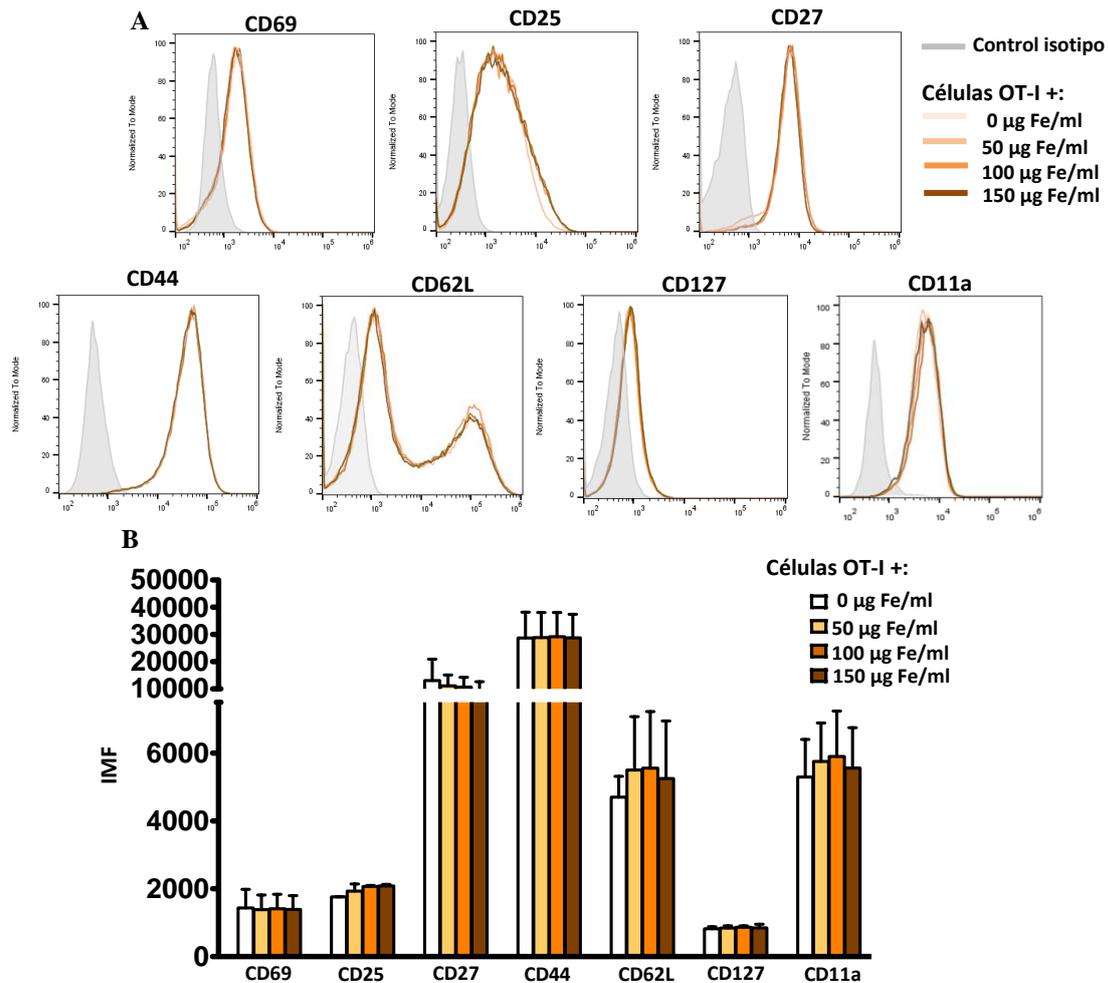


Fig. R47. Análisis fenotípico de las células OT-I tras su asociación con las NPMs. **A)** Histogramas representativos y **B)** cuantificación (IMF, intensidad media de fluorescencia) de la expresión de marcadores de superficie relevante en las células OT-I, tras la incubación con NPMs. Estos resultados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.3. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD *IN VITRO* DE LAS CÉLULAS OT-I TRAS SU ASOCIACIÓN CON NPMs

3.3.1. Capacidad de conjugación y desgranulación

Una vez comprobado que el fenotipo efector de estas células no se ve afectado por la presencia de las NPMs, y con el objetivo de evaluar si su funcionalidad no se veía alterada tras su asociación con las NPMs, se llevaron a cabo, en primer lugar, experimentos de conjugación con la línea celular EG7-OVA, la cual puede ser reconocida por las células OT-I por expresar el péptido de OVA específico en su superficie. En la **Fig. R48.A,B** se observa la cinética de conjugación entre las células OT-I y su diana EG7-OVA. No se detectaron diferencias significativas entre la conjugación obtenida entre las células OT-I libres de NPMs o asociadas con diferentes concentraciones de APS-NPMs ($9.1 \pm 5.2\%$ vs $7.2 \pm 2.3\%$ de conjugación en ausencia o presencia

de la dosis más alta de NPMs respectivamente a tiempos cortos, y $38.4 \pm 13.2\%$ vs $36.1 \pm 11.3\%$ a tiempos largos).

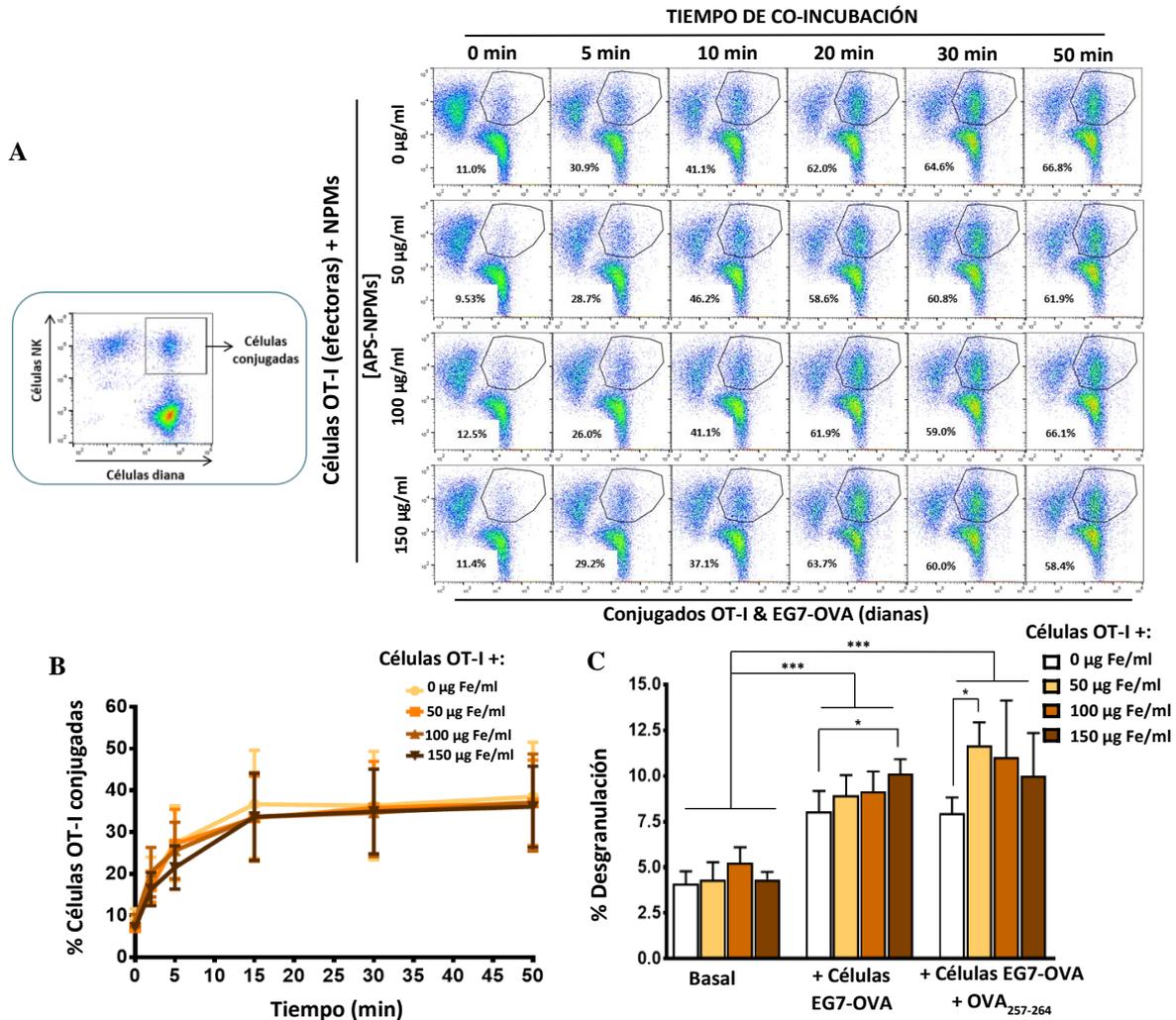


Fig. R48. Evaluación de la capacidad de conjugación y desgranulación de las células OT-I tras su asociación con NPMs. **A)** Dotplots representativos de la cinética de conjugación de las células OT-I, tras ser incubadas con diferentes concentraciones de APS-NPMs, con la línea celular EG7-OVA, en proporción 1:1 (célula efectora : célula diana). **B)** Cinética de conjugación de las células OT-I, tras ser tratadas con NPMs, con la línea celular EG7-OVA, co-incubadas en proporción 1:1. **C)** Capacidad de desgranulación de las células OT-I, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, tras ser expuestas a diversos estímulos. Los datos (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Después, se analizó la capacidad de desgranulación de las células OT-I tras su activación, tanto por la presencia de las células EG7-OVA solas o en combinación de éstas junto con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ soluble. Como ya se comentó en el capítulo anterior, la expresión de CD107a se correlaciona con la secreción de citoquinas y la lisis mediada por las células citolíticas, por lo que el análisis de este marcador se utiliza como indicador de la capacidad citolítica [234]. Tras la estimulación con las células EG7-OVA, o con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ en forma soluble en combinación con las células EG7-OVA, se evaluó la presencia de este marcador en las células OT-

l asociadas a concentraciones crecientes de APS-NPMs. Se observó que la desgranulación basal de estas células no se veía alterada de manera significativa debido a la presencia de las NPMs, aunque sí se encontró un ligero aumento en la desgranulación de las células OT-I tras los diferentes estímulos específicos en algunas condiciones de incubación con las NPMs (8.0 ± 1.1 % en ausencia de NPMs vs 10.1 ± 0.8 % en presencia de la mayor dosis de NPMs tras la estimulación con células EG7-OVA y 7.9 ± 0.9 % en ausencia de NPMs vs 11.7 ± 1.2 % en presencia de la menor dosis de NPMs tras la estimulación conjunta con células EG7-OVA y el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄) (Fig. R48.C).

3.3.2. Capacidad citotóxica frente a células diana

Posteriormente, se evaluó si la asociación de las NPMs con las células OT-I producía alteraciones en la capacidad citolítica de las mismas. Para ello, se analizó el porcentaje de células EG7-OVA lisadas en diferentes ratios entre las células efectoras (células OT-I) y las células diana (EG7-OVA). No se observó ninguna diferencia significativa en el porcentaje de células lisadas por parte de las células OT-I tras su asociación con concentraciones crecientes de NPMs, en los diferentes escenarios evaluados (17.6 ± 5.5 % vs 17.0 ± 2.0 % de lisis en ausencia o presencia de la dosis más alta de NPMs respectivamente a ratios menores, y 47.0 ± 12.2 % vs 41.8 ± 8.7 % a ratios mayores) (Fig. R49.A,B). De esta manera, se comprueba que, al igual que en el caso de las células NK, la presencia de NPMs no afecta a la capacidad lítica de las células OT-I.

3.3.3. Capacidad de producción de IFN- γ tras su exposición a diferentes estímulos

Como ya se comentó, otro aspecto esencial en la funcionalidad de células citolíticas es la capacidad para producir citoquinas proinflamatorias como IFN- γ . Por ello, se evaluó por citometría de flujo, la capacidad de las células OT-I, tras ser tratadas con diversas concentraciones de NPMs, de producir esta citoquina, tras su activación con diferentes estímulos, tanto inespecíficos (PMA/ionomicina) como específicos (células EG7-OVA en combinación con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄) (Fig.50.A). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células capaz de producir IFN- γ (Fig. R50.B) ni en la capacidad de producción de la misma (IMF) (Fig. R50.C), por lo que la presencia de NPMs no parece afectar esta función en las células OT-I.

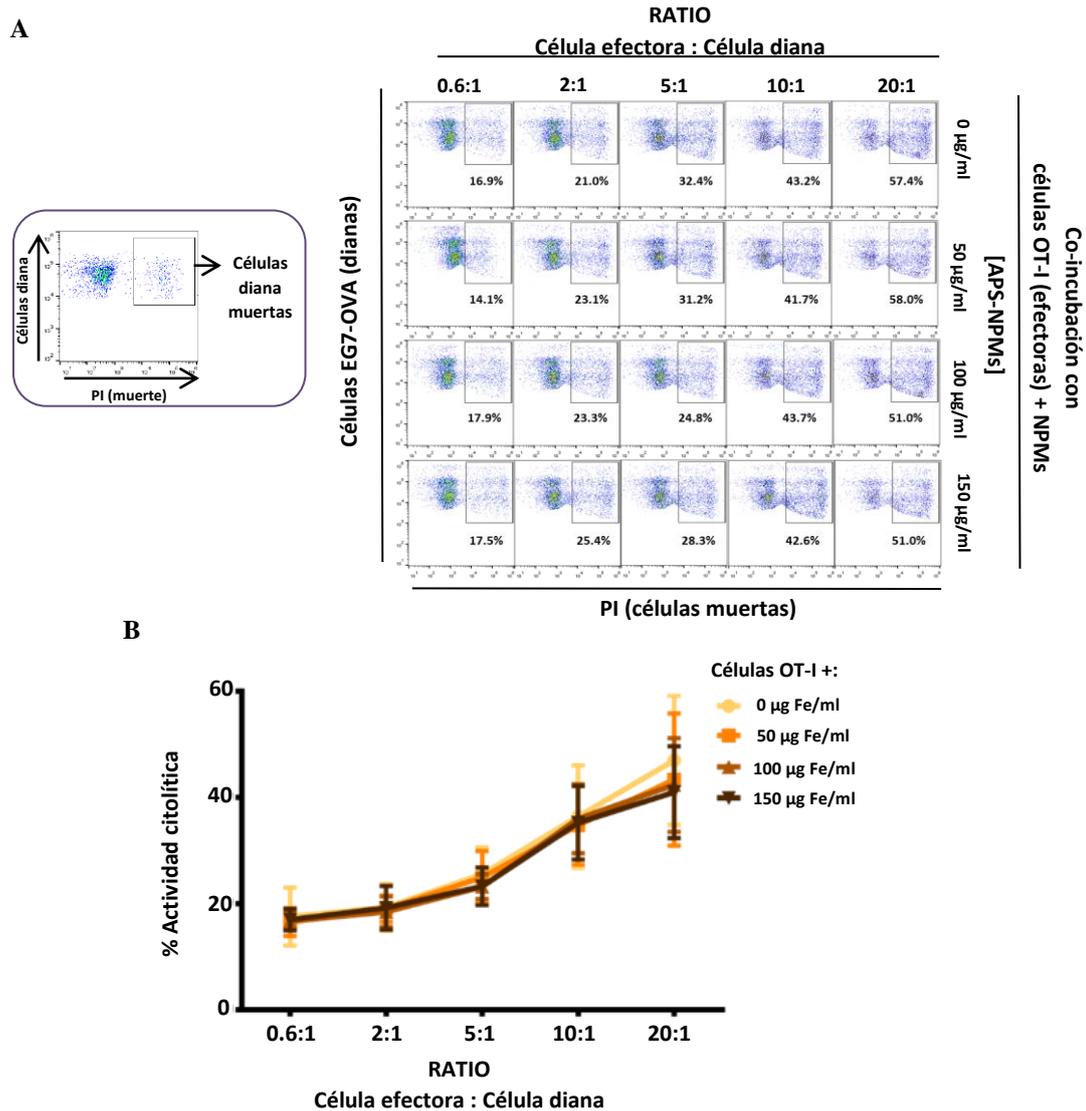


Fig. R49. Evaluación de la actividad citotóxica de las células OT-I tras su asociación con NPMs. **A)** Dotplots representativos de la capacidad citotóxica de las células OT-I, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente la línea celular EG7-OVA, co-incubadas en diferentes proporciones durante 5 h. **B)** Actividad citolítica de las células OT-I, tras ser tratadas con diferentes concentraciones de NPMs, frente a la línea celular EG7-OVA, co-incubadas en diversas proporciones durante 5 h. Los datos (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4. MIGRACIÓN Y RETENCIÓN *IN VITRO*

3.4.1. Retención en presencia de factores físicos (fuerzas de flujo)

Al igual que en las células T primarias y las células NK, se evaluó la capacidad de retención magnética de las células OT-I asociadas a NPMs en un sistema de flujo dinámico, mediante el uso de diferentes fuerzas magnéticas (Tabla M1). El desplazamiento de las células OT-I hacia el CME obtenido en este sistema fue muy similar al obtenido en los casos anteriores con las células T primarias (Fig. R12) y las células NK (Fig. R40). La retención magnética, como en los casos anteriores, aumentó con el incremento de las NPMs asociadas ($28 \pm 80 \mu\text{m}$ con $100 \mu\text{g Fe/ml}$ vs

69 ± 134 μm con 150 μg Fe/ml utilizando el imán A), así como con el aumento de la fuerza del gradiente magnético (69 ± 134 μm con el imán A vs 90 ± 188 μm con el imán B, en ambos casos con la dosis mayor de NPMs) (Fig. R51). El incremento en la desviación estándar es también un reflejo del aumento en el número de células afectadas por el CME y que se desplazan en mayor o menor medida hacia él. Este estudio corrobora el hecho de que un CME es capaz de promover la retención *in vitro* de células linfoides asociadas a NPMs en presencia de fuerzas de flujo similares a las presentes en los capilares sanguíneos.

A

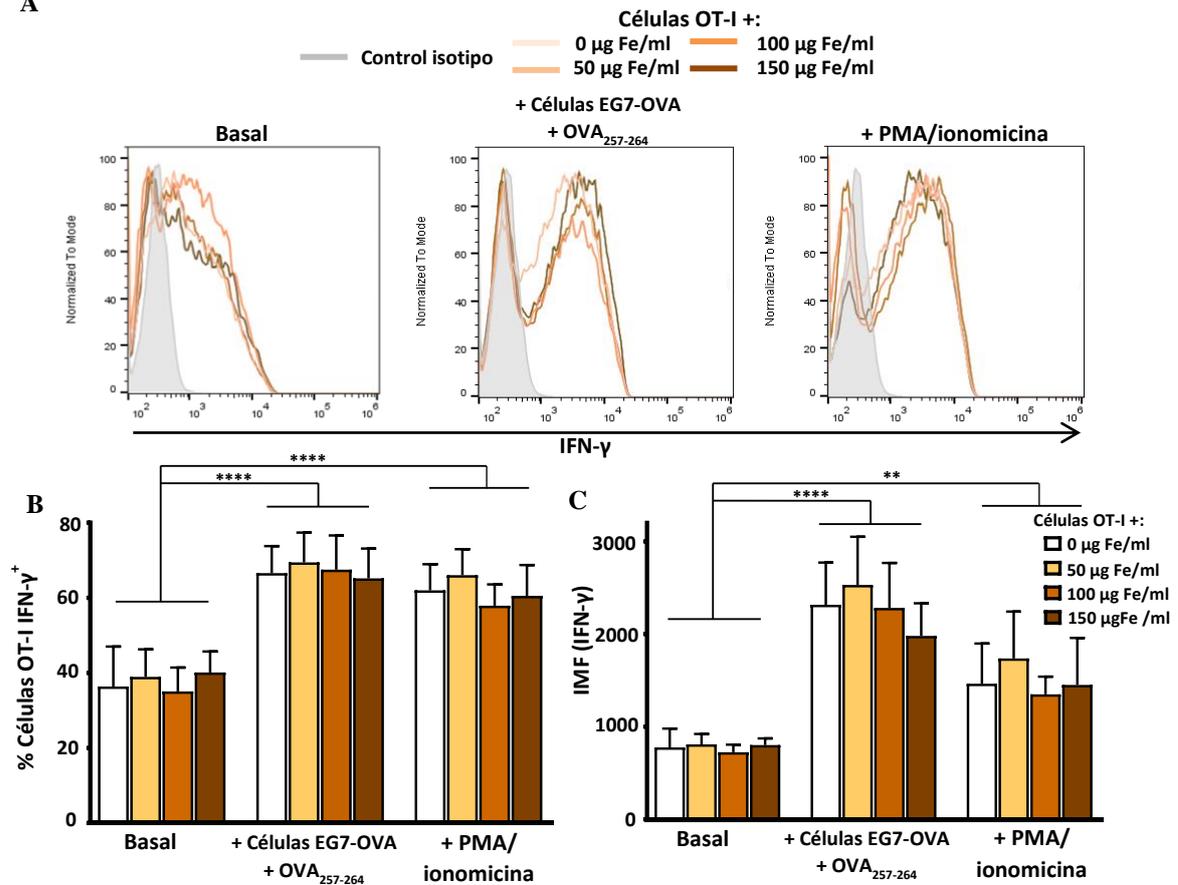


Fig. R50. Evaluación de la producción de IFN-γ de las células OT-I tras su asociación con NPMs. A) Histogramas representativos de la expresión de IFN-γ intracelular en las células OT-I, tras su asociación con diferentes concentraciones de NPMs y activación mediante diferentes estímulos. **B)** Cuantificación del porcentaje de células OT-I positivas para IFN-γ y **C)** de la IMF de dichas células. Los datos (media ± DE) son representativos de cuatro experimentos independientes, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

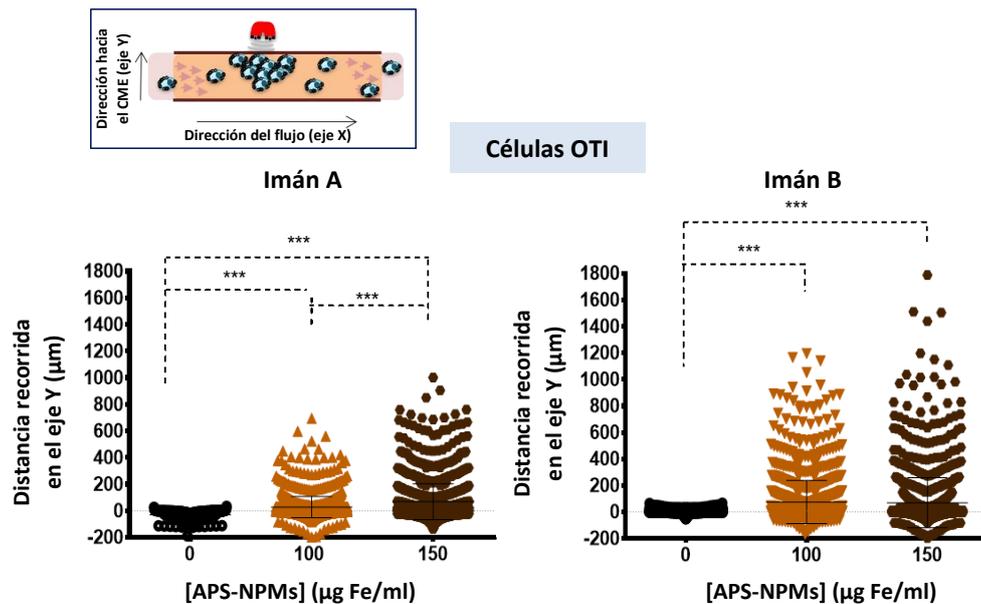


Fig. R51. Retención *in vitro* de las células OT-I tras su asociación con NPMs mediante la aplicación de un CME en cámaras de flujo. Desplazamiento en la dirección del gradiente magnético (eje Y) de las células OT-I tras ser tratadas o no con NPMs y expuestas a diversos CMEs. El desplazamiento celular fue cuantificado mediante el análisis de al menos 100 células por vídeo mediante el software Imaris. Los resultados mostrados (media \pm DE) son representativos de tres experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3.4.2. Retención en presencia de factores biológicos (gradiente quimiotáctico)

Posteriormente, se evaluó la capacidad de las células OT-I de migrar en respuesta a un gradiente quimiotáctico. Al igual que en el resto de los ensayos transwell realizados en células T primarias (Figs. R13, R41), se observó que la presencia de NPMs en las células OT-I afectaba de manera leve pero no significativa la migración de las mismas en respuesta a un gradiente quimiotáctico ($44.4 \pm 5.0\%$ vs $40.9 \pm 4.9\%$ de migración en ausencia o presencia de NPMs respectivamente) (Fig. R52). Además, la aplicación de un CME en el mismo sentido que en el gradiente quimiotáctico, parece producir un aumento, aunque no significativo, en la migración de las células asociadas con las NPMs ($40.9 \pm 4.9\%$ vs $52.3 \pm 4.7\%$ de migración de las células asociadas a NPMs en ausencia o presencia de un CME) (Fig. R52).

3.5. CAPACIDAD DE ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS OT-I ASOCIADAS A NPMs SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES *IN VITRO*

Finalmente, se evaluó si la presencia de NPMs sobre la superficie de las células OT-I afectaba a la adhesión de dichas células sobre un endotelio, así como a su capacidad de transmigración (Fig. R53.A). Al igual que en el estudio en células NK (Fig. R42), no se observaron grandes diferencias significativas ni en la capacidad de adhesión (siempre se encontraron en torno a 60 células adheridas/campo) (Fig. R53.B) ni en la capacidad para transmigrar (siempre en torno al 75-80%) (Fig. R53.C) de las células OT-I asociadas a concentraciones crecientes de NPMs.

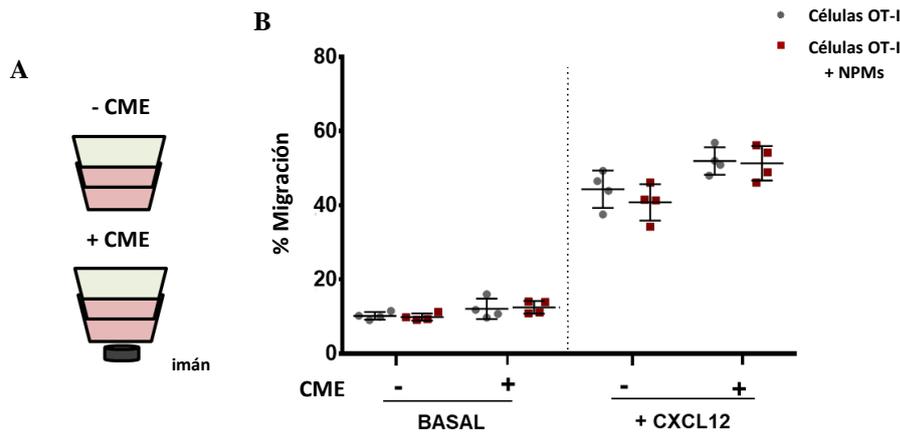


Fig. R52. Análisis de la respuesta quimiotáctica de las células OT-I tras la asociación con NPMs. A) Aplicación de un CME en el ensayo transwell. **B)** Capacidad migratoria de las células OT-I tras

el tratamiento con NPMs en respuesta a un gradiente quimiotáctico específico y en presencia o ausencia de un CME en la misma dirección. Los resultados se normalizaron frente a un pocillo control (en ausencia de transwell). Los resultados mostrados (media ± DE) son representativos de cuatro experimentos independientes, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

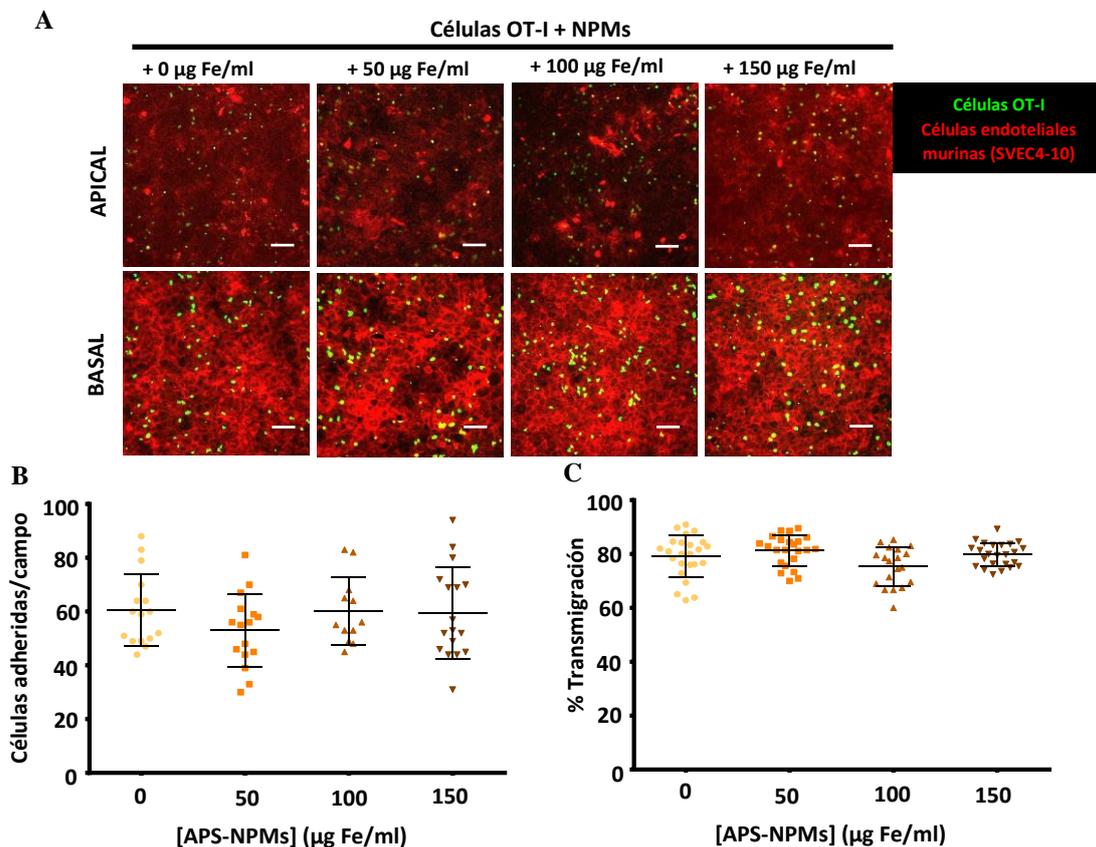


Fig. R53. Adhesión y trans migración de células OT-I, asociadas o no con NPMs, sobre una monocapa de células endoteliales. A) Imágenes representativas de las células OT-I, tratadas o no con NPMs, migrando sobre una monocapa de células endoteliales murinas (línea celular SVEC-4) adquiridas mediante microscopía confocal. El panel superior representa la parte apical de la monocapa, mientras que el panel inferior representa la parte basal de la misma (células OT-I (verde), citoesqueleto en células endoteliales (rojo)). Escala: 100 μm . Cuantificación de **B)** la capacidad de adhesión y **C)** de trans migración de las células OT-I en presencia de concentraciones crecientes de NPMs sobre células endoteliales murinas. Los resultados mostrados (media ± DE) son representativos de tres experimentos independientes, analizando al menos 50 campos por condición, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Como se ha visto a lo largo de este primer conjunto de ensayos *in vitro*, la asociación de NPMs con las células OT-I no afecta de manera crucial la funcionalidad de las mismas. Las células OT-I, aún en presencia de NPMs, son capaces de desgranular y producir IFN- γ tras diversos estímulos, de conjugarse con células que expresan un péptido específico y producir la lisis de las mismas, así como de migrar en respuesta a un gradiente quimiotáctico y de adherirse a un endotelio. La aplicación de un CME, además, promueve la retención *in vitro* de estas células asociadas a NPMs en presencia de un flujo dinámico. Por tanto, la combinación de NPMs y CMEs será evaluada a continuación para determinar si este sistema podría utilizarse para promover la acumulación específica de estas células citolíticas en un modelo *in vivo*, con el fin de optimizar los protocolos de transferencia celular.

3.6. TRANSFERENCIA DE CÉLULAS OT-I ASOCIADAS CON NPMs EN PRESENCIA DE UN CME EN UN MODELO TUMORAL SINGÉNICO

Con el fin de evaluar la eficacia del uso combinado de NPMs y CMEs en la transferencia de células con actividad antitumoral para el tratamiento de cáncer, se eligió un modelo animal para la aplicación del tratamiento *in vivo*. Los modelos murinos son los más utilizados en inmunología, debido a que la estructura general de su sistema inmune es similar al del ser humano [243]. Se eligió un modelo basado en la inyección subcutánea de una línea tumoral singénica en ratones inmunocompetentes de fondo genético C57BL/6, para así, potenciar la respuesta inmune antitumoral. Además, se escogió la línea celular EG7-OVA, usada previamente en los ensayos *in vitro*, debido a que este tipo de celular, al expresar en su superficie el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, puede ser fácilmente reconocido y, por tanto, eliminado por las células OT-I. Este modelo, por tanto, podría indicarnos si es posible el aumento en el número de células OT-I en la región del tumor debido a la posible retención magnética que podría obtenerse al usar un CME en la zona tumoral para promover la acumulación de las células OT-I asociadas a NPMs.

3.6.1. Generación de un modelo tumoral singénico

Para la generación del modelo tumoral singénico, se inocularon diferentes concentraciones de células de origen murino EG7-OVA, en el flanco de ratones C57BL/6. Se procedió al seguimiento del crecimiento de los tumores (Fig. R54.A), así como del peso de los ratones a lo largo del tiempo (Fig. R54.B). Las concentraciones más altas (1.0 y 3.0 x 10⁶ células/ratón) produjeron tumores de gran tamaño de manera muy rápida, mientras que la concentración más baja (0.5 x 10⁶ células/ratón) produjo tumores de crecimiento más lento y controlado (Fig. R54.A), por lo que se decidió utilizar esta última concentración para la generación de los tumores que

posteriormente se tratarán mediante transferencia celular. El peso de los ratones no se vio alterado en ninguno de los casos (Fig. R54.B).

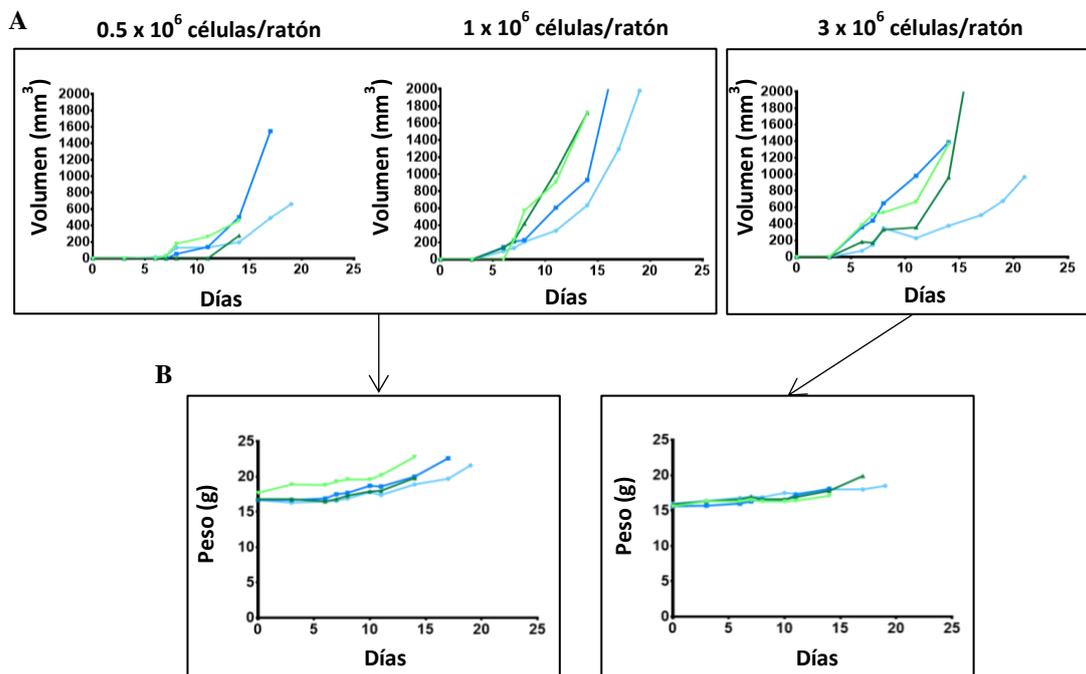


Fig. R54. Evolución del tamaño tumoral y del peso de los ratones tras la inoculación de diferentes concentraciones de células tumorales en el flanco de los ratones. Evolución A) del volumen tumoral y B) del peso de los ratones durante los 20 días tras la inoculación de las células tumorales. Cada línea representa un ratón individual.

3.6.2. Transferencia celular

Una vez establecidos los tumores adecuados mediante la inyección subcutánea de las células EG7-OVA (0.5×10^6 células/ratón), se llevó a cabo la administración intravenosa de los diferentes tratamientos. Los ratones se aleatorizaron en 4 grupos, que recibieron una inoculación de PBS como control, de células OT-I, de células OT-I tratadas con NPMs o de células OT-I tratadas con NPMs junto con la aplicación de un CME sobre la región del tumor durante aproximadamente 90 min. El tamaño tumoral, así como el peso de los diferentes ratones, se monitorizó durante las dos semanas posteriores al tratamiento (Fig. R55.A,B). El grupo control, tratado únicamente con PBS, fue el que presentó el mayor crecimiento tumoral ($1744 \pm 63 \text{ mm}^3$), mientras que los grupos tratados sólo con células OT-I o con células OT-I asociadas a NPMs, presentaron un crecimiento tumoral más reducido ($662 \pm 391 \text{ mm}^3$ y $590 \pm 315 \text{ mm}^3$ respectivamente). El grupo inoculado con células OT-I tratadas con NPMs y expuesto al CME presentó un crecimiento intermedio ($1200 \pm 337 \text{ mm}^3$) (Fig. R55.A). Además, las diferencias comenzaron a ser altamente significativas a partir del día 10 después del tratamiento. El peso de los ratones no sufrió alteraciones en ninguno de los grupos, ya que siempre se mantuvo entre los 18 y 21 gramos (Fig. R55.B). Tras los 14 días de seguimiento, se procedió al sacrificio de los ratones, así como a la

extracción de los tumores (Fig. R55.C), los bazo y los NLS proximales y distales al tumor, para su posterior análisis.

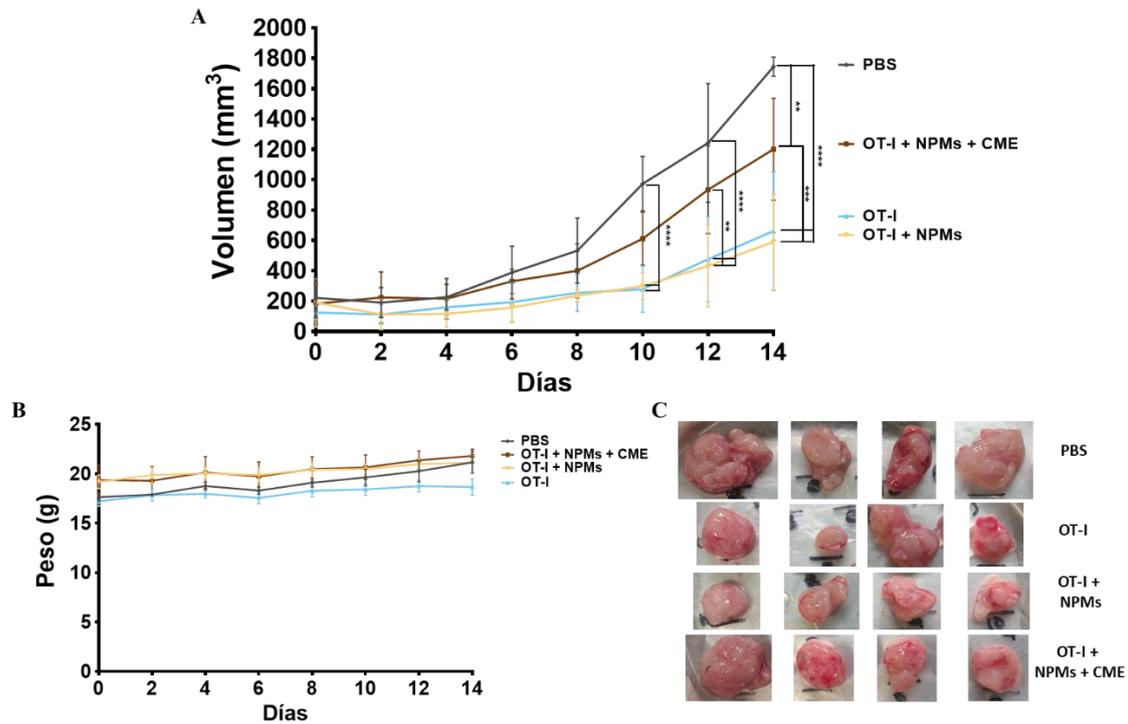


Fig. R55. Evolución del tamaño tumoral y del peso de los ratones tras la aplicación de los diferentes tratamientos. A) Evolución del volumen tumoral y **B)** del peso de los ratones durante los 14 días posteriores al inicio del tratamiento de los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostrados (media \pm DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. **C)** Fotografías de los tumores correspondientes a los diferentes grupos de tratamiento, una vez extraídos, tras el sacrificio de los animales al final del tratamiento.

3.6.3. Análisis de las muestras biológicas

Las muestras recogidas tras el final del tratamiento y el sacrificio de los animales fueron procesadas y analizadas por citometría de flujo, con el objetivo de determinar la presencia de los diferentes tipos celulares infiltrados en el tumor.

3.6.3.1. Infiltración de células T CD8⁺ V α 2/V β 5⁺ en el tumor

Para abordar el análisis de las células OT-I transferidas que se habían infiltrado en el tumor, se llevó a cabo la estrategia de gating mostrada en la Fig. R56.A. Tras seleccionar la población celular en función de su morfología (FSLin vs SSlog), se seleccionaron los **singletons** de células (FS-H vs FS-A) y posteriormente la población de **células CD45⁺ vivas**. Dentro de esta última, se seleccionaron las **células CD8⁺** y finalmente aquellas que co-expresaban los **V α 2 y V β 5**, específicos de los TCRs transgénicos de las células OT-I [244, 245] (Fig. R56.A). El porcentaje final de células T CD8⁺ V α 2/V β 5⁺ infiltrado se expresó en relación al porcentaje de células CD45⁺ vivas (Fig. R56.B). El análisis del porcentaje de células T CD8⁺ V α 2/V β 5⁺ en el tumor reveló que el

grupo de PBS presentaba el valor más bajo (0.07 ± 0.03 %), mientras que el mayor número de células transferidas se encontró en aquellos grupos en los que se habían inoculado únicamente células OT-I o células OT-I tratadas con NPMs sin haber estado expuestos a un CME (0.14 ± 0.03 % y 0.14 ± 0.07 % respectivamente). El grupo expuesto al CME presentó un valor intermedio (0.11 ± 0.05 %) (Fig. R56.B). Estos datos se correlacionan con el resultado clínico obtenido al final del experimento (Fig. R55.A).

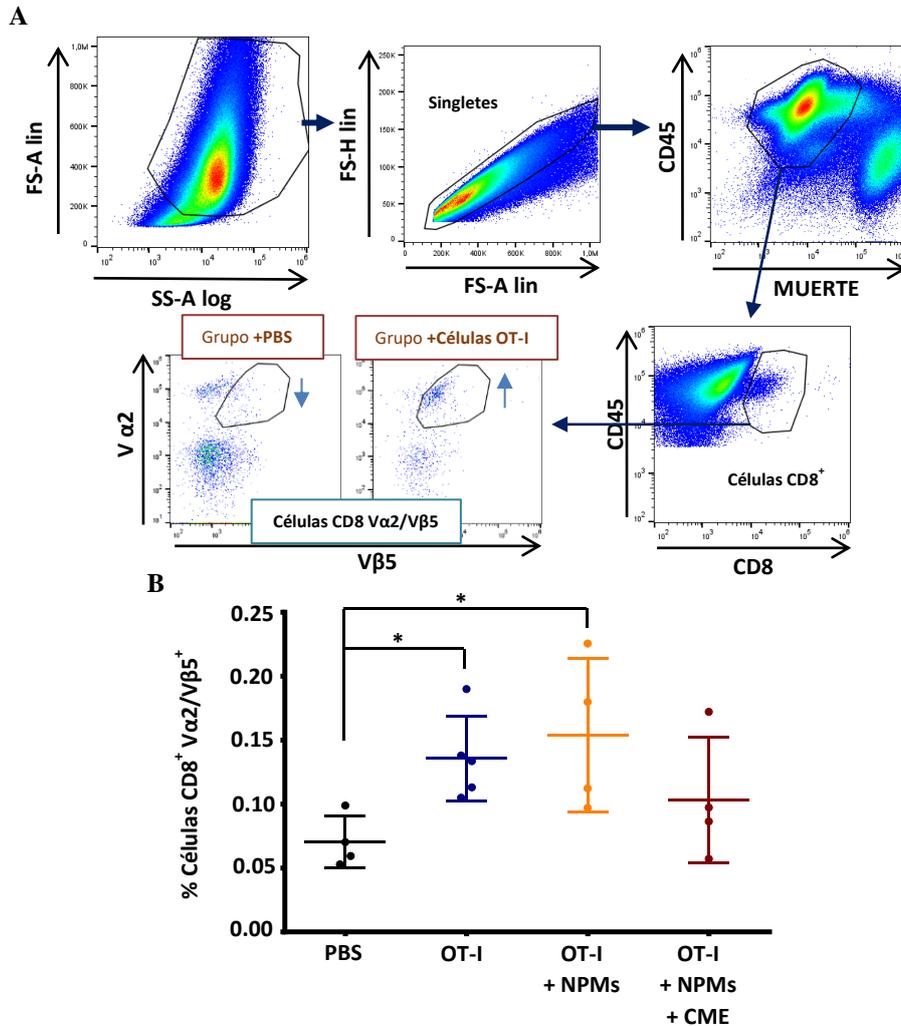


Fig. R56. Infiltración de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en el tumor en los diferentes grupos de tratamiento. A) Estrategia de gating seguida para el análisis del porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ infiltradas en el tumor. B) Porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ con respecto al porcentaje de células CD45⁺ vivas, infiltradas en el tumor, en los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.001.**

Además, se analizó la expresión de diferentes marcadores de activación de este infiltrado de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en el tumor, así como su potencial de respuesta al péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ analizando su capacidad para producir IFN-γ (Fig. R57). No se encontraron cambios significativos en el porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ CD69⁺, aunque sí se aprecia un ligero aumento en los grupos transferidos con células OT-I (ya sea en presencia o no de NPMs y CME) con respecto

al tratado con PBS. Los grupos inoculados con células OT-I tratadas con NPMs y expuestos o no a un CME fueron los que presentaron un mayor porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ CD25⁺, sobre todo respecto al grupo inoculado sólo con células OT-I ((2.6 ± 0.5) × 10⁻² % en el grupo transferido con células OT-I vs (4.9 ± 1.1) × 10⁻² % y (4.5 ± 1.0) × 10⁻² % en los grupos tratados con células OT-I con NPMs y en ausencia o presencia de un CME respectivamente). También se analizó su potencial de respuesta al péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄, mediante el análisis de la producción de IFN-γ. En este caso, todos los grupos transferidos con células OT-I (ya sea en presencia o no de NPMs y CME) presentaron un porcentaje mayor de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ IFN-γ⁺, en comparación con el grupo tratado con PBS, siendo más significativo en el grupo tratado con células OT-I asociadas a NPMs ((0.5 ± 0.2) × 10⁻² %, (0.6 ± 0.2) × 10⁻² % y (1.2 ± 0.8) × 10⁻² % en los grupos tratados con células OT-I, células OT-I + NPMs y células OT-I + NPMs + CME respectivamente vs (0.2 ± 0.1) × 10⁻² % en el grupo tratado con PBS) (Fig. R57.D).

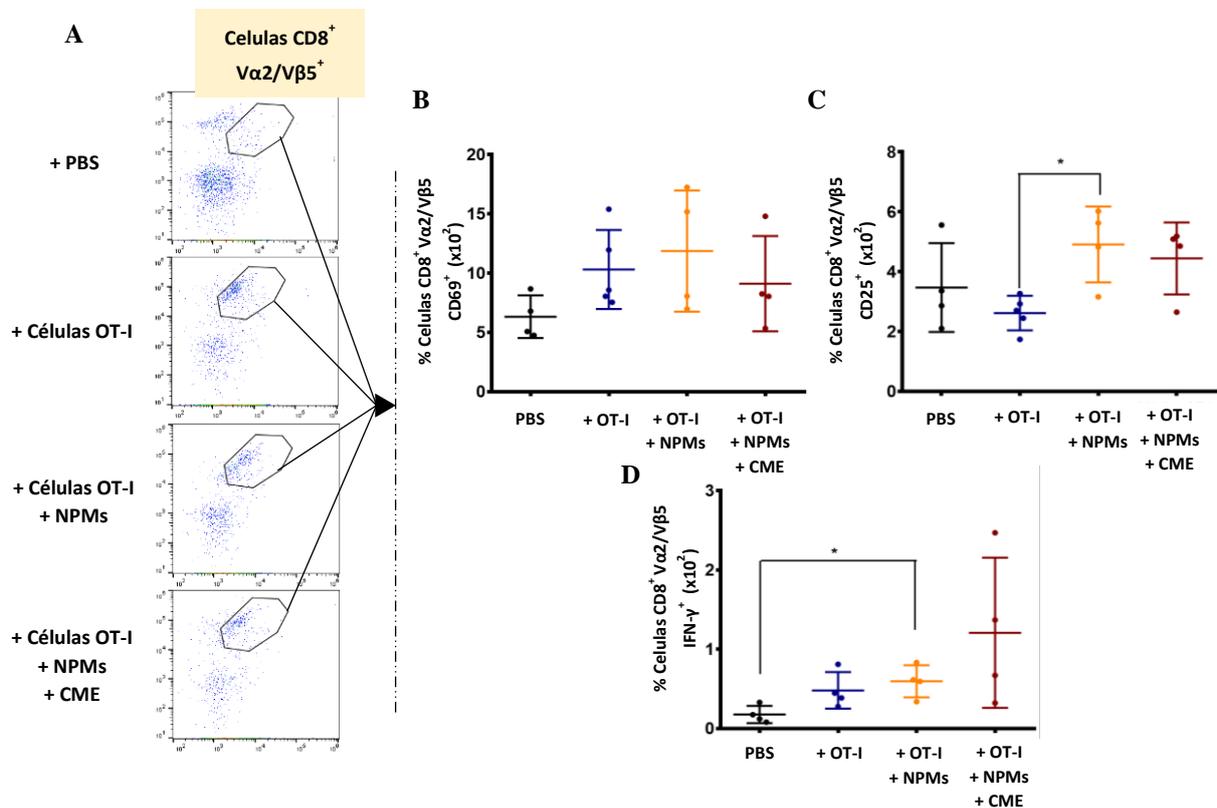


Fig. R57. Análisis fenotípico de las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ infiltradas en el tumor en los diferentes grupos de tratamiento. A) Dotplots representativos del porcentaje de células Vα2/Vβ5⁺ dentro de las células CD4⁺CD8⁺ vivas. Porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ **B)** CD69⁺ **C)** CD25⁺ y **D)** IFN-γ⁺. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.6.3.2. Infiltración de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en los órganos secundarios linfoides

Posteriormente, se analizó la presencia de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ también en órganos secundarios linfoides tales como el NL que drenaba el tumor, un NL cualquiera, alejado del

tumor, así como el bazo. Para estos casos, se siguió la estrategia de gating mostrada en la Fig. R56. Brevemente, se seleccionó la población celular en función de su morfología, se seleccionaron los **singletes** de células y posteriormente la población de **células CD3⁺ vivas**. Dentro de esta última, se seleccionaron las **células CD8⁺** y finalmente aquellas que co-expresaban los **Vα2 y Vβ5**, al igual que en el apartado anterior (Fig. R58). El porcentaje final de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ infiltradas se expresó en relación al porcentaje de células vivas.

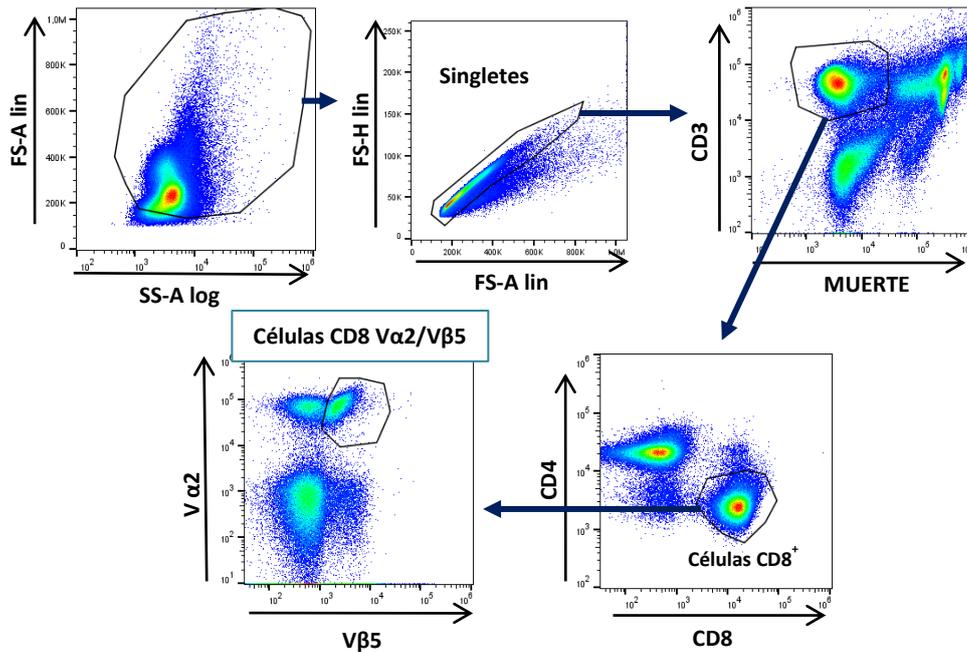


Fig. R58. Análisis de las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en los NLs proximal y distal y en los bazos en los diferentes grupos de tratamiento. Estrategia de gating seguida para el análisis del porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ presentes en los NLs proximal y distal y los bazos.

El análisis del porcentaje de **células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺** en el NL que drenaba el tumor reveló que el grupo inoculado con células OT-I tratadas con NPMs y expuesto al CME presentaba el valor más alto en comparación con el resto de los grupos (1.15 ± 0.9 % en el grupo de PBS vs 0.53 ± 0.04 %, 0.56 ± 0.03 % y 0.53 ± 0.04 % en los grupos de PBS, células OT-I y células OT-I tratadas con NPMs respectivamente) (Fig. R59.A,B). Las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ infiltradas en el NL proximal de este grupo también presentaron una mayor expresión de los marcadores de activación CD25 ($(10.04 \pm 10.75) \times 10^{-2}$ % en el grupo de PBS vs $(0.07 \pm 0.06) \times 10^{-2}$ %, $(0.03 \pm 0.02) \times 10^{-2}$ % y $(0.55 \pm 1.07) \times 10^{-2}$ % en los grupos de PBS, células OT-I y células OT-I tratadas con NPMs) y CD25/CD69 en conjunto ($(1.29 \pm 1.04) \times 10^{-2}$ % vs $(0.02 \pm 0.02) \times 10^{-2}$ %, $(0.03 \pm 0.04) \times 10^{-2}$ % y $(0.04 \pm 0.07) \times 10^{-2}$ % en los grupos de PBS, células OT-I y células OT-I tratadas con NPMs) (Fig. R59.C). Además, el porcentaje de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ IFN-γ⁺ en respuesta

al péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ fue mayor en este grupo en comparación con el grupo inoculado únicamente con PBS o células OT-I ((47.8 ± 28.5) × 10⁻² % vs (24.4 ± 0.6) × 10⁻² % y (17.1 ± 6.1) × 10⁻² % en los grupos de PBS y células OT-I respectivamente) (Fig. R59.D).

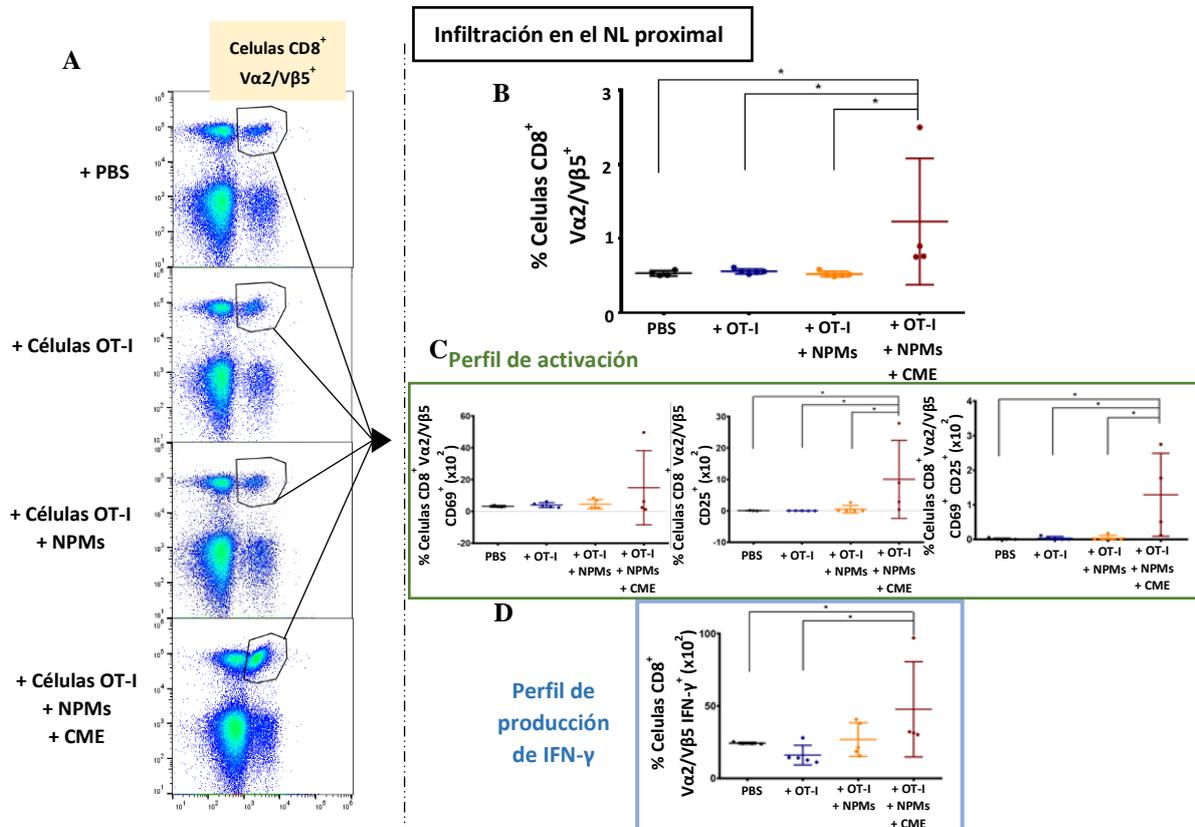


Fig. R59. Infiltración de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ en el NL proximal en los diferentes grupos de tratamiento. **A)** Dotplots representativos del porcentaje de células Va2/Vβ5⁺ dentro de las células CD3⁺CD8⁺ vivas. **B)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ con respecto al porcentaje de células CD45⁺ vivas, en el NL proximal, en los diferentes grupos de tratamiento. **C)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ CD69⁺, CD25⁺ y CD69⁺CD25⁺ en el NL proximal en los diferentes grupos de tratamiento. **D)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ IFN-γ⁺ e IMF correspondiente en el NL proximal en los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

De la misma manera, se analizó la presencia de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ en un NL alejado del tumor. Este análisis no mostró diferencias significativas en el porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ infiltradas en los diferentes grupos de tratamiento (Fig. R60.A,B). Además, tampoco se encontraron cambios significativos en la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 (Fig. R60.C) ni en la producción de IFN-γ tras la estimulación con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (Fig.

R60.D). Asimismo, se observó que el perfil de activación era menor en este caso en comparación con el perfil encontrado en el NL proximal (**Figs. R59.C,D; R60.C,D**).

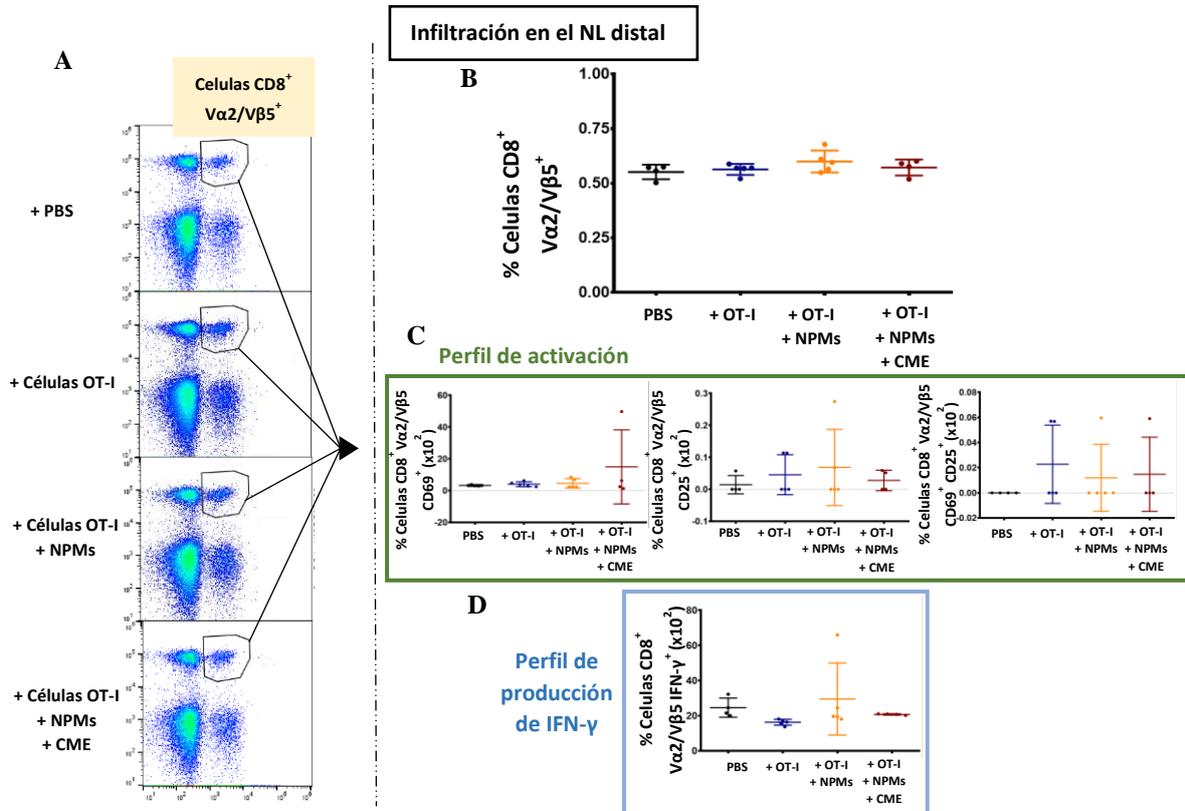


Fig. R60. Infiltración de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ en el NL distal en los diferentes grupos de tratamiento.
A) Dotplots representativos del porcentaje de células Va2/Vβ5⁺ dentro de las células CD3⁺CD8⁺ vivas. **B)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ con respecto al porcentaje de células CD45⁺ vivas, en el NL distal, en los diferentes grupos de tratamiento. **C)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ CD69⁺, CD25⁺ y CD69⁺CD25⁺ en el NL distal en los diferentes grupos de tratamiento. **D)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ IFN-γ⁺ e IMF correspondiente en el NL distal en los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

Finalmente, se analizó la presencia de **células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ en el bazo**. Este análisis mostró que los bazos de los ratones inoculados con células OT-I o células OT-I tratadas con NPMs presentaban un mayor número de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ (0.21 ± 0.03 % y 0.18 ± 0.02 % respectivamente) en comparación con el grupo tratado únicamente con PBS (0.15 ± 0.01 %) (**Fig. R61.A,B**). Además, no se encontraron cambios significativos en la expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 (**Fig. R61.C**) ni en la producción de IFN-γ tras la estimulación con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (**Fig. R61.D**). Sí se observó que la expresión del marcador de activación CD44 era mayor en comparación con el grupo tratado con PBS, siendo más significativo en el caso del grupo tratado con células OT-I ($(3.1 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ % en el grupo de PBS vs $(5.5 \pm 0.7) \times 10^{-2}$ %, 4.3

$\pm 0.9) \times 10^{-2} \%$ y $(4.5 \pm 0.8) \times 10^{-2} \%$ en los grupos de PBS, células OT-I y células OT-I tratadas con NPMs) (Fig. R61.C).

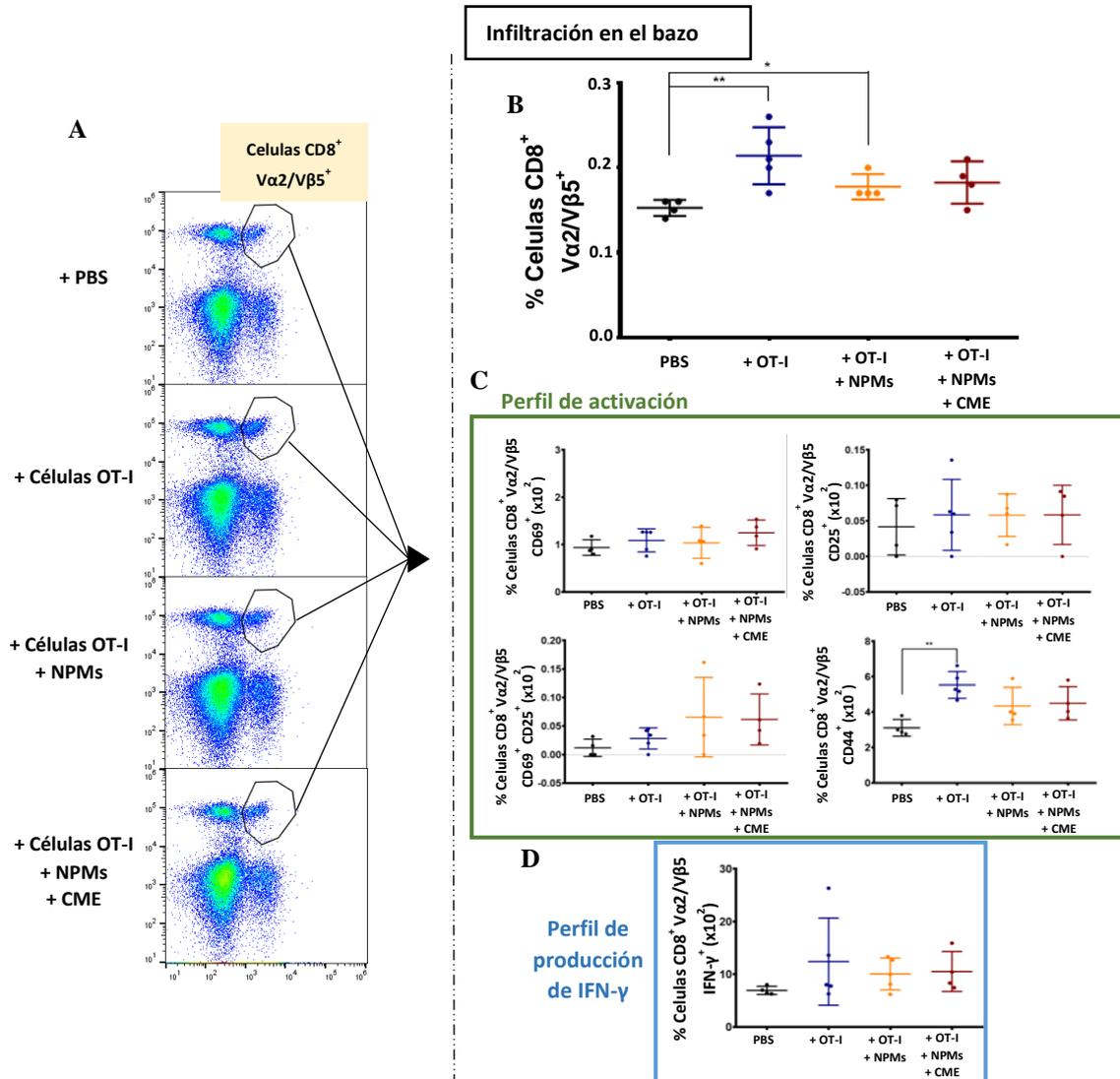


Fig. R61. Infiltración de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ en el bazo en los diferentes grupos de tratamiento. A) Dotplots representativos del porcentaje de células Va2/Vβ5⁺ dentro de las células CD3⁺CD8⁺ vivas. **B)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ con respecto al porcentaje de células CD45⁺ vivas, en el bazo, en los diferentes grupos de tratamiento. **C)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ CD69⁺, CD25⁺, CD69⁺CD25⁺ y CD44⁺ en el bazo en los diferentes grupos de tratamiento. **D)** Porcentaje de células T CD8⁺ Va2/Vβ5⁺ IFN-γ⁺ e IMF correspondiente en el bazo en los diferentes grupos de tratamiento. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.6.3.3. Infiltración de otras células inmunes en el tumor

Finalmente, se determinó la presencia de otros tipos celulares inmunes en el tumor mediante el análisis por citometría de flujo de la presencia de macrófagos (células F4/80⁺CD11b⁺), DCs convencionales (células MHC-II⁺CD11c⁺), células B (células CD19⁺CD11b⁺) y neutrófilos (células CD11b⁺Ly6G⁺). No se detectaron diferencias significativas en la infiltración de macrófagos, DCs

convencionales, células B o neutrófilos en el tejido tumoral en los diferentes grupos de tratamiento (Fig. R62.A-D).

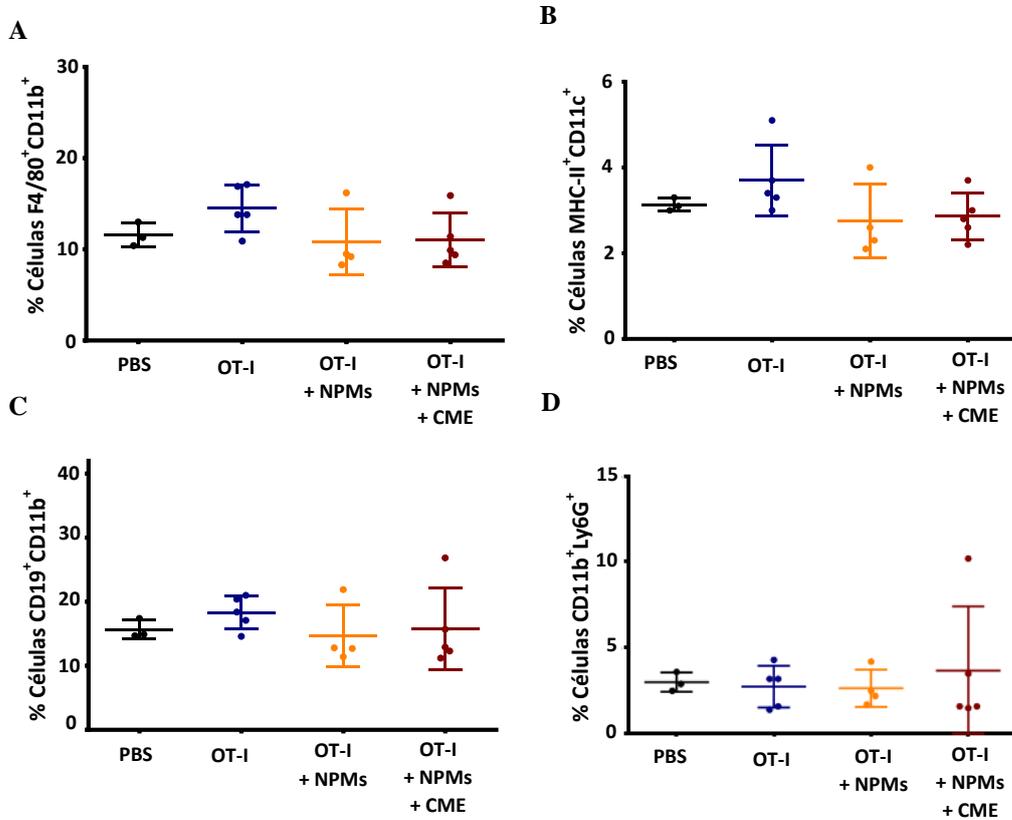


Fig. R62. Infiltración de diversas células inmunes en el tumor en los diferentes grupos de tratamiento. Cuantificación de los resultados obtenidos por citometría de flujo de la infiltración de **A)** macrófagos, **B)** células dendríticas, **C)** células B y **D)** neutrófilos en la región tumoral. Los resultados mostrados (media ± DE) se corresponden a 4-5 ratones/grupo, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

VIII. DISCUSIÓN

Los componentes del sistema inmune, tanto innato como adaptativo, desempeñan un papel clave en ciertas situaciones patológicas y pueden utilizarse en el tratamiento frente a las mismas. En concreto, es esencial en el reconocimiento y la eliminación células tumorales y por ello ha resurgido el concepto de **inmunoterapia** como una terapia prometedora que busca dirigir y potenciar la respuesta inmune para controlar el desarrollo, en este caso, de cáncer.

Dentro de la inmunoterapia, la ACT utiliza diferentes células inmunes como células T [68] o NK [124] con actividad antitumoral que migrarán al tumor y mediarán su destrucción. Sin embargo, a pesar de ser una estrategia prometedora y que ha tenido éxito en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, existe una falta de respuesta en ciertos casos [65]. Una de las principales causas de esta falta de respuesta, es el tráfico ineficiente de células efectoras y, por tanto, el pequeño porcentaje de las mismas que consigue migrar hacia el tumor e infiltrarse en él [151, 152, 154]. Actualmente, existen diversas estrategias destinadas a derribar las diversas barreras celulares y moleculares que crea el tumor y que restringen la entrada eficiente de las células efectoras en él, como la introducción de receptores de quimioquina, así como de selectinas e integrinas, adecuados para cada tipo de tumor [164, 166, 171] o la normalización de la vasculatura tumoral para eliminar el flujo irregular que impide la circulación eficiente de células inmunes [155, 167]. Sin embargo, aunque muchas de estas estrategias han tenido cierto éxito en algunos tipos de cáncer, **sería de gran interés una aproximación más general**, que no dependiera del tipo de tumor, con el objetivo de **mejorar fácilmente la migración de células inmunes de manera específica hacia cualquier tumor**, y facilitar su acumulación e infiltración en el mismo.

En este trabajo se presenta una estrategia basada en nanotecnología para resolver esta limitación. En concreto, se propone **analizar la posibilidad de controlar la localización de células linfoides mediante la utilización combinada de NPMs y la aplicación de CMEs con el fin de promover su acumulación y retención en una región de interés**.

1. EVALUACIÓN DE ASPECTOS BÁSICOS ENTRE LA INTERACCIÓN DE CÉLULAS LINFOIDES Y NPMs Y SU RETENCIÓN MAGNÉTICA *IN VIVO* EN NLs COMO PRUEBA DE CONCEPTO

Con el objetivo de evaluar la posibilidad de utilizar NPMs como plataforma para dirigir o retener magnéticamente células linfoides a una región de interés, **se han sintetizado y caracterizado NPMs con diferentes recubrimientos y, por tanto, diversas cargas superficiales**. Las NPMs utilizadas en este estudio se produjeron por el método de síntesis por co-precipitación y presentaron un núcleo de óxido de hierro de 12.5 nm de diámetro. Los análisis por espectroscopía infrarroja y las medidas por DLS confirmaron la correcta presencia del

recubrimiento, así como la monodispersidad de las preparaciones y las diferentes cargas superficiales. Se eligió el método de co-precipitación para la síntesis de las NPMs ya que es uno de los métodos más utilizados, además de sencillo y fácilmente reproducible y escalable [246].

El tratamiento con las NPMs no causó ninguna toxicidad relevante en ninguno de los modelos de células T utilizados, tanto en la línea celular humana Jurkat como en células T primarias murinas y células T CD8⁺ (OT-I) activadas. En el caso de las células NK, tampoco se encontró una toxicidad significativa en la línea celular NK-92MI, pero sí en algunos casos en las células NK primarias, junto con un ligero aumento en la apoptosis temprana. Existen diversos estudios que reportan que la toxicidad de las NPMs depende principalmente de su recubrimiento y del tipo celular con el que se encuentren, además de la concentración de uso y del tiempo de exposición [247-249]. **Por lo general, las NPMs no suelen causar una toxicidad notable en diferentes tipos celulares inmunes**, siendo la viabilidad celular > 80% [250]. Aunque **existen estudios que muestran la toxicidad de algunas NPMs en células linfoides, eso ocurre principalmente cuando se utilizan altas dosis y tiempos de exposición prolongados [251, 252] o con ciertos recubrimientos [253]**. Por otro lado, existen algunos estudios entre los que se encuentran ensayos con líneas celulares T y células T primarias, tanto humanas como murinas [253-260], así como con líneas celulares de NK, como NK-92 [189, 261-263] que demuestran la baja toxicidad de este tipo de NPs sobre células linfoides. Hasta el momento no hay descrito ningún ensayo con células NK primarias. En este trabajo sólo se encontró cierta disminución en la viabilidad de las células NK primarias y únicamente en algunas de las mayores concentraciones de un tipo de NPM (APS-NPMs), aunque no se llegó a una viabilidad menor del 75-80%, como se comentó previamente [250].

Además, en el caso de las líneas celulares Jurkat y NK-92MI y las células T primarias, se observó un aumento en la viabilidad medida por el ensayo de AlamarBlue. Este ensayo de viabilidad está basado en la capacidad metabólica de las mitocondrias, por lo que valores mayores en este estudio podrían indicar un aumento en el metabolismo de estas células tras la asociación con NPMs. Esto podría indicar cierta activación inespecífica por parte de las NPMs, ya que un aumento en la masa y actividad mitocondrial suelen estar relacionados con la activación de células T y NK [264-266], en ocasiones debido a la presencia de ROS [267], lo cual a veces ocurre en presencia de NPMs [268, 269]. En cambio, en las células NK murinas y OT-I, dado que ya se encuentran en un estado activo tras su activación y expansión, es probable que sea más difícil inducir o detectar cambios significativos en este aspecto.

El análisis mediante la tecnología Seahorse del estado metabólico de las células T primarias reveló que presentaban una mayor respiración mitocondrial y glicólisis en asociación con NPMs. Esto podría estar asociado con un estado activado en las células T, ya que la glicólisis aeróbica aumenta durante la transición a células T efectoras y la proliferación que tiene lugar tras el reordenamiento genético del TCR. Por el contrario, el catabolismo glicolítico se asociaría en mayor medida con la transición hacia células T reguladoras y de memoria [270]. Además, en las imágenes obtenidas por TEM en el caso de las células T primarias, pudimos apreciar una mayor presencia de mitocondrias tras el tratamiento con NPMs. Dado que estas células, en sus estadios tempranos, apenas son activas metabólicamente y el número de mitocondrias es muy escaso, dio lugar a pensar que efectivamente se está dando lugar cierta activación metabólica.

El estudio de la localización subcelular de las NPMs mediante microscopía confocal y electrónica mostró que, a diferencia de células macrofágicas, mesenquimales o tumorales, las cuales son capaces de internalizar diferentes tipos de NPMs [178, 184, 209, 210, 271], incluidas las NPMs utilizadas en el presente trabajo (Fig. R9) [211], las células linfoides, tanto células T como NK, son aparentemente incapaces de hacerlo. Está ampliamente descrito que la captación de las NPs depende del tipo celular [272, 273]. En este caso, **las NPMs permanecen en la superficie celular, en estrecho contacto con la membrana plasmática.** Las células linfoides presentan típicamente una baja capacidad fagocítica [274] con un gran núcleo y un citoplasma reducido, que podría impedir o dificultar la entrada de las NPMs en el citoplasma. Asimismo, también está descrito que la transfección de estos tipos celulares siempre ha presentado muchas dificultades y limitaciones, obteniéndose siempre una muy baja eficiencia en este proceso [275-281]. Por tanto, la baja capacidad endocítica de estas células ya había sido descrita anteriormente y suele requerirse un diseño especial durante la síntesis de NPMs para mejorar la internalización por parte de estas células no fagocíticas [252, 258, 282, 283].

Además, los análisis por microscopía y las mediciones de captación de hierro mostraron que **las NPMs recubiertas con APS (APS-NPMs) fueron aquellas que se asociaban en mayor medida con todos los tipos de células linfoides analizados.** Las NPMs recubiertas con DMSA y dextrano (DMSA-NPMs y DEXT-NPMs) presentan una carga superficial negativa y neutra respectivamente, mientras que **las APS-NPMs están cargadas positivamente, lo que podría favorecer su interacción electrostática con el potencial negativo de la membrana celular.** Existe una tendencia general a asumir que NPs positivamente cargadas interaccionan en mayor medida con las membranas celulares, posiblemente debido a interacciones electrostáticas [273, 284-290]. No obstante, existen ciertos factores relevantes como la proteína corona, y el hecho de que diversas proteínas y moléculas presentes en el medio puedan adherirse a la superficie de la

NP, que pudieran provocar cambios en las características de las NPs [291-295] y, por tanto, en su interacción con las células. La presencia de proteína corona puede influenciar la captación por parte de la célula [296, 297] pudiendo verse reducida [298, 299] o incrementada [300]. En función de la carga de las NPs y del medio en el que se encuentren, pueden adquirir una proteína corona u otra, lo que condiciona su asociación a la membrana y la posible internalización posterior. En este caso, las NPMs positivas (APS-NPMs) fueron las que interaccionaron más con la membrana de las células linfoides, lo que se correlaciona con lo descrito en la literatura. Además, en ningún caso fueron internalizadas, probablemente por la combinación de la poca capacidad fagocítica de estas células junto con la presencia de una proteína corona que podría dificultar aún más su internalización. Cabe destacar que las células T primarias se asociaron en menor medida con las NPMs en comparación con las células T CD8⁺ activadas. Existen estudios que demuestran que el estado de activación de las células afecta en su captación o asociación con las NPMs, y que, tras la estimulación *in vitro* de las células T, éstas son capaces de incorporar mayor cantidad de NPs [252].

El análisis del fenotipo de los diferentes tipos celulares mostró que **la asociación de las células con APS-NPMs no producía grandes diferencias significativas en los niveles de expresión de marcadores de superficie** importantes como: moléculas de adhesión, integrinas, receptores de quimioquinas o de otro tipo de ligandos activadores o inhibidores, etc. Estos datos se encuentran en consonancia con estudios previos que muestran que las NPMs pueden no afectar de manera significativa a la expresión de los niveles de expresión de marcadores de superficie de gran variedad de células [185, 186, 260, 301-303]. En cambio, sí existen otros estudios que muestran que las NPMs pueden desencadenar la activación celular en determinados casos [210, 304, 305] aunque este hecho depende principalmente del diseño de la NP [306].

Por otro lado, la respuesta quimiotáctica es crítica y esencial ya que guía el movimiento de las células linfoides a través de los diferentes tejidos y de las regiones donde su actividad es requerida. **La asociación de las células linfoides con NPMs disminuye ligeramente en algunos casos la respuesta por parte de estas células a un gradiente quimiotáctico.** Sin embargo, los resultados indican que **la aplicación adecuada de un CME en el mismo sentido del gradiente quimiotáctico podría corregir este defecto**, probablemente debido a que la fuerza magnética facilitaría la migración de aquellas células linfoides asociadas a NPMs que no fueron capaces de migrar debido únicamente al gradiente quimiotáctico. Se han descrito resultados similares en DCs [183, 186], lo que indica que la carga de células inmunes con NPMs podría afectar a su quimiotaxis. Al mismo tiempo, el ensayo de migración *in vitro* “under agarose”, que muestra el comportamiento de las células T polarizadas bajo un sistema de confinamiento *in vitro*, expuso

que la migración de las células también se vio afectada en este sistema, debido tanto a la presencia de NPMs, así como de un CME. Además, a distancias mayores del CME, donde el efecto del mismo es muy reducido, las células volvían a comportarse de la misma manera que en su ausencia. Por un lado, existen diversos estudios que muestran que la presencia de NPMs en las células puede afectar al reordenamiento del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos, limitando de esta manera su motilidad [307-310]. En este caso, las NPMs se encuentran asociadas a la membrana plasmática, y no en el citoplasma, por lo que la disminución en la migración no podría explicarse de esta manera. Por otro lado, se ha observado que la presencia de componentes magnéticos como NPMs así como la exposición a campos magnéticos estáticos moderados pueden influenciar los sistemas biológicos principalmente a través de alteraciones a nivel de los flujos iónicos transmembrana, como el de calcio, entre otros [218-220]. Se sabe que los niveles de calcio intracelular son necesarios para la rápida remodelación del citoesqueleto, clave en ciertos aspectos como la activación de las células T [311], así como su migración en respuesta a quimioquinas o su extravasación, entre otros [312, 313]. Esto podría explicar lo que ocurre en las células linfoides, y será comentado en mayor profundidad más adelante.

Otro de los principales puntos a evaluar en este trabajo es la capacidad de un CME para promover la retención o acumulación de células linfoides asociadas a NPMs en presencia de fuerzas de flujo similares a las encontradas en los capilares sanguíneos. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que una mínima cantidad de NPMs asociadas a las células era necesaria para que éstas fueran retenidas por un CME. Esta **retención magnética**, además, **aumenta con la cantidad de NPMs asociadas a las células, así como con la fuerza del gradiente magnético aplicado**. Otros estudios previos también mostraron que estos dos parámetros, junto con el tiempo de aplicación del CME, son críticos para que el direccionamiento magnético tenga lugar [187, 314].

El análisis *in vivo* de la capacidad de homing de las células T en presencia o ausencia de NPMs mostró que un mayor número de células T asociadas a NPMs era retenido en los NLs en comparación con las células T libres de NPMs. Esto indica que **la presencia de NPMs en la superficie de las células podría aumentar la retención de estas células por sí mismas, al menos, en los órganos secundarios linfoides**. Sin embargo, las células T asociadas a NPMs no mostraron una localización o distribución preferencial por un determinado órgano linfoide. La acumulación preferencial de las células T asociadas a NPMs en tejidos linfoides incluso en ausencia de un CME podría tener potencial para favorecer las interacciones entre las células T con células accesorias en estos órganos, donde tiene lugar el fenómeno de activación de las células T. Esta propiedad podría ser estudiada con el fin de promover las respuestas de las células T a un antígeno en

trabajos futuros. Estos resultados también fueron confirmados con el análisis por microscopía (SPIM) de los NLs. En este análisis *in vivo*, la aplicación de un CME favoreció la retención de las células T cargadas con NPMs transferidas en el NL expuesto al CME, indicando que después de llegar al NL, más células asociadas a NPMs fueron retenidas debido a la presencia de un CME. Se han descrito resultados similares, pero utilizando diferentes tipos celulares, en su mayoría células macrofágicas o mesenquimales, y otras regiones de interés [183-188]. Estos resultados refuerzan la idea de que **el direccionamiento magnético puede ser utilizado para promover la acumulación celular de manera específica y extender su aplicación a células linfoides**, un campo apenas explorado hasta el momento [189] y más complejo de abordar, debido a la alta motilidad y continua migración de estas células.

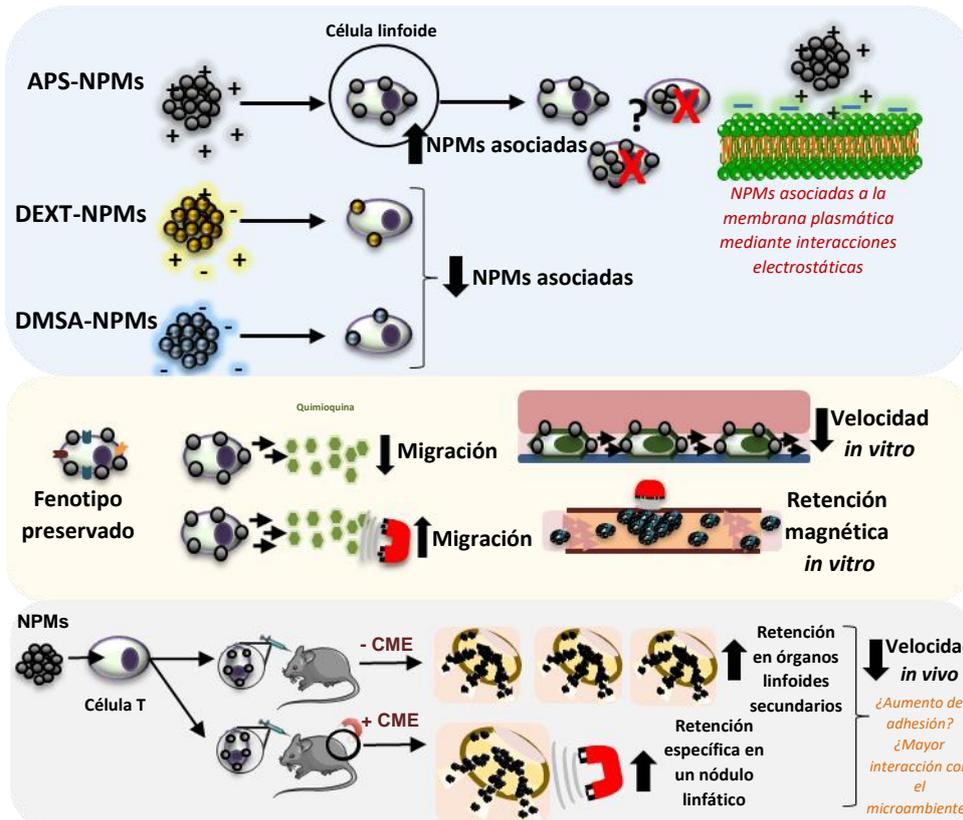
Los estudios de microscopía multifotónica sobre el comportamiento *in vivo* de las células T asociadas con NPMs en el NL poplíteo, mostraron una **reducción del 10% en la velocidad de las células T cuando estaban asociadas a NPMs en comparación con aquellas libres de NPMs**. Además, estos estudios también confirmaron el aumento en la retención de las células T asociadas a NPMs en los NLs ya que en todos los casos el número de éstas fue superior al de las células libres de NPMs. Este **aumento en la retención de células asociadas a NPMs, incluso en ausencia de un CME, podría ser debido a la reducción de la velocidad de dichas células, que podría prolongar su interacción con la vasculatura del tejido linfoide y facilitar su retención**. Sorprendentemente, la velocidad tanto de aquellas células T asociadas a NPMs como libres de NPMs se vio reducida en presencia de un CME. Esto podría deberse a la interacción entre ambos tipos de células durante la mezcla que se prepara de manera previa a la inoculación en el ratón. Este hecho se demostró en el experimento donde la transferencia únicamente de células T sin NPMs no se veía afectada de manera preferencial por ningún NL, incluso en presencia de un CME. Esto podría indicar, por tanto, que se transfiere parte de las NPMs a las células que no han sido tratadas previamente con ellas, o que ambos tipos celulares se asocian. Anteriormente se ha descrito que las células asociadas con NPMs presentan mayor tendencia a agregarse [315], por lo que sería probable que las células tratadas con NPMs interaccionaran en mayor medida con el resto de células, cargadas o no con NPMs. De manera alternativa, como ya se ha comentado previamente, existen diferentes estudios que demuestran que **los campos magnéticos estáticos moderados pueden influenciar los sistemas biológicos principalmente a través de alteraciones a nivel de los flujos iónicos transmembrana y de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares** [218-220]. Estudios básicos de microscopía de calcio no mostraron grandes afectaciones en el flujo del calcio, el cual es esencial en la funcionalidad de las células T, en el caso de las células Jurkat. Las células T murinas sí vieron reducidas tanto su

respuesta máxima como la respuesta media tras haber sido tratadas con NPMs, lo que podría indicar que la presencia de ciertos componentes magnéticos en las membranas celulares podría alterar este tipo de señalización. Este hecho es importante ya que, por ejemplo, se ha descrito que la magnitud y la duración de los flujos de calcio influyen en la velocidad basal de las células T en los NLs [311] y que una menor amplitud en los picos de calcio intracelular está relacionada con el arresto o movimiento más confinado de las células T, para favorecer su interacción con el estroma y otras células leucocitarias [316, 317]. Por tanto, **dependiendo de la magnitud y de la duración de los cambios en los niveles de calcio intracelular, pueden obtenerse diferentes respuestas celulares** y verse afectados aspectos esenciales tales como la activación de las células T [311], así como su migración en respuesta a gradientes quimiotácticos [313], como ya se observó previamente. Un estudio en mayor profundidad sería necesario para confirmar estos resultados y determinar su significancia biológica.

Por otro lado, también se ha descrito que **los efectos biológicos causados por un campo magnético dependen más de la magnitud del gradiente magnético que de la fuerza del campo** [318], lo que podría explicar la elevada reducción en la velocidad durante los ensayos de microscopía multifotónica cuando se utilizan dos imanes alrededor del NL, aumentando así el gradiente magnético, en lugar de uno sólo. Los análisis de las trayectorias seguidas por las células en estos experimentos indicaron que la carga con NPMs no altera significativamente el trayecto del linfocito dentro del NL cuando se aplica un CME, aunque un estudio en mayor profundidad a tiempos más largos y con un CME mayor podría ser necesario para detectar cambios en la trayectoria debido a la complejidad tisular del NL. Algunos de estos efectos podrían verse reducidos debido a la posible transferencia de NPMs a células no tratadas durante la preparación del inóculo y, por tanto, a la disminución en la carga de NPMs.

Con el fin de determinar si células inmunes con una mayor capacidad de internalización que las células T podrían asociarse con mayor número de NPMs y si esto permitiría una mayor capacidad de atracción por un CME, se realizó una prueba con DCs, ya que son capaces de internalizar mayor cantidad de NPMs [183, 186, 319, 320]. Al igual que en la transferencia de células T, se observó un mayor número de DCs cargadas con NPMs en el NL poplíteo observado, confirmando que la presencia de NPMs parece incrementar la retención o infiltración de células inmunes en el NL [185]. Asimismo, también se observó una disminución en la velocidad de las células, aunque aquí sólo debido a la presencia de NPMs, y probablemente debida a ciertas limitaciones en la reorganización del citoesqueleto por las NPMs [307-310], como ya se comentó anteriormente. Finalmente, en este caso sí parece observarse un ligero cambio en la trayectoria de las células, tanto de aquellas que estaban cargadas con NPMs como de las que no, ya que un

mayor porcentaje migra hacia el lado del CME. El hecho de que las DCs libres de NPMs también se puedan ver influenciadas puede deberse a la posible interacción entre las células con y sin NPMs en la mezcla previa a la inoculación como en el caso anterior o *in vivo*, tras la inoculación en el ratón. Como ya se comentó previamente, está descrito que las células asociadas con NPMs tienen mayor tendencia a agregarse [315] por lo que esto podría ser una explicación. Un estudio en mayor profundidad ayudaría a comprender mejor el comportamiento *in vivo* de las DCs asociadas a NPMs y en presencia de un CME.



Resumen de las ideas clave obtenidas durante la evaluación de los aspectos básicos entre la interacción de células linfoides y NPMs y su retención magnética *in vivo* en NLs como prueba de concepto.

2. EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS EFECTORAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL CON NPMs Y SU RETENCIÓN MAGNÉTICA *IN VIVO* EN UN MODELO TUMORAL

Como se ha podido ver, las células T asociadas con NPMs pueden ser retenidas magnéticamente en los NLs, lo que podría ser útil con el fin de modular la respuesta inmune en un contexto patológico. Por ejemplo, se ha descrito que en una enfermedad autoinmune que afecta al ovario, la acumulación de células T reguladoras en el NL próximo al ovario, contrarrestaban la respuesta inmune patogénica, inhibiendo el desarrollo de la enfermedad [321]. Asimismo, la retención de DCs en el NL también podría ser útil en la vacunación en cáncer, con el objetivo de desencadenar una respuesta antígeno específica contra un tumor. Existen diversos estudios que muestran diferentes estrategias para acumular DCs en los NLs con este fin, incluyendo el uso de NPMs [183, 185] Por otro lado, también está descrito que la duración de la interacción entre las

DCs y las células T en el NL produce respuestas más o menos específicas y potentes [322-326], por lo que la disminución en la velocidad tanto de las células T como de DCs observada previamente en los NLS, podría servir para favorecer su interacción y la generación de respuestas T más potentes y con mayor afinidad.

Esta estrategia, además, podría ser aplicada a otras regiones de interés, como un tumor, con el objetivo de aumentar la respuesta inmune antitumoral llevada a cabo por células efectoras activadas. Con este fin, se ha analizado también la influencia de las NPMs sobre la funcionalidad de células NK y T efectoras, para así determinar si se podría promover la retención específica de células, en este caso, con actividad antitumoral y totalmente funcionales.

Hasta el momento, existen **estudios poco detallados sobre el efecto de las NPMs en la funcionalidad de células T o NK citotóxicas.** La mayoría de ellos analizan algún aspecto funcional de estas células tras su asociación con las NPMs con el fin de observarlas por resonancia magnética nuclear y realizar un seguimiento de las mismas.

En el caso de las células T, tanto humanas como murinas, se ha observado que su proliferación en respuesta a antígenos específicos, así como su capacidad citotóxica frente a ciertas dianas celulares o la producción de ciertas citoquinas, no parecen verse afectadas por las NPMs *in vitro* [259, 260, 327, 328]. También existen estudios que muestran que las células T efectoras mantienen su actividad citotóxica y antitumoral *in vivo*, y son capaces de migrar e infiltrarse en el tumor sin problema aparente [258, 329]. No obstante, también se han descrito ciertos defectos en la capacidad citolítica y producción de citoquinas de estas células, pero únicamente en presencia de dosis muy altas de NPMs (>500 µg Fe/ml) [252]. Por ende, **los estudios descritos hasta el momento indicarían que las NPMs podrían asociarse con células T efectoras, pudiendo éstas mantener y preservar sus funciones principales.**

Respecto a las células NK, únicamente hay estudios que evalúan los efectos que pueden tener las NPMs en líneas celulares humanas de NK tales como NK-92 o KHYG-1, pero no en células NK primarias humanas o murinas. Estos estudios muestran que las líneas celulares de NK preservan su capacidad citolítica *in vitro* y son capaces de migrar e infiltrarse en el tumor al igual que aquellas que no están asociadas con NPMs *in vivo* [189, 197, 261-263, 330]. Por tanto, **estos estudios también indicarían que las células NK podrían asociarse con NPMs sin que sus funciones principales pudieran verse afectadas.**

Sin embargo, **es esencial un análisis más exhaustivo sobre estos y otros aspectos funcionales de estas células, así como de células NK primarias, tras la asociación con NPMs, y en concreto, con las NPMs utilizadas en este trabajo (APS-NPMs).**

Como ya se comentó, uno de los principales pasos clave para que una célula T o NK efectora ejerza su actividad citolítica frente a células malignas es la interacción física entre ambas [233], fenómeno denominado conjugación. La dinámica de formación de conjugados entre las células NK-92MI o las células NK primarias de ratón con sus correspondientes dianas celulares no pareció verse afectada por la presencia de NPMs en la membrana de las células NK. Este proceso tampoco se vio afectado en el caso de las células T CD8⁺ activadas (OT-I) con su diana celular EG7-OVA. Además, la visualización de estos conjugados por microscopía no mostró diferencias en la formación de estos conjugados ni en la formación del centro organizador de microtúbulos. Estos resultados indican, por tanto, que **la presencia de NPMs en las membranas celulares de células citotóxicas no afecta a su capacidad para interactuar físicamente y adherirse a las células susceptibles de ser lisadas para su correcto reconocimiento y posterior activación.**

Otro de los aspectos evaluados durante este trabajo fue la capacidad de desgranulación. Como ya se ha comentado, la presencia del marcador CD107a en membrana aumenta en las células citolíticas una vez que se han activado y liberado los gránulos con las enzimas que producirán la lisis de las células diana. Por tanto, se trata de una medida indirecta de la capacidad citolítica [234] y puede producirse bien por la activación en presencia de células diana o a través del entrecruzamiento con ligandos de los receptores activadores [235, 236]. **El análisis de la capacidad de desgranulación en células NK, tanto en la línea celular NK-92MI como NK primarias de ratón, mostró un aumento, dependiente de la concentración de NPMs, en la desgranulación espontánea, es decir, en ausencia de estímulos; mientras que la desgranulación en presencia de diversos estímulos aumentaba sólo debido a ese aumento en los niveles basales.** Esto podría deberse a cierta activación inespecífica de las células NK por parte de las NPMs. En el caso de las células OT-I no se encontró este aumento en la desgranulación basal, pero sí se incrementó en alguna de las dosis utilizadas tras la activación con su célula diana o en combinación con el péptido específico de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄).

Como ya se ha visto, las NPMs no parecen afectar de manera negativa a las capacidades de conjugación y de desgranulación de las células NK y T, por lo que posteriormente se evaluó la capacidad citotóxica directa frente a diversas dianas. La citotoxicidad de las células NK, inducida por diferentes dianas celulares que presentan nulos o muy bajos niveles de MHC-I como RMA/S (frente a células NK primarias de ratón) o K562 (frente a la línea celular NK-92MI) o el ligando del receptor activador NKG2D como YAC-1 (frente a células NK primarias de ratón), no se vio afectada por la presencia de las NPMs. La citotoxicidad de las células OT-I frente a la línea celular EG7-OVA, que activa de manera específica este tipo celular, tampoco se vio afectada por la presencia de NPMs. **Tanto las células NK como T son capaces de activarse y producir la lisis de**

células diana *in vitro*, aún en asociación con las NPMs, tal y cómo ya se había descrito previamente [189, 197, 252, 260, 262, 329].

Además, también se evaluó la capacidad para producir IFN- γ tras diversos estímulos, dado que es una de las citoquinas pro-inflamatorias más importantes que producen este tipo de células [109]. **Tanto las células NK humanas (línea NK-92MI) como murinas, así como las células OT-I, fueron capaces de producir IFN- γ tras su activación mediante diversos estímulos**, inespecíficos como PMA/ionomicina, o específicos como dianas celulares (células K562 o EG7/OVA) o el entrecruzamiento con ligandos de los receptores activadores (NK1.1, NKG2D y NKp46) [235, 236] **en niveles similares en presencia o no de NPMs**. Estos estudios son similares a resultados obtenidos previamente [252, 259, 328]. No obstante, se encontró un aumento en el porcentaje de células NK-92MI capaces de producir IFN- γ tras su estimulación con PMA/ionomicina en la mayor dosis de NPMs, aunque un análisis en mayor profundidad sería necesario para justificar qué está causando dicho aumento. Es importante señalar que la activación de NKG2D es capaz de estimular la producción de IFN- γ en células murinas pero no humanas [331, 332], por lo que la producción específica de IFN- γ en células NK-92MI sólo se analizó a través de su activación en presencia de células diana (células K562).

Finalmente, es relevante el hecho de que estas células con actividad antitumoral están continuamente circulando y se reclutan desde la circulación hasta el tumor por una serie de diferentes procesos que involucran desde la adhesión al endotelio hasta la extravasación [157, 158]. Por ello, se evaluaron la capacidad de adhesión a un endotelio y la capacidad de trans migración de las células NK primarias de ratón y células OT-I. **En ninguno de los casos se observaron defectos en la capacidad de estas células para adherirse o trans migrar a través de una monocapa de endotelio**. La presencia de las NPMs en la membrana de las células podría, en ocasiones, aumentar la adhesión a las células endoteliales, como en el caso de las células NK. Hipotéticamente, esto podría ocurrir probablemente por el hecho de que estas NPMs, expuestas en la membrana, interaccionaran a su vez con las células endoteliales. Los resultados obtenidos en este ensayo se muestran en concordancia con el hecho de que diversos estudios mostraban que tanto las células T como NK asociadas a NPMs podían migrar e infiltrarse en el tumor *in vivo* sin problemas [197, 258, 260-263, 329].

Una vez evaluados diferentes aspectos funcionales de las células T y NK efectoras, y habiendo observado que las NPMs no causan alteraciones o defectos en ellas y que pueden mantener su funcionalidad más o menos intacta en presencia de NPMs, se procedió a evaluar si la retención magnética de estas células *in vivo* en un modelo de cáncer produce una mejora en el tratamiento

del mismo. Hasta el momento, sólo existen estudios que han utilizado este tipo de estrategia con el fin de acumular células madre, células mesenquimales, macrófagos o DCs en terapias de regeneración tisular y desórdenes autoinmunes [183-188]. Su uso en el redireccionamiento de células linfoides para el tratamiento de cáncer es muy limitado y apenas está investigado [189].

En este trabajo, se ha evaluado la posibilidad de su uso en el reclutamiento específico de células OT-I en un modelo tumoral determinado. Los resultados obtenidos demostraron que **la presencia de NPMs en las células OT-I no afectó a su migración e infiltración en el tumor, así como a sus propiedades antitumorales *in vivo***, ya que el resultado fue muy similar al conseguido por parte de las células OT-I solas, sin NPMs. Estos resultados están en concordancia con los estudios previos que muestran que las NPMs no interfieren en la capacidad de células T efectoras para migrar e infiltrarse en el tumor y producir la subsecuente eliminación de las células tumorales [258, 329]. Sin embargo, cuando se evaluó si la aplicación de un CME en la zona del tumor podía favorecer la retención e infiltración de las células OT-I transferidas, mediante un aumento en el tiempo de adhesión en esa región, no se obtuvo un resultado mejor que en ausencia del mismo. De hecho, la eficacia en el control del crecimiento tumoral en este grupo fue intermedio entre aquél obtenido tras el tratamiento únicamente con PBS, como control negativo, y los grupos tratados con células OT-I tratadas o no con NPMs (como control positivo). **El análisis de la infiltración de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5 (como medida de la infiltración de células OT-I, caracterizadas por la coexpresión de Vα2/Vβ5 en su TCR) se correlacionó con el resultado clínico obtenido, ya que ésta era mayor en los grupos tratados únicamente con células OT-I (con y sin NPMs), mientras que el grupo expuesto adicionalmente a un CME presentaba una infiltración intermedia entre estos grupos y el tratado únicamente con PBS.** El grupo tratado con PBS presentó ciertos niveles basales de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5, debido posiblemente a la reorganización aleatoria de los TCRs y generación de algún clon que pueda reconocer esas células tumorales. Además, el análisis de la activación de estas células en los diferentes grupos mostró que, en general, **las células infiltradas en los tumores de todos los grupos tratados con células OT-I tenían un mayor estado de activación** (mayor porcentaje de células CD69⁺ y CD25⁺) y tenían **mayor capacidad de producir IFN-γ tras una re-estimulación con el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄**.

El análisis posterior del NL que drena el tumor reveló que, mientras que los grupos tratados con PBS o células OT-I con y sin NPMs sin exposición a un CME mostraban una muy reducida infiltración de células T CD8⁺ Vα2/Vβ5 en dicho NL, el grupo tratado con células OT-I con NPMs y expuesto al CME presentaba una mayor infiltración. Además, estas células T CD8⁺ Vα2/Vβ5

infiltradas tenían un mayor estado de activación según los marcadores CD25 y CD69 y presentaban mayor capacidad para producir IFN- γ tras su re-estimulación.

Estos resultados indican que **probablemente una fracción de las células OT-I transferidas se ha infiltrado en el NL próximo al tumor y ha permanecido en él, limitándose de esta manera la infiltración en el tumor por parte de estas células.** Esto podría deberse al hecho de que, debido a la proximidad que existe entre el NL y el tumor, la exposición a un CME favoreció la retención de las células transferidas en esa zona, infiltrándose finalmente en el NL, un lugar de más fácil acceso para estas células. La aplicación de uno o más imanes de menor tamaño como las “agujas magnéticas”, que pueden facilitar un campo magnético más concentrado en una zona limitada para la localización magnética en áreas pequeñas [333], pudieran ser utilizados para mejorar la infiltración específica en el tumor y no en el NL. Además, en los estudios previos en el inicio de esta Tesis ya observamos que las células T naïve se infiltraban y retenían más en los NLs cuando estaban asociadas a NPMs, aunque en este caso no se estudió si estas células eran capaces de abandonar el NL sin problema o no. **La razón por la cual permanecerían en el NL en lugar de salir e infiltrarse en el tumor sería de gran interés.** Una hipótesis pudiera ser, como ya se comentó anteriormente, que la reducción de la velocidad en las células T debido a las NPMs y al CME podría prolongar su interacción con la vasculatura del tejido linfoide y facilitar su retención. Además, la tendencia a agregarse de las células que llevan NPMs [315] podría dificultar su salida y contribuir a la incapacidad para abandonar el NL.

Por otro lado, se sabe que la salida de los linfocitos T de los NLs está regulada por la expresión de S1PR1 y su interacción con el ligando S1P [334-337]. También se ha descrito que tras la estimulación del TCR, disminuye la expresión de S1PR1 [335] y que la sobreexpresión del marcador de activación CD69 produciría la disminución en la expresión de S1PR1 debido a la formación de complejos entre ambos y a la subsecuente internalización de los mismos [335, 338, 339], quedando los linfocitos T atrapados en el NL inflamado. Asimismo, también se ha descrito que células T reguladoras específicas de antígeno ejercen su acción inmunosupresora en los NLs y son capaces de desplazarse a los mismos e inducir una disminución en la expresión de S1PR1 tanto en ellas como en células T efectoras, quedando ambos tipos celulares atrapados en el NL por largos períodos de tiempo [340]. Además, se ha visto que tras la unión específica de un antígeno con el TCR se generan señales en el linfocito con el fin de detener su migración y favorecer los contactos entre el propio linfocito y las CPAs [341]. Se sabe que existe una reversión en la polaridad de la célula, disminuyendo así su velocidad y aumentando su capacidad de adhesión, principalmente a través de LFA-1 y otras integrinas [342]. Asimismo, existen estudios que reportan que la señalización del TCR puede inducir cierta inhibición en la migración

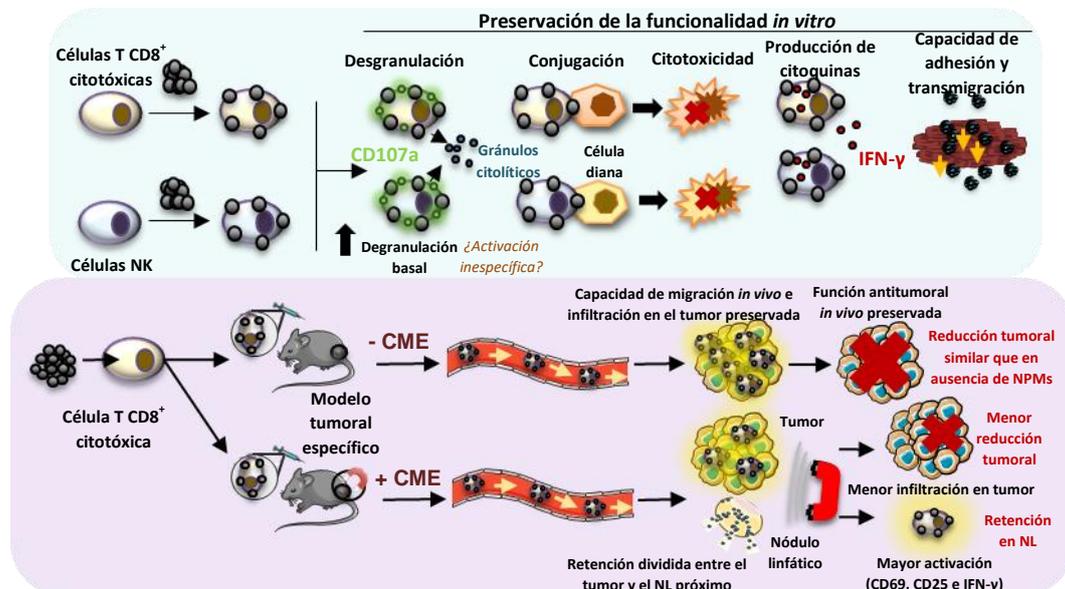
de las células T vía Rac1, con el fin de promover su retención en el sitio de inflamación e infección [343]. Todo esto podría tener lugar en el NL al encontrarse inicialmente en él. De igual manera, para moverse en el interior del NL y localizarse de manera adecuada en él, las células T deben ser capaces de formar diversas estructuras (lamelipodia y urópodo) que permitan su migración, mediante la reorganización de componentes del citoesqueleto [344, 345]. Sin embargo, algunos de estos elementos como el MTOC, presentan una orientación diferente en función de si la célula está migrando o activada e interaccionando con CPAs [341], por lo que el balance entre la formación o relocalización de ciertas estructuras podría estar inclinado hacia éste último, produciendo una disminución en la migración. Estas podrían ser algunas de las razones por la cual las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ activadas permanecen retenidas en el NL.

Finalmente, también se ha observado que los macrófagos del NL, tanto subcapsulares como medulares, están involucrados en el atrapamiento de células T γδ en los NLs por largos períodos de tiempo [346]. Además, las interacciones entre los linfocitos con la ECM suelen ser transitorias cuando el linfocito tiene gran capacidad migratoria, ya que la formación de adhesiones focales se correlaciona inversamente con la velocidad de migración [347]. Esto podría indicar que tal vez, las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ asociadas con NPMs podrían asociarse en mayor medida, debido en parte a la disminución en su velocidad, con ciertos tipos celulares, como macrófagos o fibroblastos reticulares, o la ECM, dentro del NL, así como ver reducida la formación de estructuras necesarias para la migración [344] dificultando su localización adecuada en el NL [335, 348, 349] y, por tanto, su salida del mismo. Como se ha visto, existen diversos motivos por los que las células T podrían quedarse “atrapadas” en el NL y un análisis en mayor profundidad ayudaría a determinar la razón específica por la cual las NPMs inducen esta aparente retención en los mismos. La modulación del tráfico de los linfocitos podría tener cierto interés también en el tratamiento de enfermedades autoinmunes [350]. De hecho, el fármaco FTY720, aprobado por la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple, está dirigido al bloqueo de la salida de los NLs de células T autorreactivas para evitar así su invasión a las regiones inflamadas [351].

Por otro lado, **la infiltración de las células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en un NL alejado del tumor no mostró diferencias entre los diversos grupos de tratamiento**, así como en su estado de activación. Los niveles de infiltración también fueron menores en comparación con el NL próximo al tumor. Esto refleja que **la acumulación de las células tratadas con NPMs en el NL que drena el tumor en el grupo expuesto al CME era específica y se deba principalmente al CME**. Asimismo, la infiltración de estas células en el bazo fue mayor en los grupos tratados con células OT-I con y sin NPMs, y algo menor en el grupo expuesto al CME, pero siempre ligeramente mayor en comparación con el grupo tratado con PBS. Esto reflejaría la presencia de

células T CD8⁺ Vα2/Vβ5⁺ en el torrente sanguíneo. Finalmente, no se observaron diferencias en la infiltración de otros tipos celulares inmunes en el tumor tras los diferentes tratamientos.

En este trabajo se propone el uso combinado de NPMs y CMEs para promover la acumulación específica de células linfoides con capacidad antitumoral en la región del tumor, y solventar así una de las principales limitaciones en la ACT en cáncer. La presencia de NPMs en las células linfoides, así como la aplicación específica de un CME, aumenta su retención en NLs, lo que podría ser útil en ciertas patologías autoinmunes. A pesar de que la funcionalidad de las células linfoides se preserva tanto *in vitro* como *in vivo*, la acumulación específica de las mismas en el tumor en un modelo murino tumoral mediante la aplicación de un CME sobre el mismo resulta difícil de conseguir, dada la proximidad entre dicho tumor y otros órganos, como el NL que lo drena. El uso de CMEs más focalizados podrían resolver dicha limitación. En este caso, esta aplicación podría ser combinada con otro tipo de estrategias destinadas a la normalización de la vasculatura tumoral, la modificación de células T o NK con TCRs o CARs transgénicos, o la utilización de inhibidores de la inmunosupresión tumoral, con el objetivo de atacar al tumor desde diferentes frentes y obtener una respuesta inmune antitumoral óptima. La nanotecnología ha tenido gran éxito en la mejora de ciertas terapias, y el control del tráfico de células inmunes tendría un gran potencial en el tratamiento de diversidad de enfermedades, aunque aún queda mucho esfuerzo en este ámbito debido a la compleja regulación a diferentes niveles a la que se encuentran expuestas.



Resumen sobre la evaluación de la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células linfoides y su retención magnética *in vivo* en un modelo tumoral específico

IX. CONCLUSIONES

1. Las NPMs utilizadas (DMSA-, APS- y DEXT-NPMs) no afectan de manera significativa a la viabilidad celular de las líneas celulares humanas Jurkat y NK-92MI, así como de las células murinas T primarias, NK y OT-I. De hecho, las NPMs parecen promover un estado ligeramente más activo metabólicamente en células T primarias en reposo, favoreciendo su transición hacia un estado efector.
2. Las NPMs se asocian, independientemente de su recubrimiento, con la membrana plasmática de las líneas celulares humanas Jurkat y NK-92MI, así como de las células murinas T primarias, NK y OT-I, que son incapaces de internalizarlas. Las NPMs recubiertas con APS (APS-NPMs) son las que presentan una mayor asociación con estas células, probablemente debido a la interacción electrostática entre las NPMs, que están cargadas positivamente, y el potencial negativo de la membrana celular.
3. La asociación de las células linfoides con APS-NPMs no produce cambios significativos en los niveles de expresión de marcadores de superficie relevantes en las líneas celulares humanas Jurkat y NK-92MI, así como en las células murinas T primarias, NK y OT-I. Sin embargo, su capacidad de respuesta a gradientes quimiotácticos puede verse limitada por la presencia de APS-NPMs, aunque la aplicación adecuada de un CME en el mismo sentido del gradiente quimiotáctico puede corregir este defecto.
4. Las líneas celulares humanas Jurkat y NK-92MI, así como las células murinas T primarias, NK y OT-I asociadas a APS-NPMs pueden ser retenidas *in vitro* mediante un CME aún en presencia de un flujo similar al flujo sanguíneo, siempre y cuando se alcance una mínima cantidad de NPMs asociadas o se aplique una mínima fuerza magnética. Esta retención depende, por tanto, de la cantidad de NPMs asociadas, así como de la fuerza del gradiente magnético aplicado y del tiempo de aplicación del mismo.
5. La presencia de APS-NPMs en la superficie de las células Jurkat y de las células T primarias de ratón aumenta la retención de estas células por sí mismas, al menos, en órganos secundarios linfoides. Además, el direccionamiento magnético puede ser utilizado para promover la acumulación de células T primarias asociadas a APS-NPMs de manera específica sobre un NL en concreto.
6. La velocidad de las células T primarias de ratón se ve reducida, tanto *in vitro* como *in vivo* dentro de los NLs, debido a la presencia de APS-NPMs y a la aplicación de gradientes magnéticos externos. Tanto las APS-NPMs como los CMEs podrían afectar los flujos

iónicos transmembrana como el de calcio, afectando así la capacidad migratoria de estas células. Además, esta disminución en la velocidad podría ser la responsable de un aumento en la interacción con la vasculatura del tejido linfoide y facilitar su retención en los NLs.

7. La funcionalidad de las células NK humanas y murinas, así como de las células OT-I, no parece estar afectada por la presencia de APS-NPMs. Estas células asociadas con APS-NPMs son capaces de reconocer y conjugarse con sus respectivas células diana, así como de desgranular, de producir la lisis de las mismas y de producir IFN- γ en respuesta a diversos estímulos de manera efectiva. Además, pueden adherirse y transmigrar sobre una monocapa de células endoteliales.
8. En un modelo tumoral singénico, donde se implantó un tumor subcutáneo que expresa un antígeno de OVA, reconocido de forma específica por las células CD8⁺ aisladas de ratones OT-I, la asociación de APS-NPMs con dichas células no afecta a su capacidad de migración e infiltración del tumor tras la transferencia adoptiva de las mismas, ni a su capacidad antitumoral *in vivo*, siendo capaces de producir el mismo efecto antitumoral que células OT-I libres de NPMs, como nos indica la expresión de IFN- γ intracelular y los marcadores de activación CD69 y CD25.
9. La aplicación de un CME sobre el tumor durante y tras la transferencia de células CD8⁺ aisladas de ratones OT-I, y asociadas a APS-NPMs, si bien no produjo un aumento significativo en la infiltración de dichas células en el tumor y, por tanto, una reducción en el tamaño tumoral, en comparación con la transferencia de dichas células en ausencia de CME o de APS-NPMs, indujo una mayor activación en estas células, como nos indica la expresión de IFN- γ intracelular y los marcadores de activación CD69 y CD25, así como su acumulación en el nódulo linfático que drena el tumor.

X. CONCLUSIONS

1. The MNPs used in this work (DMSA-, APS- and DEXT-MNPs) do not significantly affect the cell viability of the human Jurkat and NK-92MI cell lines, as well as of the primary murine T, NK and OT-I cells. In fact, MNPs seem to promote an increase in the metabolically active state in primary resting T cells, favouring their transition to an effector state.
2. MNPs are associated, regardless of their coating, with the cell membrane of the human cell lines Jurkat and NK-92MI, as well as of the primary murine T cells, NK and OT-I, which are unable to internalize them. The MNPs coated with APS (APS-MNPs) present a greater association with these cells, probably due to the electrostatic interaction between these APS-MNPs, which are positively charged, and the negative potential of the cell membrane.
3. The association of lymphoid cells with APS-MNPs does not produce significant changes in the expression levels of relevant surface markers in the human Jurkat and NK-92MI cell lines, as well as in the primary murine T, NK and OT-I cells. However, its ability to respond to chemotactic gradients can be limited by the presence of APS-MNPs, although the application of a CME in the same direction of the chemotactic gradient can correct this defect.
4. The human Jurkat and NK-92MI cell lines, as well as the primary murine T, NK and OT-I cells associated with APS-MNPs can be retained *in vitro* even in the presence of a flow similar to the blood flow with a magnetic field, provided that a minimum amount of associated MNPs is reached or a minimum magnetic force is applied. This cell retention depends, therefore, on the number of associated MNPs, as well as on the strength of the applied magnetic gradient and the duration of the application.
5. The presence of APS-MNPs on the surface of Jurkat and primary murine T cells increases the retention of these cells, at least, in lymphoid secondary organs. In addition, magnetic targeting can be used to promote the accumulation of primary T cells associated with APS-MNPs in a specific manner over a particular LN.

6. The speed of primary murine T cells is reduced, both *in vitro* and *in vivo* within the LNs, due to the presence of APS-MNPs and the application of external magnetic gradients. Both APS-MNPs and magnetic gradients could affect transmembrane ionic fluxes such as calcium, affecting the migratory capacity of these cells. In addition, this decrease in velocity could be responsible for an increase in the interaction with the lymphoid tissue vasculature and facilitate its retention in the LNs.
7. The functionality of human and murine NK cells, as well as of OT-I cells, does not seem to be affected by the presence of APS-MNPs. These APS-MNP-loaded cells associated are able to recognize and conjugate with their respective target cells, as well as degranulate, lyse them and efficiently produce IFN- γ in response to different stimuli. In addition, they can adhere and transmigrate over an endothelial cell monolayer.
8. The association of APS-MNPs with CD8⁺ T cells isolated from OT-I mice, which can recognize an specific OVA antigen, does not affect their ability to migrate and infiltrate into the tumour after the adoptive transfer of these cells, or their antitumor capacity *in vivo*, since these cells produce the same antitumour effect as OT-I cells free of MNPs, and have similar expression of intracellular IFN- γ and CD69 and CD25 activation markers, in a syngeneic tumour model expressing the specific OVA antigen.
9. The application of an external magnetic field on the tumour during and after the transfer of CD8⁺ T cells isolated from OT-I mice, and associated with APS-MNPs, did not produce a significant increase in the infiltration of those cells in the tumour and, therefore, a reduction in tumour size, compared to the transfer of the same cells in the absence of a magnetic field or APS-MNPs, but induced a greater activation in these cells, as well as their accumulation in the tumour-draining lymph node.

XI. BIBLIOGRAFÍA

1. Caspi, R.R., *Immunotherapy of autoimmunity and cancer: the penalty for success*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 970-6.
2. Smith, D.A. and D.R. Germolec, *Introduction to immunology and autoimmunity*. Environ Health Perspect, 1999. **107 Suppl 5**: p. 661-5.
3. Van Noort, J.M. and S. Amor, *Cell biology of autoimmune diseases*. Int Rev Cytol, 1998. **178**: p. 127-206.
4. Bickels, J., et al., *Coley's toxin: historical perspective*. Isr Med Assoc J, 2002. **4**(6): p. 471-2.
5. Baldwin, R.W., *Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours*. Br J Cancer, 1955. **9**(4): p. 652-7.
6. Foley, E.J., *Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin*. Cancer Res, 1953. **13**(12): p. 835-7.
7. Thomas, L., *On immunosurveillance in human cancer*. Yale J Biol Med, 1982. **55**(3-4): p. 329-33.
8. Burnet, F.M., *Immunological aspects of malignant disease*. Lancet, 1967. **1**(7501): p. 1171-4.
9. Burnet, F.M., *Immunological recognition of self*. Science, 1961. **133**(3449): p. 307-11.
10. Kaplan, D.H., et al., *Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(13): p. 7556-61.
11. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
12. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
13. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
14. 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.
15. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
16. Smyth, M.J., et al., *Activation of NK cell cytotoxicity*. Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 501-10.
17. Albertsson, P.A., et al., *NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity*. Trends Immunol, 2003. **24**(11): p. 603-9.
18. Smyth, M.J., et al., *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis*. J Exp Med, 2001. **193**(6): p. 661-70.
19. Smyth, M.J., et al., *Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma*. J Exp Med, 2000. **192**(5): p. 755-60.
20. Johnsen, A.C., et al., *Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity*. Cytokine, 1999. **11**(9): p. 664-72.
21. 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.
22. Shankaran, V., et al., *IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
23. Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(3): p. 776-81.
24. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.

25. Poggi, A. and M.R. Zocchi, *Mechanisms of tumor escape: role of tumor microenvironment in inducing apoptosis of cytolytic effector cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2006. **54**(5): p. 323-33.
26. Campoli, M. and S. Ferrone, *HLA antigen changes in malignant cells: epigenetic mechanisms and biologic significance*. Oncogene, 2008. **27**(45): p. 5869-85.
27. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
28. McHugh, R.S. and E.M. Shevach, *The role of suppressor T cells in regulation of immune responses*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(5): p. 693-702.
29. Sato, T., et al., *Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy*. Immunol Res, 2011. **51**(2-3): p. 170-82.
30. Gabrilovich, D., et al., *Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo*. Blood, 1998. **92**(11): p. 4150-66.
31. Abbasova, S.G., et al., *Cancer and soluble FAS*. Bull Exp Biol Med, 2009. **148**(4): p. 638-42.
32. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
33. Song, E., et al., *Soluble Fas ligand released by colon adenocarcinoma cells induces host lymphocyte apoptosis: an active mode of immune evasion in colon cancer*. Br J Cancer, 2001. **85**(7): p. 1047-54.
34. Motz, G.T. and G. Coukos, *Deciphering and reversing tumor immune suppression*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 61-73.
35. Mellman, I., G. Coukos, and G. Dranoff, *Cancer immunotherapy comes of age*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 480-9.
36. Blattman, J.N. and P.D. Greenberg, *Cancer immunotherapy: a treatment for the masses*. Science, 2004. **305**(5681): p. 200-5.
37. Munhoz, R.R. and M.A. Postow, *Recent advances in understanding antitumor immunity*. F1000Res, 2016. **5**: p. 2545.
38. Dustin, M.L., *Cancer immunotherapy: Killers on sterols*. Nature, 2016. **531**(7596): p. 583-4.
39. Kakimi, K., et al., *Advances in personalized cancer immunotherapy*. Breast Cancer, 2017. **24**(1): p. 16-24.
40. Karlitepe, A., O. Ozalp, and C.B. Avci, *New approaches for cancer immunotherapy*. Tumour Biol, 2015. **36**(6): p. 4075-8.
41. Klener, P., Jr., et al., *Immunotherapy Approaches in Cancer Treatment*. Curr Pharm Biotechnol, 2015. **16**(9): p. 771-81.
42. Alatrash, G., et al., *Cancer immunotherapies, their safety and toxicity*. Expert Opin Drug Saf, 2013. **12**(5): p. 631-45.
43. Weiner, L.M., *Cancer immunology for the clinician*. Clin Adv Hematol Oncol, 2015. **13**(5): p. 299-306.
44. Zugazagoitia, J., et al., *Current Challenges in Cancer Treatment*. Clin Ther, 2016. **38**(7): p. 1551-66.
45. Tartari, F., et al., *Economic sustainability of anti-PD-1 agents nivolumab and pembrolizumab in cancer patients: Recent insights and future challenges*. Cancer Treat Rev, 2016. **48**: p. 20-4.
46. Helissey, C., C. Vicier, and S. Champiat, *The development of immunotherapy in older adults: New treatments, new toxicities?* J Geriatr Oncol, 2016. **7**(5): p. 325-33.
47. Yang, Y., *Cancer immunotherapy: harnessing the immune system to battle cancer*. J Clin Invest, 2015. **125**(9): p. 3335-7.

48. Pardoll, D., *Cancer and the Immune System: Basic Concepts and Targets for Intervention*. Semin Oncol, 2015. **42**(4): p. 523-38.
49. Mackensen, A., et al., *Phase I study of adoptive T-cell therapy using antigen-specific CD8+ T cells for the treatment of patients with metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2006. **24**(31): p. 5060-9.
50. Dudley, M.E. and S.A. Rosenberg, *Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 666-75.
51. Yee, C., *Adoptive T cell therapy: Addressing challenges in cancer immunotherapy*. J Transl Med, 2005. **3**(1): p. 17.
52. Rosenberg, S.A. and J.J. Mule, *Immunotherapy of cancer with lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2*. Surgery, 1985. **98**(3): p. 437-44.
53. Rosenberg, S.A., et al., *A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone*. N Engl J Med, 1987. **316**(15): p. 889-97.
54. Nikolich-Zugich, J., M.K. Slifka, and I. Messaoudi, *The many important facets of T-cell repertoire diversity*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 123-32.
55. Schaeferli, P. and B. Moser, *Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic*. Immunol Res, 2005. **31**(1): p. 57-74.
56. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, 1999. **20**(12): p. 561-7.
57. Voskoboinik, I., J.C. Whisstock, and J.A. Trapani, *Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(6): p. 388-400.
58. Aktas, E., et al., *Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity*. Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 149-54.
59. Yee, C., et al., *Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(25): p. 16168-73.
60. Hung, K., et al., *The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2357-68.
61. Wang, R.F., *The role of MHC class II-restricted tumor antigens and CD4+ T cells in antitumor immunity*. Trends Immunol, 2001. **22**(5): p. 269-76.
62. Mumberg, D., et al., *CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8633-8.
63. Rosenberg, S.A., et al., *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*. N Engl J Med, 1988. **319**(25): p. 1676-80.
64. Dudley, M.E., et al., *Randomized selection design trial evaluating CD8+-enriched versus unselected tumor-infiltrating lymphocytes for adoptive cell therapy for patients with melanoma*. J Clin Oncol, 2013. **31**(17): p. 2152-9.
65. Rosenberg, S.A., et al., *Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4550-7.
66. Wu, R., et al., *Adoptive T-cell therapy using autologous tumor-infiltrating lymphocytes for metastatic melanoma: current status and future outlook*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 160-75.
67. Rosenberg, S.A. and M.E. Dudley, *Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma*. Curr Opin Immunol, 2009. **21**(2): p. 233-40.
68. Rosenberg, S.A., et al., *Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(4): p. 299-308.

69. Dudley, M.E., et al., *Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(10): p. 2346-57.
70. Plautz, G.E., et al., *Systemic T cell adoptive immunotherapy of malignant gliomas*. J Neurosurg, 1998. **89**(1): p. 42-51.
71. Robbins, P.F., et al., *Tumor regression in patients with metastatic synovial cell sarcoma and melanoma using genetically engineered lymphocytes reactive with NY-ESO-1*. J Clin Oncol, 2011. **29**(7): p. 917-24.
72. Morgan, R.A., et al., *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*. Science, 2006. **314**(5796): p. 126-9.
73. Robbins, P.F., et al., *A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(5): p. 1019-27.
74. Seliger, B., *Different regulation of MHC class I antigen processing components in human tumors*. J Immunotoxicol, 2008. **5**(4): p. 361-7.
75. Vonderheide, R.H. and C.H. June, *Engineering T cells for cancer: our synthetic future*. Immunol Rev, 2014. **257**(1): p. 7-13.
76. Shirasu, N. and M. Kuroki, *Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: architecture and outcomes*. Anticancer Res, 2012. **32**(6): p. 2377-83.
77. Kalos, M., *Muscle CARs and TcRs: turbo-charged technologies for the (T cell) masses*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(1): p. 127-35.
78. Lipowska-Bhalla, G., et al., *Targeted immunotherapy of cancer with CAR T cells: achievements and challenges*. Cancer Immunol Immunother, 2012. **61**(7): p. 953-62.
79. Ramos, C.A. and G. Dotti, *Chimeric antigen receptor (CAR)-engineered lymphocytes for cancer therapy*. Expert Opin Biol Ther, 2011. **11**(7): p. 855-73.
80. Kahlon, K.S., et al., *Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin 13-zetakine redirected cytolytic T cells*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9160-6.
81. Maude, S.L., E.J. Shpall, and S.A. Grupp, *Chimeric antigen receptor T-cell therapy for ALL*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014. **2014**(1): p. 559-64.
82. Kiessling, R., et al., *"Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 117-21.
83. Kiessling, R., E. Klein, and H. Wigzell, *"Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. Eur J Immunol, 1975. **5**(2): p. 112-7.
84. Herberman, R.B., et al., *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells*. Int J Cancer, 1975. **16**(2): p. 230-9.
85. Ljunggren, H.G. and K.J. Malmberg, *Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(5): p. 329-39.
86. Vacca, P., et al., *Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy*. Trends Immunol, 2011. **32**(11): p. 517-23.
87. Huntington, N.D., et al., *IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo*. J Exp Med, 2009. **206**(1): p. 25-34.
88. Freud, A.G. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 56-72.
89. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 123-37.
90. Gregoire, C., et al., *The trafficking of natural killer cells*. Immunol Rev, 2007. **220**: p. 169-82.

91. Mombaerts, P., et al., *RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes*. Cell, 1992. **68**(5): p. 869-77.
92. Shinkai, Y., et al., *RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement*. Cell, 1992. **68**(5): p. 855-67.
93. Sutlu, T. and E. Alici, *Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects*. J Intern Med, 2009. **266**(2): p. 154-81.
94. Karre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
95. Vosshenrich, C.A., S.I. Samson-Villeger, and J.P. Di Santo, *Distinguishing features of developing natural killer cells*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(2): p. 151-8.
96. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
97. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.
98. Arnon, T.I., G. Markel, and O. Mandelboim, *Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(5): p. 348-58.
99. Arnon, T.I., et al., *Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 515-23.
100. 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.
101. Trapani, J.A., et al., *Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 323-9.
102. Kagi, D., et al., *Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice*. Nature, 1994. **369**(6475): p. 31-7.
103. Cretney, E., S.E. Street, and M.J. Smyth, *TNF contributes to the immunopathology of perforin/Fas ligand double deficiency*. Immunol Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 436-40.
104. Screpanti, V., et al., *A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 2068-73.
105. Takeda, K., et al., *Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth*. Cell Immunol, 2001. **214**(2): p. 194-200.
106. Hooijberg, E., et al., *Lysis of syngeneic tumor B cells by autoreactive cytotoxic T lymphocytes specific for a CD19 antigen-derived synthetic peptide*. J Immunother Emphasis Tumor Immunol, 1996. **19**(5): p. 346-56.
107. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
108. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-83.
109. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
110. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
111. Street, S.E., E. Cretney, and M.J. Smyth, *Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis*. Blood, 2001. **97**(1): p. 192-7.
112. Gorelik, E., et al., *Role of NK cells in the control of metastatic spread and growth of tumor cells in mice*. Int J Cancer, 1982. **30**(1): p. 107-12.
113. Malmberg, K.J., et al., *Immune selection during tumor checkpoint inhibition therapy paves way for NK-cell "missing self" recognition*. Immunogenetics, 2017. **69**(8-9): p. 547-556.
114. Castriconi, R., et al., *Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: critical role of DNAX accessory molecule-1-poliiovirus receptor interaction*. Cancer Res, 2004. **64**(24): p. 9180-4.

115. Ames, E., et al., *Enhanced targeting of stem-like solid tumor cells with radiation and natural killer cells*. *Oncoimmunology*, 2015. **4**(9): p. e1036212.
116. Tallero, R., et al., *Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules*. *J Immunol*, 2013. **190**(5): p. 2381-90.
117. Imai, K., et al., *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. *Lancet*, 2000. **356**(9244): p. 1795-9.
118. Hsia, J.Y., et al., *Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma*. *Chang Gung Med J*, 2005. **28**(5): p. 335-40.
119. Villegas, F.R., et al., *Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer*. *Lung Cancer*, 2002. **35**(1): p. 23-8.
120. Ishigami, S., et al., *Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer*. *Cancer Lett*, 2000. **159**(1): p. 103-8.
121. Coca, S., et al., *The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma*. *Cancer*, 1997. **79**(12): p. 2320-8.
122. Ruggeri, L., et al., *Natural killer cell alloreactivity and haplo-identical hematopoietic transplantation*. *Cytotherapy*, 2006. **8**(6): p. 554-8.
123. Miller, J.S., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer*. *Blood*, 2005. **105**(8): p. 3051-7.
124. Knorr, D.A., et al., *Clinical utility of natural killer cells in cancer therapy and transplantation*. *Semin Immunol*, 2014. **26**(2): p. 161-72.
125. Sakamoto, N., et al., *Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer*. *J Transl Med*, 2015. **13**: p. 277.
126. Sutlu, T., et al., *Clinical-grade, large-scale, feeder-free expansion of highly active human natural killer cells for adoptive immunotherapy using an automated bioreactor*. *Cytotherapy*, 2010. **12**(8): p. 1044-55.
127. Mehta, R.S., E.J. Shpall, and K. Rezvani, *Cord Blood as a Source of Natural Killer Cells*. *Front Med (Lausanne)*, 2015. **2**: p. 93.
128. Knorr, D.A., et al., *Clinical-scale derivation of natural killer cells from human pluripotent stem cells for cancer therapy*. *Stem Cells Transl Med*, 2013. **2**(4): p. 274-83.
129. Tam, Y.K., et al., *Ex vivo expansion of the highly cytotoxic human natural killer-92 cell-line under current good manufacturing practice conditions for clinical adoptive cellular immunotherapy*. *Cytotherapy*, 2003. **5**(3): p. 259-72.
130. Gong, J.H., G. Maki, and H.G. Klingemann, *Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells*. *Leukemia*, 1994. **8**(4): p. 652-8.
131. Maki, G., et al., *Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(3): p. 369-83.
132. Suck, G., et al., *KHYG-1, a model for the study of enhanced natural killer cell cytotoxicity*. *Exp Hematol*, 2005. **33**(10): p. 1160-71.
133. Tonn, T., et al., *Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92*. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001. **10**(4): p. 535-44.
134. Yan, Y., et al., *Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias*. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(11): p. 2859-68.
135. Klingemann, H.G., E. Wong, and G. Maki, *A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 1996. **2**(2): p. 68-75.
136. Klingemann, H.G., *Cellular therapy of cancer with natural killer cells-where do we stand?* *Cytotherapy*, 2013. **15**(10): p. 1185-94.

137. Zhang, C., et al., *Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 533.
138. Suck, G., *Novel approaches using natural killer cells in cancer therapy*. *Semin Cancer Biol*, 2006. **16**(5): p. 412-8.
139. Tran, K.Q., et al., *Minimally cultured tumor-infiltrating lymphocytes display optimal characteristics for adoptive cell therapy*. *J Immunother*, 2008. **31**(8): p. 742-51.
140. Zhou, J., et al., *Persistence of multiple tumor-specific T-cell clones is associated with complete tumor regression in a melanoma patient receiving adoptive cell transfer therapy*. *J Immunother*, 2005. **28**(1): p. 53-62.
141. Robbins, P.F., et al., *Cutting edge: persistence of transferred lymphocyte clonotypes correlates with cancer regression in patients receiving cell transfer therapy*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7125-30.
142. Klebanoff, C.A., et al., *Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(27): p. 9571-6.
143. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
144. Dudley, M.E., et al., *A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma*. *J Immunother*, 2002. **25**(3): p. 243-51.
145. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response*. *Nat Rev Immunol*, 2012. **12**(4): p. 269-81.
146. Stabile, H., et al., *Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 293.
147. Kmiecik, J., et al., *Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level*. *J Neuroimmunol*, 2013. **264**(1-2): p. 71-83.
148. Kim, S.T., et al., *Tumor-infiltrating lymphocytes, tumor characteristics, and recurrence in patients with early breast cancer*. *Am J Clin Oncol*, 2013. **36**(3): p. 224-31.
149. Piersma, S.J., et al., *High number of intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes is associated with the absence of lymph node metastases in patients with large early-stage cervical cancer*. *Cancer Res*, 2007. **67**(1): p. 354-61.
150. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. *Science*, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
151. Bernhard, H., et al., *Adoptive transfer of autologous, HER2-specific, cytotoxic T lymphocytes for the treatment of HER2-overexpressing breast cancer*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(2): p. 271-80.
152. Pockaj, B.A., et al., *Localization of 111indium-labeled tumor infiltrating lymphocytes to tumor in patients receiving adoptive immunotherapy. Augmentation with cyclophosphamide and correlation with response*. *Cancer*, 1994. **73**(6): p. 1731-7.
153. John, L.B., M.H. Kershaw, and P.K. Darcy, *Blockade of PD-1 immunosuppression boosts CAR T-cell therapy*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(10): p. e26286.
154. Hong, M., et al., *Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control*. *Cancer Res*, 2011. **71**(22): p. 6997-7009.
155. Bellone, M. and A. Calcinotto, *Ways to enhance lymphocyte trafficking into tumors and fitness of tumor infiltrating lymphocytes*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 231.

156. Palmer, D.C., et al., *Vaccine-stimulated, adoptively transferred CD8+ T cells traffic indiscriminately and ubiquitously while mediating specific tumor destruction*. J Immunol, 2004. **173**(12): p. 7209-16.
157. Masopust, D. and J.M. Schenkel, *The integration of T cell migration, differentiation and function*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(5): p. 309-20.
158. Nolz, J.C., G.R. Starbeck-Miller, and J.T. Harty, *Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions*. Immunotherapy, 2011. **3**(10): p. 1223-33.
159. Mulligan, A.M., et al., *Tumoral lymphocytic infiltration and expression of the chemokine CXCL10 in breast cancers from the Ontario Familial Breast Cancer Registry*. Clin Cancer Res, 2013. **19**(2): p. 336-46.
160. Harlin, H., et al., *Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 3077-85.
161. Matsumura, S., et al., *Radiation-induced CXCL16 release by breast cancer cells attracts effector T cells*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3099-107.
162. Musha, H., et al., *Selective infiltration of CCR5(+)/CXCR3(+) T lymphocytes in human colorectal carcinoma*. Int J Cancer, 2005. **116**(6): p. 949-56.
163. Buckanovich, R.J., et al., *Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy*. Nat Med, 2008. **14**(1): p. 28-36.
164. Kershaw, M.H., et al., *Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2*. Hum Gene Ther, 2002. **13**(16): p. 1971-80.
165. Di Stasi, A., et al., *T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model*. Blood, 2009. **113**(25): p. 6392-402.
166. Spear, P., A. Barber, and C.L. Sentman, *Collaboration of chimeric antigen receptor (CAR)-expressing T cells and host T cells for optimal elimination of established ovarian tumors*. Oncoimmunology, 2013. **2**(4): p. e23564.
167. Shrimali, R.K., et al., *Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6171-80.
168. Jain, R.K., *Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy*. Science, 2005. **307**(5706): p. 58-62.
169. Ganss, R., et al., *Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication*. Cancer Res, 2002. **62**(5): p. 1462-70.
170. Johansson, A., et al., *Tumor-targeted TNFalpha stabilizes tumor vessels and enhances active immunotherapy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(20): p. 7841-6.
171. Fu, X., et al., *Genetically modified T cells targeting neovasculature efficiently destroy tumor blood vessels, shrink established solid tumors and increase nanoparticle delivery*. Int J Cancer, 2013. **133**(10): p. 2483-92.
172. Chinnasamy, D., et al., *Local delivery of interleukin-12 using T cells targeting VEGF receptor-2 eradicates multiple vascularized tumors in mice*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(6): p. 1672-83.
173. Emerich, D.F. and C.G. Thanos, *Nanotechnology and medicine*. Expert Opin Biol Ther, 2003. **3**(4): p. 655-63.
174. Arruebo M., F.-P.R., Ibarra M. R., Santamaría J., *Magnetic nanoparticles for drug delivery applications*. NanoToday, 2007(2): p. 9.
175. Shenoy, D., et al., *Poly(ethylene oxide)-modified poly(beta-amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs: part 2. In vivo distribution and tumor localization studies*. Pharm Res, 2005. **22**(12): p. 2107-14.
176. Cao, Y., et al., *Self-assembled nanoparticle drug delivery systems from galactosylated polysaccharide-doxorubicin conjugate loaded doxorubicin*. Int J Biol Macromol, 2010. **46**(2): p. 245-9.

177. McCarthy, D.P., et al., *Targeted immunomodulation using antigen-conjugated nanoparticles*. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol, 2014. **6**(3): p. 298-315.
178. Mejias, R., et al., *Dimercaptosuccinic acid-coated magnetite nanoparticles for magnetically guided in vivo delivery of interferon gamma for cancer immunotherapy*. Biomaterials, 2011. **32**(11): p. 2938-52.
179. Tartaj, P., *Probing nanomagnets' interactions inside colloidal superparamagnetic composites: aerosol versus surface template methods*. Chemphyschem, 2003. **4**(12): p. 1371-5.
180. Okon, E., et al., *Biodegradation of magnetite dextran nanoparticles in the rat. A histologic and biophysical study*. Lab Invest, 1994. **71**(6): p. 895-903.
181. Gutierrez, L., et al., *Bioinorganic transformations of liver iron deposits observed by tissue magnetic characterisation in a rat model*. J Inorg Biochem, 2006. **100**(11): p. 1790-9.
182. Wendel, M., et al., *Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands*. Cancer Res, 2008. **68**(20): p. 8437-45.
183. Jin, H., et al., *Magnetic Enrichment of Dendritic Cell Vaccine in Lymph Node with Fluorescent-Magnetic Nanoparticles Enhanced Cancer Immunotherapy*. Theranostics, 2016. **6**(11): p. 2000-2014.
184. Tukmachev, D., et al., *An effective strategy of magnetic stem cell delivery for spinal cord injury therapy*. Nanoscale, 2015. **7**(9): p. 3954-8.
185. Su, H., et al., *The migration of synthetic magnetic nanoparticle labeled dendritic cells into lymph nodes with optical imaging*. Int J Nanomedicine, 2013. **8**: p. 3737-44.
186. de Chickera, S.N., et al., *Labelling dendritic cells with SPIO has implications for their subsequent in vivo migration as assessed with cellular MRI*. Contrast Media Mol Imaging, 2011. **6**(4): p. 314-27.
187. Polyak, B., et al., *High field gradient targeting of magnetic nanoparticle-loaded endothelial cells to the surfaces of steel stents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 698-703.
188. Chertok, B., et al., *Glioma selectivity of magnetically targeted nanoparticles: a role of abnormal tumor hydrodynamics*. J Control Release, 2007. **122**(3): p. 315-23.
189. Jang, E.S., et al., *The manipulation of natural killer cells to target tumor sites using magnetic nanoparticles*. Biomaterials, 2012. **33**(22): p. 5584-92.
190. Clemente-Casares, X. and P. Santamaria, *Nanomedicine in autoimmunity*. Immunol Lett, 2014. **158**(1-2): p. 167-74.
191. Massart, R., *Preparation of Aqueous Magnetic Liquids In Alkaline and Acidic Media*. Vol. 17. 1981. 1247-1248.
192. Luengo, Y., et al., *Different cell responses induced by exposure to maghemite nanoparticles*. Nanoscale, 2013. **5**(23): p. 11428-37.
193. Clarke, S.R., et al., *Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection*. Immunol Cell Biol, 2000. **78**(2): p. 110-7.
194. Hogquist, K.A., et al., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. Cell, 1994. **76**(1): p. 17-27.
195. Elsner, L., et al., *The heat shock protein HSP70 promotes mouse NK cell activity against tumors that express inducible NKG2D ligands*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5523-33.
196. Ljunggren, H.G., et al., *The RMA-S lymphoma mutant; consequences of a peptide loading defect on immunological recognition and graft rejection*. Int J Cancer Suppl, 1991. **6**: p. 38-44.
197. Alkins, R., et al., *Focused ultrasound delivers targeted immune cells to metastatic brain tumors*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1892-9.
198. Susaki, E.A., et al., *Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis*. Cell, 2014. **157**(3): p. 726-39.

199. Abe, J., et al., *Light sheet fluorescence microscopy for in situ cell interaction analysis in mouse lymph nodes*. J Immunol Methods, 2016. **431**: p. 1-10.
200. Moalli, F., et al., *Thromboxane A2 acts as tonic immunoregulator by preferential disruption of low-avidity CD4+ T cell-dendritic cell interactions*. J Exp Med, 2014. **211**(13): p. 2507-17.
201. Stein, J.V. and F.G. S., *Dynamic intravital imaging of cell-cell interactions in the lymph node*. J Allergy Clin Immunol, 2017. **139**(1): p. 12-20.
202. Dehlin, M., et al., *Intra-articular fms-like tyrosine kinase 3 ligand expression is a driving force in induction and progression of arthritis*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3633.
203. Uhrberg, M., *The CD107 mobilization assay: viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells*. Leukemia, 2005. **19**(5): p. 707-9.
204. Gharib, A., et al., *Preparation, characterization and in vitro efficacy of magnetic nanoliposomes containing the artemisinin and transferrin*. Daru, 2014. **22**: p. 44.
205. Wu, W., Q. He, and C. Jiang, *Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis and surface functionalization strategies*. Nanoscale Res Lett, 2008. **3**(11): p. 397-415.
206. Pankhurst, G., et al., *Characterization of specifically oxidized apolipoproteins in mildly oxidized high density lipoprotein*. J Lipid Res, 2003. **44**(2): p. 349-55.
207. Villanueva, A., et al., *The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells*. Nanotechnology, 2009. **20**(11): p. 115103.
208. Gutierrez, L., et al., *Degradation of magnetic nanoparticles mimicking lysosomal conditions followed by AC susceptibility*. Biomed Tech (Berl), 2015. **60**(5): p. 417-25.
209. Ottersbach, A., et al., *Improved heart repair upon myocardial infarction: Combination of magnetic nanoparticles and tailored magnets strongly increases engraftment of myocytes*. Biomaterials, 2018. **155**: p. 176-190.
210. Mulens-Arias, V., et al., *Polyethylenimine-coated SPION exhibits potential intrinsic anti-metastatic properties inhibiting migration and invasion of pancreatic tumor cells*. J Control Release, 2015. **216**: p. 78-92.
211. Rojas, J.M., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake alters M2 macrophage phenotype, iron metabolism, migration and invasion*. Nanomedicine, 2016. **12**(4): p. 1127-1138.
212. Hunter, M.C., A. Teijeira, and C. Halin, *T Cell Trafficking through Lymphatic Vessels*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 613.
213. Shapiro, B., K. Dormer, and I.B. Rutel, *A Two-Magnet System to Push Therapeutic Nanoparticles*. AIP Conf Proc, 2010. **1311**(1): p. 77-88.
214. Il'yashenko E. I., G.V.A., Glebov A. V., Skjeltorp A. T., Johansen T. H., *Permanent magnet systems with a strong stray magnetic fields and very high gradients for material separation*. Physica Status Solidi, 2006. **203**(7): p. 5.
215. Debes, G.F., et al., *Chemokine receptor CCR7 required for T lymphocyte exit from peripheral tissues*. Nat Immunol, 2005. **6**(9): p. 889-94.
216. Campbell, J.J. and E.C. Butcher, *Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 336-41.
217. Forster, R., A. Braun, and T. Worbs, *Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics*. Trends Immunol, 2012. **33**(6): p. 271-80.
218. Albuquerque, W.W., et al., *Evidences of the static magnetic field influence on cellular systems*. Prog Biophys Mol Biol, 2016. **121**(1): p. 16-28.
219. Dini, L. and L. Abbro, *Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures*. Micron, 2005. **36**(3): p. 195-217.
220. Rosen, A.D., *Mechanism of action of moderate-intensity static magnetic fields on biological systems*. Cell Biochem Biophys, 2003. **39**(2): p. 163-73.

221. Parkhurst, M.R., et al., *Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(19): p. 6287-97.
222. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 239-52.
223. Tam, Y.K., et al., *Characterization of genetically altered, interleukin 2-independent natural killer cell lines suitable for adoptive cellular immunotherapy*. Hum Gene Ther, 1999. **10**(8): p. 1359-73.
224. Tam, Y.K., et al., *Immunotherapy of malignant melanoma in a SCID mouse model using the highly cytotoxic natural killer cell line NK-92*. J Hematother, 1999. **8**(3): p. 281-90.
225. Rezvani, K. and R.H. Rouse, *The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 578.
226. Li, Y., et al., *NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical application*. Sci China Life Sci, 2015. **58**(12): p. 1233-45.
227. Oberoi, P. and W.S. Wels, *Arming NK cells with enhanced antitumor activity: CARs and beyond*. Oncoimmunology, 2013. **2**(8): p. e25220.
228. Chen, Y., et al., *Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB-zeta or CD64-BB-zeta receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody*. Oncotarget, 2017. **8**(23): p. 37128-37139.
229. Cheng, M., et al., *Natural killer cell lines in tumor immunotherapy*. Front Med, 2012. **6**(1): p. 56-66.
230. Arai, S., et al., *Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial*. Cytotherapy, 2008. **10**(6): p. 625-32.
231. Smyth, M.J., et al., *New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 850-61.
232. Hendrickx, A. and X. Bossuyt, *Quantification of the leukocyte common antigen (CD45) in mature B-cell malignancies*. Cytometry, 2001. **46**(6): p. 336-9.
233. Orange, J.S., et al., *The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(24): p. 14151-6.
234. Alter, G., J.M. Malenfant, and M. Altfeld, *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods, 2004. **294**(1-2): p. 15-22.
235. Al-Hubeshy, Z.B., et al., *A rapid method for assessment of natural killer cell function after multiple receptor crosslinking*. J Immunol Methods, 2011. **366**(1-2): p. 52-9.
236. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 73-91.
237. Bernardini, G., G. Sciume, and A. Santoni, *Differential chemotactic receptor requirements for NK cell subset trafficking into bone marrow*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 12.
238. Chavakis, E., E.Y. Choi, and T. Chavakis, *Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade*. Thromb Haemost, 2009. **102**(2): p. 191-7.
239. Kaluza, K.M., et al., *Adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes targeting two different antigens limits antigen loss and tumor escape*. Hum Gene Ther, 2012. **23**(10): p. 1054-64.
240. Kratky, W., et al., *Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8+ T-cell priming and tumor vaccination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(42): p. 17414-9.
241. Thompson, E.D., et al., *Tumor masses support naive T cell infiltration, activation, and differentiation into effectors*. J Exp Med, 2010. **207**(8): p. 1791-804.
242. Shrikant, P. and M.F. Mescher, *Control of syngeneic tumor growth by activation of CD8+ T cells: efficacy is limited by migration away from the site and induction of nonresponsiveness*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2858-66.
243. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.

244. Edelmann, S.L., P. Marconi, and T. Brocker, *Peripheral T cells re-enter the thymus and interfere with central tolerance induction*. J Immunol, 2011. **186**(10): p. 5612-9.
245. Miyagawa, F., et al., *The use of mouse models to better understand mechanisms of autoimmunity and tolerance*. J Autoimmun, 2010. **35**(3): p. 192-8.
246. Safi R., S.H., *Physics, chemistry and synthesis methods of nanostructured bismuth ferrite (BiFeO₃) as a ferroelectro-magnetic material*. Progress in Solid State Chemistry, 2012. **40**(1-2): p. 6-15.
247. Patil, R.M., et al., *Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles*. Biochem Biophys Rep, 2018. **13**: p. 63-72.
248. Singh, N., et al., *Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)*. Nano Rev, 2010. **1**.
249. Pisanic, T.R., 2nd, et al., *Nanotoxicity of iron oxide nanoparticle internalization in growing neurons*. Biomaterials, 2007. **28**(16): p. 2572-81.
250. Xu, Y., et al., *The responses of immune cells to iron oxide nanoparticles*. J Appl Toxicol, 2016. **36**(4): p. 543-53.
251. Gaharwar, U.S., R. Meena, and P. Rajamani, *Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes*. J Appl Toxicol, 2017. **37**(10): p. 1232-1244.
252. Zupke, O., et al., *Nanoparticles and antigen-specific T-cell therapeutics: a comprehensive study on uptake and release*. Nanomedicine (Lond), 2015. **10**(7): p. 1063-76.
253. Shah, A. and M.A. Dobrovolskaia, *Immunological effects of iron oxide nanoparticles and iron-based complex drug formulations: Therapeutic benefits, toxicity, mechanistic insights, and translational considerations*. Nanomedicine, 2018. **14**(3): p. 977-990.
254. Strehl, C., et al., *Effects of PVA-coated nanoparticles on human T helper cell activity*. Toxicol Lett, 2016. **245**: p. 52-8.
255. Easo, S.L. and P.V. Mohanan, *Toxicological evaluation of dextran stabilized iron oxide nanoparticles in human peripheral blood lymphocytes*. Biointerphases, 2016. **11**(4): p. 04B302.
256. Unterweger, H., et al., *Dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging: evaluation of size-dependent imaging properties, storage stability and safety*. Int J Nanomedicine, 2018. **13**: p. 1899-1915.
257. Elias, A. and A. Tsourkas, *Imaging circulating cells and lymphoid tissues with iron oxide nanoparticles*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 720-6.
258. Smirnov, P., et al., *In vivo cellular imaging of lymphocyte trafficking by MRI: a tumor model approach to cell-based anticancer therapy*. Magn Reson Med, 2006. **56**(3): p. 498-508.
259. Anderson, S.A., et al., *Magnetic resonance imaging of labeled T-cells in a mouse model of multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2004. **55**(5): p. 654-9.
260. Dodd, C.H., et al., *Normal T-cell response and in vivo magnetic resonance imaging of T cells loaded with HIV transactivator-peptide-derived superparamagnetic nanoparticles*. J Immunol Methods, 2001. **256**(1-2): p. 89-105.
261. Mallett, C.L., et al., *Migration of iron-labeled KHYG-1 natural killer cells to subcutaneous tumors in nude mice, as detected by magnetic resonance imaging*. Cytotherapy, 2012. **14**(6): p. 743-51.
262. Meier, R., et al., *Depicting adoptive immunotherapy for prostate cancer in an animal model with magnetic resonance imaging*. Magn Reson Med, 2011. **65**(3): p. 756-63.
263. Daldrop-Link, H.E., et al., *In vivo tracking of genetically engineered, anti-HER2/neu directed natural killer cells to HER2/neu positive mammary tumors with magnetic resonance imaging*. Eur Radiol, 2005. **15**(1): p. 4-13.
264. Chao, T., H. Wang, and P.C. Ho, *Mitochondrial Control and Guidance of Cellular Activities of T Cells*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 473.

265. Gardiner, C.M. and D.K. Finlay, *What Fuels Natural Killers? Metabolism and NK Cell Responses*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 367.
266. Baixauli, F., et al., *The mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 modulates T-cell receptor signalling at the immune synapse*. *EMBO J*, 2011. **30**(7): p. 1238-50.
267. Sena, L.A., et al., *Mitochondria are required for antigen-specific T cell activation through reactive oxygen species signaling*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 225-36.
268. Huang, G., et al., *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy*. *Theranostics*, 2013. **3**(2): p. 116-26.
269. Voinov, M.A., et al., *Surface-mediated production of hydroxyl radicals as a mechanism of iron oxide nanoparticle biotoxicity*. *J Am Chem Soc*, 2011. **133**(1): p. 35-41.
270. Buck, M.D., D. O'Sullivan, and E.L. Pearce, *T cell metabolism drives immunity*. *J Exp Med*, 2015. **212**(9): p. 1345-60.
271. Zupke, O., et al., *Preservation of dendritic cell function upon labeling with amino functionalized polymeric nanoparticles*. *Biomaterials*, 2010. **31**(27): p. 7086-95.
272. Lunov, O., et al., *Differential uptake of functionalized polystyrene nanoparticles by human macrophages and a monocytic cell line*. *ACS Nano*, 2011. **5**(3): p. 1657-69.
273. He, C., et al., *Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles*. *Biomaterials*, 2010. **31**(13): p. 3657-66.
274. Waiczies, S., T. Niendorf, and G. Lombardi, *Labeling of cell therapies: How can we get it right?* *Oncoimmunology*, 2017. **6**(10): p. e1345403.
275. Zhao, Y., et al., *High-efficiency transfection of primary human and mouse T lymphocytes using RNA electroporation*. *Mol Ther*, 2006. **13**(1): p. 151-9.
276. Goffinet, C. and O.T. Keppler, *Efficient nonviral gene delivery into primary lymphocytes from rats and mice*. *FASEB J*, 2006. **20**(3): p. 500-2.
277. Volpers, C. and S. Kochanek, *Adenoviral vectors for gene transfer and therapy*. *J Gene Med*, 2004. **6 Suppl 1**: p. S164-71.
278. Huang, H., et al., *Transient transfection of primary T helper cells by particle-mediated gene transfer*. *J Immunol Methods*, 1998. **215**(1-2): p. 173-7.
279. Ebert, O., et al., *Lymphocyte apoptosis: induction by gene transfer techniques*. *Gene Ther*, 1997. **4**(4): p. 296-302.
280. Cron, R.Q., et al., *Consistent transient transfection of DNA into non-transformed human and murine T-lymphocytes*. *J Immunol Methods*, 1997. **205**(2): p. 145-50.
281. Murata, K., et al., *Rat primary T cells expressing HTLV-I tax gene transduced by a retroviral vector: in vitro and in vivo characterization*. *Int J Cancer*, 1996. **68**(1): p. 102-8.
282. Lankoff, A., et al., *Effect of surface modification of silica nanoparticles on toxicity and cellular uptake by human peripheral blood lymphocytes in vitro*. *Nanotoxicology*, 2013. **7**(3): p. 235-50.
283. Smirnov, P., *Cellular magnetic resonance imaging using superparamagnetic anionic iron oxide nanoparticles: applications to in vivo trafficking of lymphocytes and cell-based anticancer therapy*. *Methods Mol Biol*, 2009. **512**: p. 333-53.
284. Panariti, A., G. Misericocchi, and I. Rivolta, *The effect of nanoparticle uptake on cellular behavior: disrupting or enabling functions?* *Nanotechnol Sci Appl*, 2012. **5**: p. 87-100.
285. Kralj S., R.M., Romih R., Jagodic M., Kos J., Makovec D., *Effect of surface charge on the cellular uptake of fluorescent magnetic nanoparticles*. *Journal of Nanoparticle Research*, 2012. **12**: p. 1-14.
286. Yue, Z.G., et al., *Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles*. *Biomacromolecules*, 2011. **12**(7): p. 2440-6.
287. Zhao, F., et al., *Cellular uptake, intracellular trafficking, and cytotoxicity of nanomaterials*. *Small*, 2011. **7**(10): p. 1322-37.
288. Verma, A. and F. Stellacci, *Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions*. *Small*, 2010. **6**(1): p. 12-21.

289. Orr, G., et al., *Syndecan-1 mediates the coupling of positively charged submicrometer amorphous silica particles with actin filaments across the alveolar epithelial cell membrane*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009. **236**(2): p. 210-20.
290. Patil, S., et al., *Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential*. *Biomaterials*, 2007. **28**(31): p. 4600-7.
291. Forest, V. and J. Pourchez, *Preferential binding of positive nanoparticles on cell membranes is due to electrostatic interactions: A too simplistic explanation that does not take into account the nanoparticle protein corona*. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 2017. **70**(Pt 1): p. 889-896.
292. Yallapu, M.M., et al., *Implications of protein corona on physico-chemical and biological properties of magnetic nanoparticles*. *Biomaterials*, 2015. **46**: p. 1-12.
293. Pyshnaya, I.A., et al., *Comparison of behaviour in different liquids and in cells of gold nanorods and spherical nanoparticles modified by linear polyethyleneimine and bovine serum albumin*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 908175.
294. A., K., *Study of the effects of protein corona on nanoparticle-membrane interactions*. 2013.
295. Ehrenberg, M.S., et al., *The influence of protein adsorption on nanoparticle association with cultured endothelial cells*. *Biomaterials*, 2009. **30**(4): p. 603-10.
296. Saptarshi, S.R., A. Duschl, and A.L. Lopata, *Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle*. *J Nanobiotechnology*, 2013. **11**: p. 26.
297. Meissner T., P.A., Richter V., *Suspension characterization as important key for toxicological investigations*. *Journal of Physics: Conference Series*, 2009. **170**.
298. Docter, D., et al., *The protein corona protects against size- and dose-dependent toxicity of amorphous silica nanoparticles*. *Beilstein J Nanotechnol*, 2014. **5**: p. 1380-92.
299. Lesniak, A., et al., *Effects of the presence or absence of a protein corona on silica nanoparticle uptake and impact on cells*. *ACS Nano*, 2012. **6**(7): p. 5845-57.
300. Lesniak, A., et al., *Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake*. *Biomaterials*, 2010. **31**(36): p. 9511-8.
301. Meng, Y., et al., *External magnetic field promotes homing of magnetized stem cells following subcutaneous injection*. *BMC Cell Biol*, 2017. **18**(1): p. 24.
302. Liao, N., et al., *Poly (dopamine) coated superparamagnetic iron oxide nanocluster for noninvasive labeling, tracking, and targeted delivery of adipose tissue-derived stem cells*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 18746.
303. Xu, Y., et al., *Superparamagnetic MRI probes for in vivo tracking of dendritic cell migration with a clinical 3 T scanner*. *Biomaterials*, 2015. **58**: p. 63-71.
304. Simon-Vazquez, R., et al., *Metal oxide nanoparticles interact with immune cells and activate different cellular responses*. *Int J Nanomedicine*, 2016. **11**: p. 4657-4668.
305. Perica, K., et al., *Magnetic field-induced T cell receptor clustering by nanoparticles enhances T cell activation and stimulates antitumor activity*. *ACS Nano*, 2014. **8**(3): p. 2252-60.
306. Luo, Y.H., L.W. Chang, and P. Lin, *Metal-Based Nanoparticles and the Immune System: Activation, Inflammation, and Potential Applications*. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 143720.
307. Tay, C.Y., et al., *Nanoparticles strengthen intracellular tension and retard cellular migration*. *Nano Lett*, 2014. **14**(1): p. 83-8.
308. Diana, V., et al., *Dose dependent side effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticle labeling on cell motility in two fetal stem cell populations*. *PLoS One*, 2013. **8**(11): p. e78435.
309. Khaleghian, A., et al., *Effect of inorganic anticancer properties on microtubule organization*. *Pak J Pharm Sci*, 2010. **23**(3): p. 273-8.

310. Soenen, S.J., et al., *High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling*. *Small*, 2010. **6**(7): p. 832-42.
311. Joseph, N., B. Reicher, and M. Barda-Saad, *The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux*. *Biochim Biophys Acta*, 2014. **1838**(2): p. 557-68.
312. Dixit, N., et al., *Leukocyte function antigen-1, kindlin-3, and calcium flux orchestrate neutrophil recruitment during inflammation*. *J Immunol*, 2012. **189**(12): p. 5954-64.
313. Dixit, N. and S.I. Simon, *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 188.
314. MacDonald, C., et al., *Time-varied magnetic field enhances transport of magnetic nanoparticles in viscous gel*. *Nanomedicine (Lond)*, 2010. **5**(1): p. 65-76.
315. Kolosnjaj-Tabi, J., et al., *Cell labeling with magnetic nanoparticles: opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation*. *J Nanobiotechnology*, 2013. **11 Suppl 1**: p. S7.
316. Asperti-Boursin, F., et al., *CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner*. *J Exp Med*, 2007. **204**(5): p. 1167-79.
317. Wei, S.H., et al., *Ca²⁺ signals in CD4⁺ T cells during early contacts with antigen-bearing dendritic cells in lymph node*. *J Immunol*, 2007. **179**(3): p. 1586-94.
318. Zablotskii, V., et al., *How a High-Gradient Magnetic Field Could Affect Cell Life*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 37407.
319. Kobukai, S., et al., *Magnetic nanoparticles for imaging dendritic cells*. *Magn Reson Med*, 2010. **63**(5): p. 1383-90.
320. Goya, G.F., et al., *Dendritic cell uptake of iron-based magnetic nanoparticles*. *Cell Biol Int*, 2008. **32**(8): p. 1001-5.
321. Samy, E.T., et al., *Continuous control of autoimmune disease by antigen-dependent polyclonal CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the regional lymph node*. *J Exp Med*, 2005. **202**(6): p. 771-81.
322. Ozga, A.J., et al., *pMHC affinity controls duration of CD8⁺ T cell-DC interactions and imprints timing of effector differentiation versus expansion*. *J Exp Med*, 2016. **213**(12): p. 2811-2829.
323. Schell, A.M., et al., *Dendritic cell migration limits the duration of CD8⁺ T-cell priming to peripheral viral antigen*. *J Virol*, 2010. **84**(7): p. 3586-94.
324. Celli, S., F. Lemaitre, and P. Bousso, *Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions in vivo reveals the importance of prolonged contacts for CD4⁺ T cell activation*. *Immunity*, 2007. **27**(4): p. 625-34.
325. Sabado, R.L. and N. Bhardwaj, *Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment*. *Immunotherapy*, 2010. **2**(1): p. 37-56.
326. Mandl, J.N., et al., *Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(44): p. 18036-41.
327. Janic, B., et al., *Optimization and validation of FePro cell labeling method*. *PLoS One*, 2009. **4**(6): p. e5873.
328. Iida, H., et al., *Preparation of human immune effector T cells containing iron-oxide nanoparticles*. *Biotechnol Bioeng*, 2008. **101**(6): p. 1123-8.
329. Kircher, M.F., et al., *In vivo high resolution three-dimensional imaging of antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte trafficking to tumors*. *Cancer Res*, 2003. **63**(20): p. 6838-46.
330. Galli, F., S. Histed, and O. Aras, *NK cell imaging by in vitro and in vivo labelling approaches*. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 2014. **58**(3): p. 276-83.
331. Billadeau, D.D., et al., *NKG2D-DAP10 triggers human NK cell-mediated killing via a Syk-independent regulatory pathway*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(6): p. 557-64.

332. Wu, J., et al., *DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells*. *J Exp Med*, 2000. **192**(7): p. 1059-68.
333. Rotariu O., S.N.J.C., *Modelling magnetic carrier particle targeting in the tumor microvasculature for cancer treatment*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 2005. **293**: p. 639-646.
334. Garris, C.S., et al., *Sphingosine-1-phosphate receptor 1 signalling in T cells: trafficking and beyond*. *Immunology*, 2014. **142**(3): p. 347-53.
335. Cyster, J.G. and S.R. Schwab, *Sphingosine-1-phosphate and lymphocyte egress from lymphoid organs*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 69-94.
336. Schwab, S.R., et al., *Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients*. *Science*, 2005. **309**(5741): p. 1735-9.
337. Brinkmann, V. and K.R. Lynch, *FTY720: targeting G-protein-coupled receptors for sphingosine 1-phosphate in transplantation and autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 2002. **14**(5): p. 569-75.
338. Bankovich, A.J., L.R. Shiow, and J.G. Cyster, *CD69 suppresses sphingosine 1-phosphate receptor-1 (S1P1) function through interaction with membrane helix 4*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(29): p. 22328-37.
339. Shiow, L.R., et al., *CD69 acts downstream of interferon-alpha/beta to inhibit S1P1 and lymphocyte egress from lymphoid organs*. *Nature*, 2006. **440**(7083): p. 540-4.
340. Geng, S., et al., *Induced Regulatory T Cells Superimpose Their Suppressive Capacity with Effector T Cells in Lymph Nodes via Antigen-Specific S1p1-Dependent Egress Blockage*. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 663.
341. Dustin, M.L., et al., *Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(8): p. 3909-13.
342. Dustin, M.L., *T-cell activation through immunological synapses and kinapses*. *Immunol Rev*, 2008. **221**: p. 77-89.
343. Cernuda-Morollon, E., et al., *Rac activation by the T-cell receptor inhibits T cell migration*. *PLoS One*, 2010. **5**(8): p. e12393.
344. Valitutti, S., D. Coombs, and L. Dupre, *The space and time frames of T cell activation at the immunological synapse*. *FEBS Lett*, 2010. **584**(24): p. 4851-7.
345. del Pozo, M.A., et al., *Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway*. *J Cell Biol*, 1995. **131**(2): p. 495-508.
346. Audemard-Verger, A., et al., *Macrophages Induce Long-Term Trapping of gammadelta T Cells with Innate-like Properties within Secondary Lymphoid Organs in the Steady State*. *J Immunol*, 2017. **199**(6): p. 1998-2007.
347. Palecek, S.P., et al., *Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness*. *Nature*, 1997. **385**(6616): p. 537-40.
348. Baeyens, A., et al., *Exit Strategies: S1P Signaling and T Cell Migration*. *Trends Immunol*, 2015. **36**(12): p. 778-787.
349. Haig, D.M., J. Hopkins, and H.R. Miller, *Local immune responses in afferent and efferent lymph*. *Immunology*, 1999. **96**(2): p. 155-63.
350. Steinman, L., *Immunology of relapse and remission in multiple sclerosis*. *Annu Rev Immunol*, 2014. **32**: p. 257-81.
351. Brinkmann, V., et al., *Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis*. *Nat Rev Drug Discov*, 2010. **9**(11): p. 883-97.

XII. ANEXO I

PIES DE FIGURA DE LOS VÍDEOS

Vídeo 1. Secuencia de imágenes del ensayo en cámaras de flujo con células T libres de APS-NPMs (verde), antes y después de la aplicación de un campo magnético externo en la parte superior de la cámara de flujo. Las líneas muestran las trayectorias seguidas por algunas células.

Vídeo 2. Secuencia de imágenes del ensayo en cámaras de flujo con células T asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (verde), antes y después de la aplicación de un campo magnético externo en la parte superior de la cámara de flujo. Las líneas muestran las trayectorias seguidas por algunas células.

Vídeo 3. Secuencia de imágenes del ensayo 2PM que muestran células T libres de APS-NPMs (azul) y células T asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (rojo) en el NL poplíteo, poco después de la transferencia de dichas células en el ratón y en ausencia de un campo magnético externo. Escala: 20 µm.

Vídeo 4. Secuencia de imágenes del ensayo 2PM que muestran células T libres de APS-NPMs (azul) y células T asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (rojo) en el NL poplíteo, poco después de la transferencia de dichas células en el ratón y en presencia de un campo magnético externo. Escala: 20 µm.

Vídeo 5. Secuencia de imágenes del ensayo 2PM que muestran células T libres de APS-NPMs (azul) y células T asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (rojo) en el NL poplíteo, poco después de la transferencia de dichas células en el ratón y en presencia de dos campos magnéticos externos enfrentados. Escala: 20 µm.

Vídeo 6. Secuencia de imágenes del ensayo 2PM que muestran DCs libres de APS-NPMs (azul) y DCs asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (rojo) en el NL poplíteo, 24 horas después de la transferencia de dichas células en el ratón y en ausencia de un campo magnético externo. Escala: 20 µm.

Vídeo 7. Secuencia de imágenes del ensayo 2PM que muestran DCs libres de APS-NPMs (azul) y DCs asociadas con APS-NPMs (150 µg Fe/ml) (rojo) en el NL poplíteo, 24 horas después de la transferencia de dichas células en el ratón y en presencia de un campo magnético externo. Escala: 20 µm.

XIII. ANEXO II

Artículos publicados (o en revisión) durante el desarrollo de esta Tesis

❖ Publicaciones derivadas de la tesis

- ***“T cells loaded with magnetic nanoparticles are retained in peripheral lymph nodes by the application of a magnetic field”***

Sanz-Ortega L, Rojas JM, Marcos A, Portilla Y, Stein JV, Barber DF

J Nanobiotechnology. (Recién aceptado, doi: 10.1186/s12951-019-0440-z)

-> En preparación

- ***“In vitro assessment of magnetic nanoparticles loading on human and murine NK cells to improve their delivery to tumours”***; **Sanz-Ortega L**, Rojas JM, Portilla Y, Barber DF

- ***“In vitro and in vivo targeting of antigen-specific CD8+ T cells using magnetic nanoparticles and external magnetic fields in a tumor model”***; **Sanz-Ortega L**, Portilla Y, Pérez-Yagüe S, Barber DF

❖ Publicaciones relacionadas con la tesis

- ***“Polyethylenimine-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles impair in vitro and in vivo angiogenesis”***

Mulens-Arias V*, Rojas JM*, **Sanz-Ortega L***, Portilla Y, Pérez-Yagüe S, Barber DF

Nanomedicine (En segunda revisión) *Contributed equally to the work

1. ***“Time-course assessment of the aggregation and metabolization of magnetic nanoparticles”***

Rojas JM, Gavilán H, Del Dedo V, Lorente-Sorolla E, **Sanz-Ortega L**, da Silva GB, Costo R, Perez-Yagüe S, Talelli M, Marciello M, Morales MP, Barber DF, Gutiérrez L

Acta Biomater. 2017 Aug;58:181-195. doi: 10.1016/j.actbio.2017.05.047. Epub 2017 May 20.

2. ***“Superparamagnetic iron oxide nanoparticle uptake alters M2 macrophage phenotype, iron metabolism, migration and invasion”***

Rojas JM*, **Sanz-Ortega L***, Mulens-Arias V, Gutiérrez L, Pérez-Yagüe S, Barber DF.

Nanomedicine. 2016 May;12(4):1127-1138. doi: 10.1016/j.nano.2015.11.020. Epub 2015 Dec 28

*Contributed equally to the work

❖ Otras publicaciones

1. ***“PI3K p85B regulatory subunit deficiency does not affect NK cell differentiation and increases NKG2D-mediated activation”***

Rojas JM, Spada R, **Sanz-Ortega L**, Morillas L, Mejías R, Mulens-Arias V, Pérez-Yagüe S, Barber DF

J Leukoc Biol. 2016 Dec;100(6):1285-1296. doi: 10.1189/jlb.1A1215-541RR. Epub 2016 Jul 5

