

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

X
519

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
Código de registro en el Registro Nacional
de Bibliotecas: 67 Fecha: 26 del mes
de Septiembre de 1982
Sevilla, El Jefe del Repositorio de Tesis.

Alena Raffette

OBTENCION DE CELULAS LAK AUTOLOGAS
EN ENFERMOS CON LEUCEMIA AGUDA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

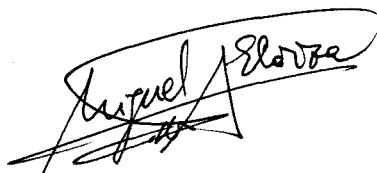
Depositado en
de la
de la Universidad desde el día
de 1982
Sevilla de de 1982
EL DIRECTOR DE

MIGUEL A. ELORZA GUERRERO



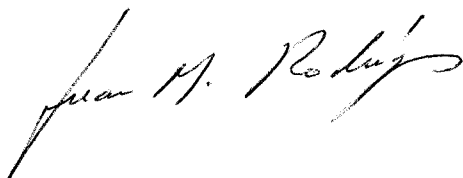
" OBTENCION DE CELULAS LAK AUTOLOGAS
EN ENFERMOS CON LEUCEMIA AGUDA "

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor en
Ciencias Químicas por el Licenciado D. Miguel A. Elorza
Guerrero.



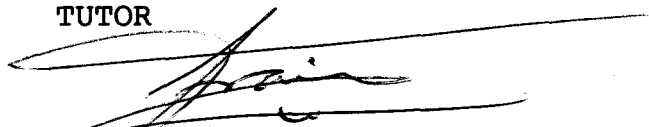
Fdo.: Miguel A. Elorza Guerrero

DIRECTOR



Fdo.: Dr. Juan M. Rodriguez Fernandez
Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital
Universitario "Virgen del Rocio" de Sevilla.

TUTOR

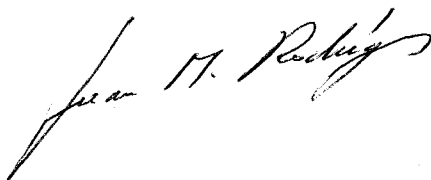


Fdo.: Dr. Francisco Galván Cejudo
Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular.
Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular.
Universidad de Sevilla.

D. JUAN M. RODRIGUEZ FERNANDEZ, Jefe del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario "Virgen del Rocio" de Sevilla,

CERTIFICA : Que el presente trabajo de investigación titulado "Obtención de células LAK autólogas en enfermos con Leucemia Aguda", constituye la Memoria presentada por el Licenciado Miguel A. Elorza Guerrero para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas. Dicho trabajo ha sido realizado bajo mi dirección en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario "Virgen del Rocio" de Sevilla, reuniendo a mi juicio las condiciones necesarias para su presentación.

Y para que conste, firmo el presente certificado en Sevilla, a 1 de Septiembre de 1992.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Juan M. Rodriguez Fernandez', written in a cursive style.

Fdo.: Dr. Juan M. Rodriguez Fernandez

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Todo trabajo científico no puede concebirse como el esfuerzo de una sola persona, sino más bien de todo un equipo. Por ello quisiera expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma han hecho posible su conclusión.

En primer lugar desearía hacer constar mi agradecimiento al Dr. D. Juan M. Rodriguez Fernandez, no solo por la dirección de esta tesis, sino también por su apoyo y estímulo en todo momento.

Agradezco la colaboración de todo el Personal del Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario "Virgen del Rocio" de Sevilla, donde se ha realizado el trabajo; y en especial al Dr. Antonio Parrado, Dra. Magdalena Carmona, Dr. Manuel Ruiz, y Dra. Pilar Noguero, por su colaboración directa y eficaz.

Al Dr. David Garcia Solis y al Servicio de Medicina Nuclear de dicho Hospital agradezco su cooperación en el manejo de radioisótopos.

Agradezco al Profesor D. Francisco Galván Cejudo el aceptar la tutoría de esta tesis, y al Departamento de Bioquímica Vegetal y Biología Molecular de la Universidad de Sevilla su colaboración en la presentación de la misma.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de las Islas Baleares y muy especialmente al Profesor D. Félix Grases Freixedas agradezco su inestimable apoyo y colaboración en la realización de los Cursos de Doctorado.

Al Dr. Félix López Elorza agradezco su colaboración y labor crítica en la redacción de la tesis.

Agradezco la comprensión y apoyo mostrados a la Dra. María Riesco Prieto y a los miembros del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital "Son Dureta" de Palma de Mallorca con quienes trabajo actualmente.

Este trabajo, en parte ha podido ser realizado gracias a la Beca de Investigación nº 88/1983 del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (F.I.S.S.), concedida al Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario "Virgen del Rocío" de Sevilla.

ABREVIATURAS

BAS	Basófilos
CMN	Células mononucleares
cpm	Cuentas por minuto
CPP	Plasma pobre en componentes
CRP	Plasma rico en componentes
CTL	Linfocitos T citotóxicos
DE	Desviación estandard
EC	Eficiencia de recolección
E:D	Proporción efector-diana
EOS	Eosinófilos
FAB	Grupo Franco-Americano-Británico
GRA	Granulocitos
Hb	Hemoglobina
HEM	Hematíes
HTC	Hematocrito
IL-2	Interleukina-2
LAK	Células "Killer" activadas por linfoquinas
LEU	Leucocitos
LIN	Linfocitos
LGL	Linfocitos grandes granulares
LLA	Leucémia linfoblástica aguda
LMA	Leucémia mieloblástica aguda
MON	Monocitos
NEU	Neutrófilos
NK	Células "natural Killer"
NSD	No significativamente diferente
PLQ	Plaquetas
PRBC	Plasma rico en hematíes
SD	Significativamente diferente

INDICE

I. INTRODUCCION	1
I-1) Breve historia de la inmunoterapia antitumoral	2
I-2) Antecedentes y estado actual de la terapia antitumoral	4
I-2.1) La cirugia en la terapia antitumoral	4
I-2.2) La radioterapia antitumoral	8
I-2.3) La quimioterapia antitumoral	10
I-2.4) La inmunoterapia antitumoral	12
I-3) Oncogénesis	15
I-4) Respuesta inmunológica frente a células tumorales	19
I-4.1) Generalidades	19
I-4.2) Respuesta inmune celular	22
I-4.3) Respuesta inmune humoral	27
I-5) Linfoquinas	28
I-5.1) Generalidades	28
I-5.2) Interleukina-2	30
I-5.3) Acción de la IL-2	32
I-6) Inmunoterapia adoptiva del cáncer con células LAK	34
I-6.1) Ventajas de la inmunoterapia adoptiva	34
I-6.2) Células LAK en el ratón	35
I-6.3) Células LAK humanas	37
I-6.4) Toxicidad del tratamiento	39
I-6.5) Pasado, presente y futuro del tratamiento con células LAK	39

II. OBJETIVOS	45
III. MATERIAL Y METODO	48
III-1) Material	49
III-1.1) Reactivos	50
III-1.2) Equipos de laboratorio	52
III-1.3) Enfermos y donantes	55
III-2) Método	58
III-2.1) Obtención de células mononucleares en el separador celular	59
III-2.1.1) Separador celular CS-3000	59
III-2.1.2) Método de obtención de células mononucleares en el separador celular	66
III-2.1.3) Optimización del programa de obtención de células mononucleares en el separador	71
III-2.1.4) Obtención de células mononucleares de bolsas de donantes.	72
III-2.1.5) Obtención de células mononucleares de enfermos leucémicos	73
III-2.2) Obtención de células LAK	75
III-2.2.1) Método de obtención y congelación de blastos leucémicos	75
III-2.2.2) Obtención y congelación de blastos de enfermos leucémicos	78
III-2.2.3) Cultivo de líneas celulares K-562 y Daudi	78

III-2.2.4) Método de cultivo de células mononucleares con IL-2	79
III-2.2.5) Obtención de células LAK de enfermos y donantes	80
III-2.2.6) Método de cuantificación de la actividad NK y LAK	81
III-2.2.7) Cuantificación de la actividad NK y LAK .	86
III-2.3) Tratamiento estadístico	87
IV. RESULTADOS	88
IV-1) Obtención de células mononucleares en el separador celular	89
IV-1.1) Obtención de células mononucleares de bolsas de donantes	90
IV-1.2) Obtención de células mononucleares de enfermos leucémicos	95
IV-2) Obtención de células LAK	101
IV-2.1) Obtención y congelación de blastos leucémicos	102
IV-2.2) Actividades citolíticas NK y LAK frente a células tumorales	105
IV-2.2.1) Actividad citolítica de donantes sanos . .	105
IV-2.2.2) Actividad citolítica de enfermos con leucemia aguda	111
IV-2.2.3) Comparación de las actividades citolíticas de enfermos y donantes sanos	128

IV-2.2.4) Sensibilidad de los blastos leucémicos a las células LAK autólogas y alogénicas . . .	136
V. DISCUSION	138
V-1) Obtención de células mononucleares en el separador celular	141
V-2) Actividad citolítica de las células LAK	154
VI. CONCLUSIONES	166
VII. BIBLIOGRAFIA	172

I. INTRODUCCION

I-1) BREVE HISTORIA DE LA INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL.

La inmunoterapia puede definirse en términos generales como una terapia basada en la utilización del sistema inmunológico o sus productos para controlar, dañar, o destruir células malignas en los enfermos neoplásicos (1).

Puede considerarse que la inmunoterapia humana comenzó a finales del siglo XIX cuando Busch y Coley observaron que las infecciones estreptocócicas podían causar necrosis en tumores humanos (2, 3). Al mismo tiempo se fue obteniendo información sobre la especificidad de los anticuerpos y su función en el control de las enfermedades infecciosas. Basándose en estos datos se elaboraron hipótesis sobre el posible papel de los anticuerpos en el control del cáncer (4). Estas hipótesis señalaban que las células tumorales, como consecuencia de la transformación maligna, podían desarrollar antígenos en su superficie (antígenos tumorales) que las hacían antigenicamente distintas de las células normales. De esta forma, los anticuerpos específicos capaces de reconocer estos antígenos podían controlar el crecimiento de las células tumorales.

Desde comienzos del siglo XX aparecen intentos esporádicos de estimular la inmunidad contra las células tumorales en enfermos neoplásicos. Pero fue a mediados del siglo XX cuando Klein utilizó la inmunoterapia de una forma

más sistemática con reacciones de hipersensibilidad retardada provocadas en cánceres cutáneos, obteniendo un alto porcentaje de remisiones permanentes (5-7). A finales de los años sesenta se inician ensayos de inmunoterapia en leucemias y melanomas, comenzando así la era de la inmunoterapia moderna (8, 9).

A partir de aquí se han ido sucediendo una cascada de descubrimientos sobre las respuestas específicas e inespecíficas del sistema inmune que la inmunoterapia ha intentado utilizar para destruir células tumorales. Aunque existe hoy día un gran conocimiento sobre el sistema inmunitario y su respuesta frente a las células tumorales, aún quedan muchas lagunas y dudas sobre el complejo mecanismo de defensa del organismo frente a células malignas. No obstante se tiene el convencimiento de que sólo con el profundo conocimiento de estos mecanismos defensivos se podrá salir victorioso en la lucha contra los tumores.

I-2) ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DE LA TERAPIA
ANTITUMORAL.

I-2.1) LA CIRUGIA EN LA TERAPIA ANTITUMORAL.

La cirugía es el tratamiento más antiguo del cáncer y hasta fechas no muy lejanas fue casi la única opción terapéutica con cierta efectividad. Aunque las primeras referencias acerca del tratamiento quirúrgico de los tumores se hallan en el "Papiro de Edwin Smith" de la dinastía Media Egipcia (1600 años a. de J.C.) (10), la era moderna del tratamiento quirúrgico electivo de tumores empezó en América en 1809, cuando Efrain Macdowell extrajo un tumor ovárico de 10 Kg de una enfermo que sobrevivió 30 años (11). Sin embargo, el progreso de la cirugía en el tratamiento de tumores dependió de dos tipos de avances (12):

1) la introducción de la anestesia general con éter por los dentistas William Morton y Crawford Long

2) la introducción de los principios de antisepsia por Joseph Lister en 1867.

Los desarrollos en la técnica quirúrgica siguieron un ritmo rápido (13) y las innovaciones técnicas modernas han llevado al cirujano a una gran variedad de campos.

Respecto al tratamiento quirúrgico de las leucemias, el trasplante de médula ósea ocupa actualmente un lugar indiscutible en la clínica asistencial, aunque se sigue investigando en otras direcciones para rebajar la tasa de rechazo y dominar la enfermedad del injerto contra huésped. Podemos clasificar los trasplantes de médula ósea en tres tipos principales atendiendo a las diferencias inmunológicas entre el receptor y el donante: autotrasplante, trasplante isogénico o singénico, y trasplante alogénico (14).

I.2.1.1) Autotrasplante.

El autotrasplante de médula ósea tiene la ventaja sobre los demás tipos de trasplantes de poder aplicarse no sólo a las hemopatías malignas sino también a una amplia variedad de tumores sólidos. Su mayor limitación radica en la posibilidad de que la médula en remisión posea algunas células tumorales con el riesgo de restablecer el proceso maligno en el enfermo. Por ello se han desarrollado diversas técnicas con el fin de eliminar "in vitro" tales células de la médula mediante el uso de anticuerpos más complemento, anticuerpos conjugados a toxinas celulares, y agentes quimioterápicos (4-hidroperoxi-ciclofosfamida (4-HC) y mafosfamida (Asta-Z-7557)). No obstante el tratamiento "in vitro" no es totalmente efectivo en la eliminación de todas las células tumorales.

La experiencia clínica del autotrasplante en tumores sólidos es todavía escasa. Actualmente está indicado en aquellos tumores quimiosensibles tales como neuroblastomas, carcinoma embrionario de ovario o testículo, sarcoma de Ewing, así como en carcinoma de mama con receptor de estrógenos negativos, etc; esta indicación está aumentando rápidamente. En las hemopatías malignas los estudios iniciales en linfomas fueron realizados en enfermos sin ninguna posibilidad con la terapia convencional.

El porcentaje de recaídas no es diferente del observado mediante el trasplante alogénico o singénico en enfermos similares. En la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se han utilizado altas dosis de quimioterapia más irradiación corporal total, seguida por médula autóloga en remisión tratada "in vitro" con anticuerpos y complemento, en niños en segunda remisión. Así se han obtenido del 25 al 35% de supervivencia en remisión completa (15, 16). También se han obtenido resultados similares a los conseguidos con trasplante de médula alogénica, mediante médula autóloga tratada con 4-HC en enfermos de leucemia aguda no linfoblástica en segunda y tercera remisión (17).

I-2.1.2) Trasplante singénico y alogénico.

Entre las complicaciones que se dan hay que destacar por su gravedad y complejidad las derivadas directamente de la irradiación y los citostáticos, las infecciones, y la enfermedad del injerto contra huésped (18). Este trasplante está indicado en algunos casos de anemia aplásica, leucemia aguda, leucemia mieloide crónica e inmunodeficiencia combinada grave.

Aproximadamente sólo un 25% de los casos de anemia aplásica puede beneficiarse potencialmente del trasplante al disponer de hermano compatible. De estos casos se alcanzan largas supervivencias en el 80% de los niños y enfermos menores de 30 años, en el 50% de los comprendidos entre 30 y 50 años, y en muy pocos casos por encima de esa edad (19-21). En las leucemias agudas el trasplante de médula ósea cura a algunos enfermos, pero la fracción de ellos que sobreviven continúa siendo pequeña, debido principalmente a las complicaciones del trasplante (22, 23). En la leucemia mieloide crónica el trasplante logra una supervivencia a largo plazo de aproximadamente el 60%, mientras que en la fase blástica es solamente del 10% (24). En la inmunodeficiencia combinada grave la supervivencia es de un 29% entre 6 y 92 meses tras el injerto.

I-2.2) LA RADIOTERAPIA ANTITUMORAL.

Considerando que las células hematopoyéticas son muy sensibles a las radiaciones, en un principio se podría pensar que ésta es la mejor solución para el tratamiento de las leucemias, pero dada la falta de selectividad esta terapia está muy limitada en el tratamiento de hemopatías proliferativas. El avance de la quimioterapia ha hecho que la radioterapia haya desaparecido como única alternativa terapéutica de los tumores hematológicos, y sólo en estados iniciales de linfomas y en casos poco habituales de localización como el mieloma solitario la radiación es la terapéutica elegida.

No obstante, la radioterapia sigue teniendo su indiscutible importancia por la existencia de agrupaciones celulares poco vascularizadas que difícilmente reciben la acción de los citostáticos, la existencia de barreras biológicas frente a fármacos, y la selección de cepas celulares resistentes a la quimioterapia (25).

Actualmente en la terapia leucémica las radiaciones pueden utilizarse como tratamiento locorregional complementario de la quimioterapia y como tratamiento sistémico en forma de irradiación corporal total en la preparación para el trasplante de médula ósea. Esta irradiación corporal total sólo es útil acompañada de

quimioterapia intensiva y administrada con dosis supraletales en la preparación para el trasplante (26).

I-2.2.1) Toxicidad de la radioterapia.

La toxicidad de la radioterapia en el tratamiento del cáncer depende de múltiples factores. Aproximadamente el 80% de los enfermos con cáncer necesitan radioterapia en el curso de la evolución de la enfermedad (27).

Los efectos de las radiaciones ionizantes sobre los tejidos vivos pueden ser agudos o crónicos:

a) Los efectos agudos dependen de la relación entre células dañadas letalmente y la replicación celular compensadora a través de las células germinales proliferantes.

b) Los efectos crónicos son secundarios a una capacidad disminuida proliferante en las células germinales secundaria a la irradiación (28, 29).

La toxicidad de la radioterapia condiciona el empleo de otras modalidades terapéuticas oncológicas :

1º) la quimioterapia queda limitada por irradiaciones extensas e intensas de volúmenes con gran contenido en médula ósea.

2º) la cirugía de rescate debe realizarse con una detenida evaluación del tratamiento radioterápico previo.

I-2.3) LA QUIMIOTERAPIA ANTITUMORAL.

Para conocer los orígenes de la quimioterapia hay que remontarse a los años cincuenta donde se aplicaron los primeros agentes antitumorales como la mostaza nitrogenada, metotrexato y 6-mercaptopurina. Se obtuvieron remisiones completas por primera vez, aunque de escasa duración. En los años sesenta se descubrieron muchas clases de fármacos como los derivados de la Vinca (Vinblastina y Vincristina), antracíclicos (Daunomicina y Adriamicina), L-asparaginasa y arabinósido de citosina. Se estableció además la importancia del tratamiento de mantenimiento con 6-mercaptopurina y metotrexato en la leucemia linfoblástica aguda. En los años setenta no hubo un gran desarrollo de nuevos fármacos, sin embargo surgieron varios métodos efectivos de profilaxis del sistema nervioso central en la LLA aumentando el porcentaje de largas supervivencias y curas al 50% (30). A finales de la década de los setenta y comienzo de los ochenta se difunden nuevos citostáticos activos como las nitrosoureas, epipodofilinas, m-Amsa y mitoxantrona. Se diseñan tratamientos de gran agresividad, con un incremento de la mielodepresión y de las complicaciones metabólicas, sépticas y hemorrágicas, aumentando significativamente la media de supervivencia y cura en la LLA infantil hasta el 70-75% (31, 32).

Actualmente para evaluar los logros conseguidos con el empleo de fármacos antitumorales hay que dividir los enfermos en 3 grupos: enfermos con un porcentaje de curabilidad superior al 50%, los que tienen entre el 10 y el 50% , y finalmente los enfermos en los que se ha incrementado la supervivencia aunque las remisiones son escasas (33).

En los enfermos con un porcentaje de curabilidad superior al 50% , la instauración de combinaciones de inducción, consolidación e intensificación prolongada en la LLA ha llevado a un incremento en las largas supervivencias en todos los grupos pronósticos de LLA en niños (31) y adultos (32). Algo similar ha sucedido en la leucemia mieloblástica aguda (LMA) pediátrica cuyo pronóstico se asemeja a la LLA de pronóstico intermedio y malo (34, 35). En el linfoma de Hodgkin el empleo de combinaciones de fármacos asociados o no a la radioterapia produce estadios en los que la curabilidad es del 40 al 50% , con excepción de los IV-B o los pocos casos con histología de deplección linfocitaria (36, 37).

En los enfermos con un porcentaje de curabilidad entre el 10 y el 50% las combinaciones de fármacos con o sin radioterapia han proporcionado un incremento significativo en la supervivencia y curabilidad de la LLA pediátrica de alto riesgo (31), en los linfomas difusos diseminados, en la LLA del adulto (32) y en los linfomas pediátricos

diseminados (38). No obstante a pesar de la agresividad terapéutica, sigue siendo escaso el porcentaje de curabilidad en la LMA del adulto (39).

En el tercer grupo de enfermos con remisiones muy escasas los incrementos en la supervivencia en la última década están más relacionados con el diagnóstico más precoz y el mejor manejo de las complicaciones hemorrágicas, metabólicas (deshidratación, hipercalcemia, hiperuricemia), e infecciones a gérmenes, parásitos, hongos o virus . Estas enfermedades son la leucemia linfática crónica, la leucemia mieloide crónica, el mieloma y los linfomas indolentes. En el momento actual no existe evidencia de que las combinaciones agresivos de fármacos sean más efectivos que la monoterapia en prolongar la supervivencia o aumentar los porcentajes de curación (40-43).

I-2.4) LA INMUNOTERAPIA ANTITUMORAL.

Los avances recientes en el campo de la inmunología y de la biotecnología han abierto nuevas posibilidades para la inmunoterapia del cáncer. El progresivo conocimiento de la naturaleza de las subpoblaciones linfocitarias y el papel de las linfoquinas y las monoquinas han permitido avances considerables en nuestra comprensión de los fenómenos de inmunorregulación. El papel que desempeñan las linfoquinas y

las monoquinas en la respuesta inmunológica comenzó a conocerse con los nuevos avances de la biología molecular y la tecnología de recombinación del ADN. Ello permitió aislar los genes que codifican las síntesis de estas moléculas y conseguir su expresión a nivel de bacterias, con posibilidad de obtener cantidades suficientes de estos productos como para llevar a cabo estudios inmunológicos detallados.

Los intentos iniciales de inmunoterapia antitumoral se basaban en la estimulación inespecífica del sistema inmunológico del huésped, empleando para ello productos tales como el *Bacillus Calmette-Guerin*, su residuo extraído con metanol, o el *Corynebacterium parvum*, con el propósito potenciar la respuesta inmunológica del huésped contra su enfermedad. Los datos experimentales que apoyan la viabilidad de estas modalidades de tratamiento son muy escasos, y de hecho muchos de los ensayos clínicos llevados a cabo para valorar la eficacia de estos productos y de sustancias afines en el cáncer humano han resultado infructuosos (44). Por ello la inmunoterapia con estos productos ha sido prácticamente abandonada. No obstante ésta es una vía que no hemos de considerar cerrada, ya que también en la actualidad puede ser una alternativa bien por si sola, o combinada con otras terapias.

Según se va profundizando en el conocimiento de las células inmunocompetentes y en los mecanismos que regulan su función, van apareciendo nuevas alternativas en la inmunoterapia tumoral. De esta forma, tras conocerse la función de los linfocitos T en el rechazo frente a los tejidos extraños, comenzó a estudiarse la posibilidad de estimular de forma selectiva determinadas subpoblaciones linfocitarias como respuesta inmunológica contra el cáncer.

I-3) ONCOGENESIS.

En los últimos años ha habido un notable progreso en el conocimiento de las bases biológicas y bioquímicas del cáncer. Las células cancerosas poseen cuatro características que las diferencian de las normales :

1) Clonalidad: generalmente el cáncer se origina en una célula progenitora que prolifera para formar una clona de células malignas.

2) Autonomía: el crecimiento no es regulado apropiadamente por las influencias bioquímicas y físicas normales del ambiente.

3) Anaplasia: no existe una diferenciación celular normal coordinada.

4) Metástasis: las células cancerosas desarrollan la capacidad de crecer en forma discontinua y diseminarse a otros puntos del cuerpo.

Todas las células de un organismo vivo se originan a partir de un solo huevo fertilizado (cigoto), por lo que todas llevan información genética idéntica. La proliferación y diferenciación de estas células en un embrión y en el organismo supone la participación selectiva y la expresión coordinada del repertorio genómico. Este repertorio genómico incluye información que permite a las células expandirse en forma clonal, funcionar con diversos grados de autonomía,

diferenciarse, y moverse por el organismo de forma coordinada. En el adulto, la reparación de las heridas activa la expresión de estas características celulares en una forma similar a la que ocurre en los embriones, pero bajo control bien coordinado.

En el caso de las enfermedades malignas, el proceso de control normal está alterado debido a las actividades anómalas de un grupo selecto de genes (oncogenes) que tienen gran importancia para la regulación de las actividades celulares. Estas actividades anómalas de los oncogenes suelen estar relacionadas con la producción de proteínas irregulares o cantidades anómalas de proteínas vitales para el crecimiento celular.

Virtualmente todos los tumores sólidos y la mayor parte de enfermedades malignas hematopoyéticas tienen anomalías en el cariotipo, que hereda la población de células tumorales. Estas pueden ser translocaciones de fragmentos cromosómicos a nuevas localizaciones, así como adiciones o deleciones de parte de los cromosomas o de su totalidad. El cáncer se origina a partir de alteraciones genéticas en células únicas, pero suele haber alteraciones hereditarias, lo que produce una mezcla heterogénea de subclonas en una población celular tumoral madura que ha proliferado lo suficiente como para detectarse clínicamente. Con el tiempo, la acumulación progresiva de anomalías hereditarias en las subpoblaciones

tumorales produce cambios fenotípicos muy importantes que tienen su contrapartida clínica en el desarrollo de resistencia al tratamiento que era eficaz, o en el aumento de la diseminación metastásica.

Las influencias ambientales que regulan la proliferación de las células normales apenas actúan cuando se presenta el proceso de transformación maligna. Las células cancerosas pueden proliferar en condiciones en las que las células normales no lo harían.

La falta de diferenciación normal es la característica más útil en el diagnóstico patológico de los cánceres. Las células cancerosas suelen tener alguna de las características morfológicas de sus equivalentes normales maduros, pero pueden tener anomalías a nivel celular e histológico fácilmente detectables con el microscopio óptico.

Las metástasis se producen cuando las células tumorales pierden su adherencia y su posición fija dentro de un tejido organizado, se mueven a lugares adyacentes, desarrollan la capacidad de invadir y salir de los vasos sanguíneos, y se vuelven capaces de proliferar en sitios o medios no naturales. Estos cambios en las normas de crecimiento se acompañan de alteraciones bioquímicas que tienen la capacidad de estimular los procesos metastásicos.

Parece que la progresión clonal de un tumor genera alteraciones bioquímicas o fisiológicas que confieren mayor autonomía, mayores grados de anaplasia, y una mayor capacidad de producir metástasis. Se produce una selección progresiva de las células con mayor capacidad proliferativa (45).

**I-4) RESPUESTA INMUNOLOGICA FRENTE A CELULAS
TUMORALES.**

1-4.1) GENERALIDADES.

El sistema inmune es un sistema de defensa del organismo. El gran impulso en el estudio del papel del sistema inmune en el desarrollo de células tumorales comenzó en la década de los cincuenta con la demostración de que los tumores murinos eran capaces de ser inmunogénicos para el propio huésped (46). Posteriormente Burnet (47) popularizó la teoría de la vigilancia inmunológica que otorgaba el papel predominante en la destrucción de las células tumorales a los linfocitos T citotóxicos (CTL); aquí comenzaron las primeras esperanzas de la participación del sistema inmune en la defensa frente a los tumores y en su manipulación terapéutica, que aún no se ha desarrollado con total éxito.

No obstante, el mejor conocimiento actual del sistema inmunológico y de sus interacciones con las células tumorales, nos permiten contemplar ciertas expectativas de nuevas terapias contra el cáncer basadas en la manipulación del sistema inmunológico, con resultados previos esperanzadores.

La respuesta inmune frente a cualquier antígeno es muy compleja, participando diversos tipos de células que interaccionan entre sí y dan lugar a mecanismos efectores (encargados de eliminar el estímulo que la ha desencadenado) y a mecanismos reguladores (encargados de controlar dicha respuesta inmune). Pero en el caso de células tumorales, entran en acción además otros mecanismos que no participan en la respuesta frente a antígenos solubles y que dependen del reconocimiento no solo ya de epítomos por parte de receptores específicos en la superficie de linfocitos B y T, sino de otras características presentes en la superficie de las células tumorales que las va a hacer susceptibles de ser atacadas por diversas células citotóxicas (macrófagos, células NK ("natural killer")).

En la respuesta inmunológica frente a tumores participan tanto mecanismos humorales como celulares, además de complejos sistemas de regulación y mecanismos citotóxicos no antígeno-específicos. Entre todos estos mecanismos algunos son eficaces en la destrucción tumoral, pero hay otros que pueden interferir con ellos, por lo que el efecto resultante es variable según los casos. Dependerá por un lado de la capacidad inmunogénica del tumor y de la capacidad de éste para poner en marcha mecanismos de escape frente al ataque del sistema inmune (48).

El sistema inmunológico tiene unos mecanismos de respuesta comunes para cualquier tipo de estímulo. Ante un antígeno reconocido como extraño y presentado por una célula con antígenos HLA de clase II (las células presentadoras de antígeno o células accesorias) se activan linfocitos CD4+ cooperadores, que van a producir factores solubles que estimulan a las diversas células que participan en las fases efectoras de la respuesta:

- linfocitos B: merced a factores de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B.

- linfocitos T citotóxicos: fundamentalmente a través de la interleukina-2 (IL-2).

- células NK: por la IL-2 y el interferón- γ .

- macrófagos: por factores activadores de macrófagos (interferón- γ).

El reconocimiento del antígeno extraño por los receptores para el antígeno de los linfocitos T citotóxicos y B es también necesario para que estas células puedan responder a esos factores activadores y transformarse en células efectoras (CTL y células plasmáticas respectivamente). Las otras células efectoras (macrófagos, NK) no poseen receptores con la especificidad de los linfocitos B y T, pero también son capaces de reconocer a las células tumorales y ejercer sobre ellas su gran capacidad citotóxica.

El sistema inmune tiene complicados sistemas de regulación y supresión que pueden ser estimulados en la respuesta antitumoral y frenar o bloquear la capacidad del sistema inmunológico para destruir el tumor. Esto hace, junto con la muy escasa o nula capacidad inmunogénica de los tumores espontáneos, que sea muy difícil precisar el grado de efectividad que tiene el sistema inmunológico en la vigilancia antitumoral, pese a sus múltiples mecanismos citotóxicos. El sistema inmune participa en la destrucción tumoral con dos tipos de mecanismos, el celular y el humoral.

I-4.2) RESPUESTA INMUNE CELULAR.

I-4.2.1) Linfocitos T.

Actualmente se conocen al menos dos tipos de linfocitos con capacidad citotóxica: los linfocitos T citotóxicos y los linfocitos grandes granulares (LGL). Los linfocitos grandes granulares pueden mediar dos mecanismos citotóxicos importantes en la destrucción tumoral: la citotoxicidad natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Los linfocitos T no son sólo células citotóxicas frente a las tumorales, sino que además son células reguladoras encargadas de amplificar o suprimir mecanismos inmunológicos diversos. Los linfocitos T, a diferencia de los B, no reconocen antígenos solubles, sino sólo los que están en la superficie celular y en unión de antígenos HLA. El

reconocimiento lo hacen a través del receptor para el antígeno (TCR), que en la superficie celular va estrechamente unido al antígeno de diferenciación CD3 formando el complejo CD3-TC. Los linfocitos T maduros, caracterizados por tener el antígeno CD3, se subdividen en 2 grandes subpoblaciones, cada una con otro antígeno de diferenciación: CD4 ó CD8. Ambos antígenos se hallan simultáneamente en timocitos maduros, pero solo existe uno de ellos en los linfocitos T maduros (49).

Cualquier tipo de respuesta inmunológica se inicia y/o se amplifica por la interacción de linfocitos CD4+ cooperadores con un antígeno presentado por células presentadores de antígeno, que se caracterizan por poseer antígenos HLA de clase II (HLA-DR). Los linfocitos CD4, a través fundamentalmente de la eliminación de factores solubles (IL-2, interferón- γ , etc.), amplifican la respuesta y/o activan a las diversas células efectoras (linfocitos B, T citotóxicos, células NK, macrófagos,...) .

Los linfocitos T citotóxicos podrán lisar células con antígenos HLA de clase II si ellos mismos poseen antígenos CD4, y células con antígeno HLA de clase I si poseen antígenos CD8. Pero esta interacción entre células citotóxicas y antígenos HLA de la célula diana no es suficiente para la unión. La interacción fundamental, y el reconocimiento específico de la célula que va a ser destruida

corre a cargo del receptor (TCR) para el antígeno del linfocito T. Este reconoce un complejo formado por el antígeno tumoral y partes variables de la molécula HLA (50). Además del receptor TCR y los antígenos CD4 y CD8 existen otros antígenos llamados LFA ("lymphocyte function associated antigens"), que participan en la interacción entre el linfocito T y la célula que reconoce, y refuerzan su unión cuando la interacción antígeno-receptor no tiene gran afinidad (51).

Cuando el linfocito T citotóxico se ha unido a la célula que va a destruir tienen lugar las etapas siguientes del proceso lítico, en las cuales es fundamental la secreción de moléculas citotóxicas previamente almacenadas en gránulos citoplasmáticos (52). Estos linfocitos T citotóxicos se han mostrado útiles en la destrucción tumoral en diversos sistemas experimentales, sobre todo en tumores inducidos por virus (53).

I-4.2.2) Células NK.

Son las llamadas "natural killer" o célula citotóxica natural. Se llama así a toda célula con actividad citotóxica no específica para un determinado tumor y sin restricción HLA, por lo que poseen capacidad citotóxica frente a células tumorales muy variadas (54). En su mayoría poseen las características morfológicas de los linfocitos grandes

granulares, aunque algunas expresan antígenos de diferenciación de linfocitos T.

Las células NK poseen varias subpoblaciones con estructuras de reconocimiento diversas. Se caracterizan por no poseer la estructura CD3/TCR, y basan su capacidad para unirse y lisar gran número de células tumorales en que éstas poseen determinantes comunes reconocidos por algún tipo de receptor de la célula NK, cuyas características aún no se conocen bien (55).

I-4.2.3) Mecanismo citotóxico.

Para producir citotoxicidad los linfocitos CTL y LGL necesitan unirse a la célula que van a destruir, y lo hacen de diferente forma según la célula. Posteriormente viene la lisis de la célula tumoral cuyo mecanismo parece ser similar en ambos casos. Este mecanismo depende de la secreción de material citolítico contenido en gránulos previamente presentes en las células CTL (56) y LGL (52).

La célula citotóxica se activa al unirse a la célula diana, produciéndose posteriormente la exocitosis de los gránulos en el lugar de unión. Los gránulos contienen un material citolítico llamado citolisina (o perforina), que en presencia de Ca^{2+} es activa y se polimeriza sobre la membrana de la célula diana formando poros. Posteriormente la célula

efectora puede ir a lisar otra célula, y la diana acabará siendo destruida por el intercambio de solutos a través de dichos poros (55).

I-4.2.4) Macrófagos.

Las células del sistema mononuclear fagocítico participan de forma muy importante en la respuesta inmune como células presentadoras de antígeno a los linfocitos CD4 cooperadores al poseer antígenos HLA de clase II.

Son capaces de destruir células tumorales por dos mecanismos distintos. El primero es un mecanismo directo y selectivo para células tumorales, que sólo tiene lugar si el macrófago ha sido previamente activado. Esta activación tiene lugar por medio de linfocitos T cooperadores a través de la producción de interferón- γ , aunque también puede conseguirse la activación sin el concurso de linfocitos T (ej.: macrófagos obtenidos con tioglicolato, y posteriormente expuestos "in vitro" a concentraciones elevadas de endotoxina) (57). El segundo es un mecanismo de citotoxicidad dependiente de anticuerpo en el cual el macrófago actúa sobre cualquier célula recubierta de anticuerpo IgG.

En ambos tipos de citotoxicidad la destrucción de la célula diana también es realizada por mecanismos diferentes: la citotoxicidad directa mediada por macrófagos depende de

una proteasa citolítica (58), mientras que el H_2O_2 parece ser el mediador de la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (59).

I-4.3) RESPUESTA INMUNE HUMORAL.

Los anticuerpos pueden contribuir a la destrucción de células tumorales al menos por dos mecanismos:

- 1.- lisis directa por activación del complemento
- 2.- facilitando la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

Este último mecanismo necesita de anticuerpos y células citotóxicas que tengan receptores para la clase de inmunoglobulina a la que pertenece el anticuerpo (en general anticuerpos IgG y células "killer" o monocitos-macrófagos) .

Las células K ("killer") son llamadas así por su capacidad funcional, y pertenecen en su mayoría a los LGL, aunque todavía hay que incluir en ellos a algunos linfocitos T, aquellos que tienen receptores para el Fc de la IgG (los llamados linfocitos T- γ ya que también media la citotoxicidad dependiente de anticuerpo) (60).

I-5) LINFOQUINAS.

I-5.1) GENERALIDADES.

La aplicación clínica de linfoquinas y citoquinas en las enfermedades tumorales humanas se ha incrementado en la última década como consecuencia de los avances en la ingeniería genética, tecnología de hibridomas, y bioinstrumentación especializada.

En 1966 se definieron por primera vez las linfoquinas como factores producidos por linfocitos activados "in vitro" que eran capaces de inhibir la migración de macrófagos. Por ello, a propuesta de Dumonde y cols. (61) se utilizó el término "linfoquina" para designar factores que regulan el crecimiento o movilidad del leucocito. Posteriormente se propuso el término de "citoquina" para designar a todos los factores similares producidos por células de la línea linfocítica y no linfocítica.

Linfoquinas y citoquinas forman parte de una complicada red de comunicación entre células pertenecientes al sistema inmunitario y de éste con otros sistemas del organismo. Estas moléculas son capaces de iniciar y regular las respuestas inmunológicas e inflamatorias, y también de controlar el crecimiento y la diferenciación de células hematopoyéticas y de otros tipos.

Aproximadamente 20 polipéptidos de este tipo han sido identificados y la mayoría de ellos clonados. Se incluyen en este conjunto de mediadores los interferones, interleuquinas (IL-1 a IL-7), factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento, linfoxina y factor de necrosis tumoral (62).

El descubrimiento de estas citoquinas antitumorales comenzó hace aproximadamente 2 siglos, al ser observada la relación entre cáncer y enfermedades infecciosas. Entonces se describió que cuando algunos enfermos terminales portadores de ciertos tumores desarrollaban infecciones bacterianas agudas, los tumores sufrían una remisión completa. En 1891 W.B. Coley aprovechó este fenómeno para el tratamiento del cáncer (63) con una mezcla de bacterias. La imposibilidad de controlar la severidad de algunas infecciones propició la sustitución de este tratamiento por las mismas bacterias muertas o por el correspondiente extracto filtrado. Estas mezclas, denominadas toxinas de Coley (64), constituyeron durante décadas el único tratamiento contra el cáncer hasta el advenimiento de la radioterapia y la quimioterapia. A partir de los descubrimientos de Coley se siguieron estudiando las implicaciones antitumorales de los productos microbianos.

I-5.2) INTERLEUKINA-2.

La IL-2, descrita inicialmente como un factor de crecimiento de linfocitos T por Morgan y cols. (65), ha surgido ahora como un mediador crítico de la función inmunitaria. El papel de la IL-2 como factor de crecimiento celular ha sido ampliamente estudiado (66-68).

La IL-2 alcanzó interés terapéutico inicial por su capacidad para incrementar la magnitud de la inmunidad mediada por células T específicas a través de un aumento directo del número de células inmunes. Posteriormente se demostró que las células efectoras T citolíticas no específicas de la sangre periférica de enfermos con cáncer se activaban "in vitro" con altas concentraciones de IL-2 para producir células "matadoras" ("killer") activadas por linfoquinas (células LAK), capaces de lisar tumores autólogos recientes. Además, en presencia de interferón- γ , se ha inducido la expresión de receptores para la IL-2 (69). Los monocitos citotóxicos, al igual que los linfocitos, también se activan con diferentes citoquinas como la IL-2 o el interferón- γ . De esta forma los monocitos de sangre periférica humana se han mostrado efectivos para destruir líneas celulares tumorales humanas "in vitro" mediante citotoxicidad directa y mediada por anticuerpos (70, 71).

La utilidad clínica de la IL-2 ha abarcado predominantemente la restauración de la inmunocompetencia en los síndromes de inmunodeficiencia (72) y en el tratamiento de tumores.

El uso inicial de la IL-2 en el tratamiento de enfermedades malignas se llevó a cabo con la administración de dosis bajas de IL-2 procedentes de los líquidos sobrenadantes de linfocitos humanos normales estimulados por mitógeno en enfermos neoplásicos (73). Como resultado se produjo un aumento en la proliferación de linfocitos y la aparición de linfocitos atípicos en la circulación.

Estudios posteriores con IL-2 recombinante a dosis más altas demostraron la existencia de células circulantes que llevaban un receptor de IL-2 ("Tac", o célula T activada-positiva), que comprendían hasta un tercio de las células mononucleares periféricas totales (74). A dosis de IL-2 de 100.000 U/Kg de peso corporal administradas 2-3 veces al día, se observó una disminución significativa del tumor en enfermos con melanoma. Entre las toxicidades observadas destacan la fiebre, escalofríos, cefalea, sensación de malestar, náuseas, vómitos y diarrea en la mayoría de los enfermos. La retención marcada de líquidos atribuida al síndrome de escape capilar fue el hecho más sobresaliente junto con disfunción renal y eosinofilia (75). Por lo tanto se ha encontrado que el uso de IL-2 en seres humanos produce

efectos colaterales significativos y una pobreza relativa de eficacia clínica como agente terapéutico único. Sin embargo, el uso de IL-2 en inmunoterapia adoptiva ha mostrado grandes posibilidades en los ensayos clínicos iniciales (76).

I-5.3) ACCION DE LA IL-2.

Una compleja cascada de sucesos regula tanto la producción de IL-2 como la respuesta celular a la IL-2 en una respuesta inmune fisiológica. Primero los linfocitos T antígeno-específicos sintetizan y secretan IL-2 tras reconocer antígenos específicos (ej.: bacteriales, virales, tumorales) presentados a nivel molecular por moléculas HLA (77). El contacto con estos antígenos específicos por células T-citotóxicas y helper induce la expresión de la cadena β del receptor de IL-2. Estas células con los receptores α/β de IL-2 pueden ahora proliferar rápidamente en presencia de bajas concentraciones de IL-2 .

Algunas de estas células destruyen directamente las células tumorales presentadoras de antígeno. Cuando las concentraciones de IL-2 continúan aumentando, los linfocitos que no han sido activados por antígenos y expresan solamente la cadena α del receptor de IL-2, son activados y proliferan: algunos mediarán la destrucción directa de células transformadas y otros liberarán linfoquinas y citoquinas, las cuales por si mismas activan una respuesta en cascada que

controla la infección o regulan la respuesta inmune. El potencial de la IL-2 como tratamiento del cáncer se basa en la activación de células mediadoras de citólisis directa contra células tumorales y la liberación de citoquinas que potencialmente pueden destruir los tejidos tumorales (78).

I-6) INMUNOTERAPIA ADOPTIVA DEL CANCER CON
CELULAS LAK.

I-6.1) VENTAJAS DE LA INMUNOTERAPIA ADOPTIVA.

Se denomina inmunoterapia adoptiva del cáncer a todas aquellas medidas terapéuticas que comprenden la administración sistémica de células inmunes dotadas de actividad antitumoral a un huésped portador de un tumor, de tal modo que induzcan directa o indirectamente la regresión de tumores establecidos. En teoría, la inmunoterapia adoptiva con células inmunes dotadas de actividad antitumoral posee ciertas ventajas sobre los demás tipos de tratamiento:

1º) La gran sensibilidad y especificidad de las reacciones inmunológicas permitirían que estas células atacasen el tumor pero no los tejidos normales, por lo que cabría esperar una baja morbilidad inherente a este tipo de tratamiento.

2º) En contraposición a lo que ocurre con la mayoría de las restantes modalidades de tratamiento antitumoral, la administración de células inmunes no tiene por qué ser causa de inmunosupresión, y posiblemente ni siquiera precise de una satisfactoria inmunocompetencia por parte del huésped, dado que son las propias células inmunocompetentes las que le son suministradas.

3º) Por su elevada especificidad y escasa morbilidad, se espera que la inmunoterapia adoptiva pueda combinarse fácilmente con otras modalidades terapéuticas, tales como la cirugía, quimioterapia o radioterapia.

El principal obstáculo que ha surgido para el desarrollo de la inmunoterapia adoptiva como terapia del cáncer ha sido la dificultad para la obtención de células inmunes dotadas de actividad antitumoral (79).

Los modelos animales han sido una gran ayuda en el desarrollo de la inmunoterapia adoptiva (80-83). Muchos estudios han demostrado que la transferencia sistémica de células inmunes específicas reactivas frente a tumores murinos es capaz de inducir la regresión de tumores establecidos tanto localmente como metastásicos (84-93).

I-6.2) CELULAS LAK EN EL RATON.

En 1980 se describe por primera vez un método general para la obtención de células linfoides capaces de reconocer y destruir células tumorales "in vitro" tanto en el ratón como en humanos (94, 95). Tras incubar a lo largo de varios días linfocitos murinos o humanos normales en presencia de IL-2, se generaban células linfoides capaces de provocar la lisis de células tumorales tanto primarias como metastásicas frescas, no procedentes de cultivos y resistentes a las

células NK, sin provocar la lisis de células normales. Estas células son las llamadas células LAK (96, 97).

Se conoce mucho sobre las células LAK murinas (96, 97). La IL-2 es necesaria y suficiente para la génesis de células LAK (98), mientras que otras linfoquinas como la IL-1 o el interferón- γ no son capaces de generar este tipo de células (99). Por su especificidad citolítica y su fenotipo de superficie, las células LAK parecen constituir un sistema citolítico único, diferente de las células NK o linfocitos T citotóxicos clásicos.

No se conoce aún la función que desempeñan los precursores de las células LAK. Las células LAK muestran una amplia especificidad lítica frente a numerosos tipos de células alteradas, además de las células tumorales frescas, incluyendo la totalidad de las células en cultivo, tales como los fibroblastos y las células linfoides blásticas generadas a partir de la incubación de linfocitos en presencia de concanavalina A (88). Se puede hacer la hipótesis de que las células LAK constituyen una modalidad natural de vigilancia inmunológica frente a la aparición de células anómalas, con lo que integrarían un mecanismo fisiológico natural encargado de eliminar todas aquellas células alteradas por una transformación maligna, infección vírica, o incluso por envejecimiento u otros fenómenos. Sin embargo, la función de las células LAK en condiciones normales sigue sin conocerse.

I-6.3) CELULAS LAK HUMANAS.

En los primeros ensayos realizados para obtener células LAK humanas se emplearon sobrenadantes que contenían IL-2 junto con una variedad de diferentes linfoquinas (95, 96, 99, 100). Estudios realizados con IL-2 recombinante homogéneamente purificada han demostrado que la presencia de IL-2 es suficiente para inducir la aparición de células LAK (98).

Se pueden obtener células LAK a partir de una amplia variedad de tejidos humanos, entre los que se incluyen los linfocitos de sangre periférica, glándula tímica, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea y los linfocitos del conducto torácico (101). Esta ubicuidad de los precursores de las células LAK en la totalidad de los tejidos sugiere que las células LAK desempeñan un cierto papel dentro de la respuesta inmune en sujetos sanos. Se ha demostrado la génesis de células LAK por efecto de la IL-2 sobre los linfocitos de sangre periférica en individuos normales, así como en enfermos portadores de tumores (95, 96, 102, 103).

Se han realizado una serie de estudios para intentar caracterizar las células LAK humanas (100-104). El precursor de la célula LAK es una célula no adherente sin capacidad para dar lugar a la formación de rosetas E. Al estudiar la presencia de diferentes marcadores de superficie en la célula

precursora se ha demostrado la negatividad para la totalidad de los marcadores conocidos de la serie linfoide, incluyendo los CD11, CD3, CD5 y CD57. Por ello, el precursor de las células LAK humanas parece corresponder a una célula no T (negatividad para CD3 y CD5), a la vez que está desprovista de los marcadores que caracterizan las células NK humanas (CD11 y CD57). La célula LAK efectora se muestra asimismo no adherente y parece ser CD11(-), y probablemente CD3(-). Las células LAK humanas se asemejan en la práctica totalidad de los aspectos a las del ratón.

Se ha descrito una técnica para la obtención de células "killer" activadas a partir de linfocitos humanos por estimulación con lectinas tales como la fitohemaglutinina y la concanavalina-A (105-108). También por alosensibilización múltiple se pueden obtener células "killer" activadas capaces de provocar la lisis de células leucémicas frescas, así como de células procedentes de tumores sólidos (105, 106, 109). Se conoce que la estimulación de células linfoides mediante lectinas y por alosensibilización múltiple da lugar a la producción de IL-2 en cultivo. Por ello, parece que la vía común para la aparición de estas células "killer" activadas es a través de la producción de IL-2.

I-6.4) TOXICIDAD DEL TRATAMIENTO.

La mayor parte de la toxicidad del tratamiento con células LAK e IL-2 deriva de la administración de IL-2. Cuando se administra en exclusiva células LAK, la toxicidad es mínima (110, 111). Normalmente la infusión de la suspensión celular se asocia a fiebres y escalofríos. Tras la infusión de la suspensión celular se registra un ligero descenso de la capacidad de difusión pulmonar, que se normaliza a las 24 horas. Sin embargo, la administración de dosis elevadas de IL-2 se asocia a múltiples efectos secundarios (74, 112-116).

La infusión de células LAK puede producir complicaciones infecciosas asociadas al riesgo potencial de la incubación de linfocitos en medio de cultivo a lo largo de 3 a 4 días. Esta contaminación puede producirse tanto a través de los reactivos empleados para los cultivos celulares, como a partir de los contaminantes aerógenos introducidos en el cultivo durante sus múltiples pasos (117).

I-6.5) PASADO, PRESENTE Y FUTURO DEL TRATAMIENTO CON CELULAS LAK.

Los antecedentes históricos de la terapia con células LAK son muy recientes; sólo hay que remontarse a 1980 cuando se descubrió que la incubación de linfocitos en presencia de

sobrenadantes que contenían IL-2 daba lugar a los 3-4 días a la aparición de linfocitos capaces de mediar la lisis de células tumorales frescas autólogas, singénicas y alogénicas resistentes a las células NK, pero no la de células normales (94, 95, 104).

Se han realizado ensayos con IL-2 y con células LAK tanto "in vitro" como en una amplia gama de tumores animales (104, 79). La administración de IL-2 a altas dosis, así como la de células LAK junto con IL-2 se ha mostrado eficaz para provocar la regresión de gran número de tumores murinos (118-123). Aunque la administración de IL-2 sola provocaba la regresión de las metástasis, la combinación de células LAK e IL-2 se mostraba más eficaz, especialmente cuando se utilizaban dosis más bajas de IL-2.

Los ensayos clínicos con inmunoterapia fueron iniciados en el año 1981 tras descubrirse la capacidad de la IL-2 de generar células LAK (110). Pero dada la escasez de IL-2 de origen natural (124) en 1981 se llevaron a cabo estudios en los que se recurrió a la fitohemaglutinina como estimulante de las células "killer", que posteriormente eran infundidas en grandes cantidades a enfermos con cáncer (111), produciendo una toxicidad muy escasa. La continuación de estos estudios dieron lugar en los años 1982 y 1983 a la administración adoptiva de células "killer" activadas con fitohemaglutinina, junto con ciclofosfamida en seis enfermos,

y posteriormente en asociación a la infusión de macrófagos activados (110).

En 1983 se comienzan los ensayos clínicos con IL-2 purificada en enfermos (125) y se pudieron describir algunos de los efectos inmunológicos de la IL-2. Tras la identificación de la secuencia de DNA del gen que codifica la síntesis de la IL-2 (126) se consiguió la expresión de este gen a nivel de *E. coli*, y en 1984 se consiguió por primera vez obtener grandes cantidades de IL-2 recombinante (98). En este año se realizaron ensayos clínicos con IL-2 recombinante y células LAK obtenidas mediante el empleo de este material recombinante (110, 74). Todos estos estudios se llevaron a cabo en enfermos portadores de tumores malignos en fase avanzada, en los que había fracasado el tratamiento estándar o para los que no existía ninguna modalidad terapéutica válida. En ninguno de estos enfermos se pudo observar un efecto antitumoral.

En 1985 se hacen estudios basados en la administración de IL-2 recombinante y células LAK (112) observándose la involución de lesiones cancerosas metastásicas de diversas variedades tumorales en algunos enfermos. En 1986 se tratan 10 enfermos con IL-2 sola (113), observándose una respuesta parcial de las lesiones metastásicas en tres enfermos con melanoma maligno.

En 1987 ya aparecen publicados por diferentes grupos de investigación amplios estudios de enfermos con tumores establecidos tratados con IL-2 y células LAK. Así Rosenberg y cols. (114) después de tratar 106 enfermos con cáncer metastásico con IL-2 y células LAK obtuvieron 8 remisiones completas, 15 remisiones parciales y 10 remisiones menores. Al mismo tiempo trataron 49 enfermos con IL-2 sola a altas dosis obteniendo 1 remisión completa, 5 remisiones parciales y 1 remisión menor. La remisión completa se definía como la desaparición de toda evidencia del tumor, la remisión parcial como una disminución del 50% o superior, y la remisión menor como una disminución entre el 25% y el 50%. West y cols. (127) administraron células LAK junto con IL-2 a 40 enfermos portadores de cancer avanzado obteniendo 13 remisiones parciales. Dutcher y cols. (128) registraron 6 remisiones parciales de 32 enfermos con melanoma avanzado, administrando células LAK junto con IL-2. De forma similar, Fischer y cols. (129) obtuvieron 1 remisión completa y 4 remisiones parciales de 34 enfermos con carcinoma renal metastásico. Steis y cols. (130) obtuvieron 4 remisiones parciales de 5 enfermos con carcinomatosis peritoneal secundaria a cáncer colorrectal o carcinoma de ovario. Paciucci y cols. (131) obtuvieron 4 remisiones parciales de 16 enfermos con cáncer avanzado.

Estos resultados demuestran que el tratamiento con células LAK e IL-2 es capaz de inducir la regresión de tumores establecidos en el hombre.

I-6.5.1) Futuras investigaciones del tratamiento con células LAK e IL-2.

Actualmente las mejoras del tratamiento se dirigen fundamentalmente a aumentar su eficacia, disminuir su toxicidad, y reducir su complejidad. Por ello las futuras investigaciones se dirigen hacia los siguientes apartados:

- 1.- Producción lo más automatizada y rutinaria posible de células LAK.
- 2.- Disminución de la toxicidad derivada de la IL-2
- 3.- Tratamiento de masas tumorales mínimas, y optimización de dosis y pautas de tratamiento.
- 4.- Tratamiento de nuevas variedades tumorales.

Respecto a la automatización del proceso, el sistema de recuperación basado en un separador celular automatizado (132, 133) proporciona un mejor rendimiento que las técnicas manuales de recolección celular. El empleo de una técnica de circuito cerrado permite disminuir el riesgo potencial de contaminación microbiana y contribuye a disminuir los requerimientos instrumentales.

Tras conocerse mejor la toxicidad derivada de la administración de IL-2, se intenta disminuir sus efectos tóxicos. Una serie de ensayos en animales han indicado que el tratamiento con esteroides podría aliviar en parte la

toxicidad del tratamiento con IL-2 , lo que se ha confirmado ya en 6 enfermos tratados (134). No obstante, los ensayos llevados a cabo en animales parecen indicar que los esteroides pueden contrarrestar la eficacia terapéutica del tratamiento, por lo que han dejado de utilizarse.

Desde el punto de vista clínico se intenta aumentar la eficacia terapéutica del tratamiento aplicándolo a masas tumorales mínimas, ya que los ensayos realizados en animales indican que la inmunoterapia es probablemente más efectiva en aquellos casos con una masa tumoral escasa. Otras mejoras de la eficacia terapéutica se intentan conseguir con la optimización de las dosis y pautas de administración de IL-2 y células LAK.

Se están tratando enfermos con diferentes tipos de tumores, y hasta el momento los enfermos portadores de melanoma, carcinoma renal, y linfomas no hodgkinianos son los que presentan mejores resultados. Sin embargo, son muchas las variedades tumorales que aun no han sido debidamente estudiadas, entre ellas las leucemias agudas, por lo que es posible que otros tumores resulten asimismo sensibles (117).

II. OBJETIVOS

Lo anteriormente expuesto indica que la terapia antitumoral ha evolucionado espectacularmente durante las dos últimas décadas. Las modalidades de tratamiento se han perfeccionado hasta el punto de que todas ellas proporcionan resultados positivos importantes por si mismas. Sin embargo, el avance más decisivo es consecuencia de la comprensión de que frecuentemente el mejor tratamiento que un enfermo tumoral puede recibir es la aplicación equilibrada de cada uno de ellos: cirugía, radioterapia, quimioterapia, e inmunoterapia.

La lucha contra las leucemias agudas se ha centrado fundamentalmente en lograr el mayor número posible de remisiones completas, conseguir que tales remisiones se prolonguen al máximo, y como fin último alcanzar la curación de la enfermedad.

La rentabilidad clínica de la inmunoterapia adoptiva está en función de los métodos y medios logísticos que pueda aportar el laboratorio. La optimización de la rutina asistencial ha de ser un capítulo extraordinariamente cuidado en cualquier unidad especializada. En base a ello los objetivos del presente trabajo son:

1º) Optimización en nuestro medio del proceso de obtención de células mononucleares de enfermos en un separador celular sanguíneo de flujo continuo.

2º) Obtención de células LAK de enfermos y donantes, y estudio de su actividad lítica "in vitro" frente a blastos de enfermos con leucemia aguda, empleando como control de actividad citolítica las líneas celulares K-562 (NK-sensibles) y Daudi (NK-resistentes).

III. MATERIAL Y METODO

III-1. MATERIAL

III-1.1) REACTIVOS.

1) Medio Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) sin Calcio ni Magnesio.

Lab. Flow.

2) Medio RPMI 1640 (10x) sin L-glutamina.

Lab. Biochrom KG.

3) Fungizona endovenosa (Anfotericina B), 50 mg/vial.

Lab. E.R.Squibb and Sons.

4) Gentamédical (Gentamicina sulfato), 20 mg/ml.

Lab. Médicas S.A.

5) Estreptomicina Normon (Estreptomicina sulfato), 250 mg/ml.

Lab. Normon S.A.

6) Penilével (Penicilina G. sódica), 10^6 UI/4ml.

Lab. Lével S.A.

7) Solución Hepes 1 M, pH=7.2-7.3.

Lab. Flow.

8) L-glutamina 200 mM.

Lab. Flow.

9) Piruvato sódico 100 mM.

Lab. Biochrom KG.

10) Suero humano AB inactivado por calor.

Lab. Flow.

11) Suero bovino fetal.

Lab. Flow.

12) Interleukina-2 humana (10^5 UI/ml).

Lab. Biotest Pharma.

- 13) Ficoll Hypaque, 1.077 sp. gr.
Lab. Pharmacia.
- 14) Heparina sódica sin conservantes (1000 UI/ml).
Lab. Rovi S.A.
- 15) Anticoagulante de dextrosa citrato fórmula-A (ACD-A).
Lab. Grifols S.A.
- 16) Dimetilsulfóxido (DMSO) seco.
Lab. Merck.
- 17) Nitrógeno líquido.
Carburos Metálicos S.A.
- 18) Cromo radiactivo : Cr⁵¹ (2 Ci/ml).
Cis-Radioquímica S.A.
- 19) Sodio Dodecil Sulfato (SDS).
Lab. Sigma.
- 20) Agua estéril y apirógena.
Lab. Grifols S.A.
- 21) Solución acuosa de Azul Tripán a pH=7.2-7.3 conteniendo:
 - 0.4% Azul Tripán. Lab. Merck
 - 0.81% ClNa. Lab. Panreac.
 - 0.66% Fosfato potásico monosódico. Lab. Panreac.
- 22) Líquido de Turk. Solución acuosa con :
 - 1% de azul de metileno
 - 1% de ácido acético.Lab. Merck.
- 23) Bicarbonato sódico .
Lab. Sigma.

III-1.2) EQUIPOS DE LABORATORIO.

- 1) Pipetas Greiner de 2 mlx1/100, TD 20°C estériles.
Lab. Flow.
- 2) Pipetas Greiner de 5 inx1/10ml, TD 20°C estériles.
Lab. Flow.
- 3) Pipetas Costar de 1 inx1/100ml, TD 20°C estériles.
Lab. Flow.
- 4) Pipetas Costar de 10 mlx1/10ml, TD 20°C estériles.
Lab. Flow.
- 5) Pipeta automática Cultek-5109.
Lab. Tecnomara.
- 6) Placas Nunc de 96 pocillos de fondo redondo y estériles.
Lab. Flow.
- 7) Criotubos Nunc estériles de 1.8 ml.
Lab. Flow.
- 8) Frascos de cultivo Costar de plástico y estériles.
Lab. Flow.
- 9) Bolsas de congelación Gambro DF-700-3.
Carburos Metálicos.
- 10) Jeringas estériles de 1, 5, 10, 20, y 50 ml.
Lab. Terumo.
- 11) Agujas de 18g.
Lab. Terumo.
- 12) Acoplador para inyección en bolsas, estéril.
Lab. Baxter.

13) Equipo de transferencia de 600 ml.

Lab. Baxter.

14) Pinzas de hemostasia.

Lab. Baxter.

15) Bolsa de donación de sangre total con anticoagulante ACD-A de 500 ml de capacidad.

Lab. Baxter.

16) Agitador Vortex.

Comecta S.A. Heidolph.

17) Agitador Nutátor.

Lab. Selecta.

18) Estufa Selecta con selector de temperatura e inyector de CO₂ "Forma Scientific".

Lab. Selecta.

19) Centrífuga Meditronic Selecta con adaptadores para tubos y placas microtíter de 96 pocillos.

Lab. Selecta.

20) Centrífuga refrigerada para tubos.

Lab. Heraus.

21) Equipo de recolección de sobrenadantes en placa "Skatron" que consta de :

- Tubos de plástico de 1ml.
- Cartuchos absorbentes de forma cilíndrica con filtros de disco en un extremo.
- Prensa.

Lab. Grifols.

- 22) Cámara de flujo laminar vertical Gelaire TC60.
Lab. Flow.
- 23) Contador automático de radiaciones gamma 80000-LKB.
LKB-Wallac.
- 24) Contador celular automatizado H-1.
Lab. Technicón.
- 25) Microscopio óptico BH-2.
Lab. Olympus.
- 26) Depósito de Nitrógeno líquido de 600 litros de capacidad para almacenar muestras.
Carbueros Metálicos.
- 27) Congelador biológico con sistema computerizado de control programable Cryoson BV-10. Se compone de:
- Cámara de congelación biológica de 26 litros de capacidad.
 - Computador de proceso que controla y programa la temperatura de la cámara de congelación, con monitor e impresora.
 - Depósito de Nitrógeno líquido de 60 litros de capacidad con válvula de control.
- Carbueros Metálicos, S.A.
- 28) Sistema cerrado de aféresis estéril y apirógeno (ref. 4R2230). El sistema de aféresis consta de:
- Un equipo monitor.
 - Segmentos tubulares.

- Bolsa de 1l. con solución salina fisiológica.
- Bolsa de 1l. con anticoagulante de dextrosa-citrato fórmula A, (ACD-A).
- Bolsa de separación
- Bolsa de recolección
- 2 bolsas de transferencia de plástico PL-732 de 1000 ml.
- Bolsa de transferencia de plástico PL-146 de 600 ml.
- Atrampador de burbujas
- 2 agujas de 16g.

Lab. Baxter.

29) Separador automático de células sanguíneas de flujo continuo Fenwal CS-3000.

Lab. Baxter.

III-1.3) ENFERMOS Y DONANTES.

1) Bolsas de sangre total de donantes para la obtención de células mononucleares en el separador celular.

Se obtienen 40 bolsas de sangre total anticoagulada de donantes sanos voluntarios. Las bolsas son de 500 ml de capacidad con 60 ml de anticoagulante ACD-A.

2) Enfermos para la obtención de células mononucleares en el separador celular.

Se seleccionan 30 enfermos leucémicos en fase de remisión completa tras quimioterapia para obtener células mononucleares con el separador celular CS-3000.

3) Enfermos para la obtención y congelación de blastos diana.

Se obtienen y congelan células blásticas de 21 enfermos con leucemia aguda al diagnóstico, con edades comprendidas entre 3 y 77 años. Sus diagnósticos se exponen en la tabla IV.

4) Donantes para la cuantificación de actividades NK y LAK.

Se seleccionan 20 donantes sanos para la cuantificación de actividades NK y LAK frente a células K-562, Daudi y blastos de enfermos con leucemia aguda del apartado anterior.

5) Enfermos para la cuantificación de actividades NK y LAK.

Se seleccionan 10 enfermos con leucemia aguda en fase de remisión completa para la cuantificación de actividades citolíticas NK y LAK frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos autólogos.

Todos los enfermos se diagnostican según la clasificación del grupo Franco-Americano-Británico (FAB) (135, 136) en el Servicio de Hematología y Hemoterapia del Hospital Universitario "Virgen del Rocío" de Sevilla.

III-2. METODO

III-2.1) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES EN EL SEPARADOR CELULAR.

III-2.1.1) SEPARADOR CELULAR CS-3000.

El separador de células sanguíneas CS-3000 (fig.1) es un aparato centrifugador autónomo de flujo continuo que separa la sangre entera en componentes más elementales (137). Los componentes de la sangre son recolectados en un sistema de aféresis (fig.2) estéril y desechable, y son separados dentro de dicho sistema según su densidad. El separador puede operar de forma automática, semiautomática o manual. El separador consta básicamente de una centrífuga, dos bombas peristálticas y un sistema de controles y monitorización por microordenador:

a) Centrífuga: es un rotor motorizado consistente en un yugo en el que se apoyan las dos prensas de sujeción diametralmente opuestas. En cada prensa de sujeción se apoya un sujeta-envases que contiene uno de los envases flexibles de plástico (de separación o recolección) del sistema de aféresis.

b) Bombas peristálticas: dos bombas peristálticas controlan el flujo de sangre a través del sistema de aféresis. Estas bombas actúan ejerciendo una fuerza sobre los tubos del sistema de aféresis por donde fluye el líquido.

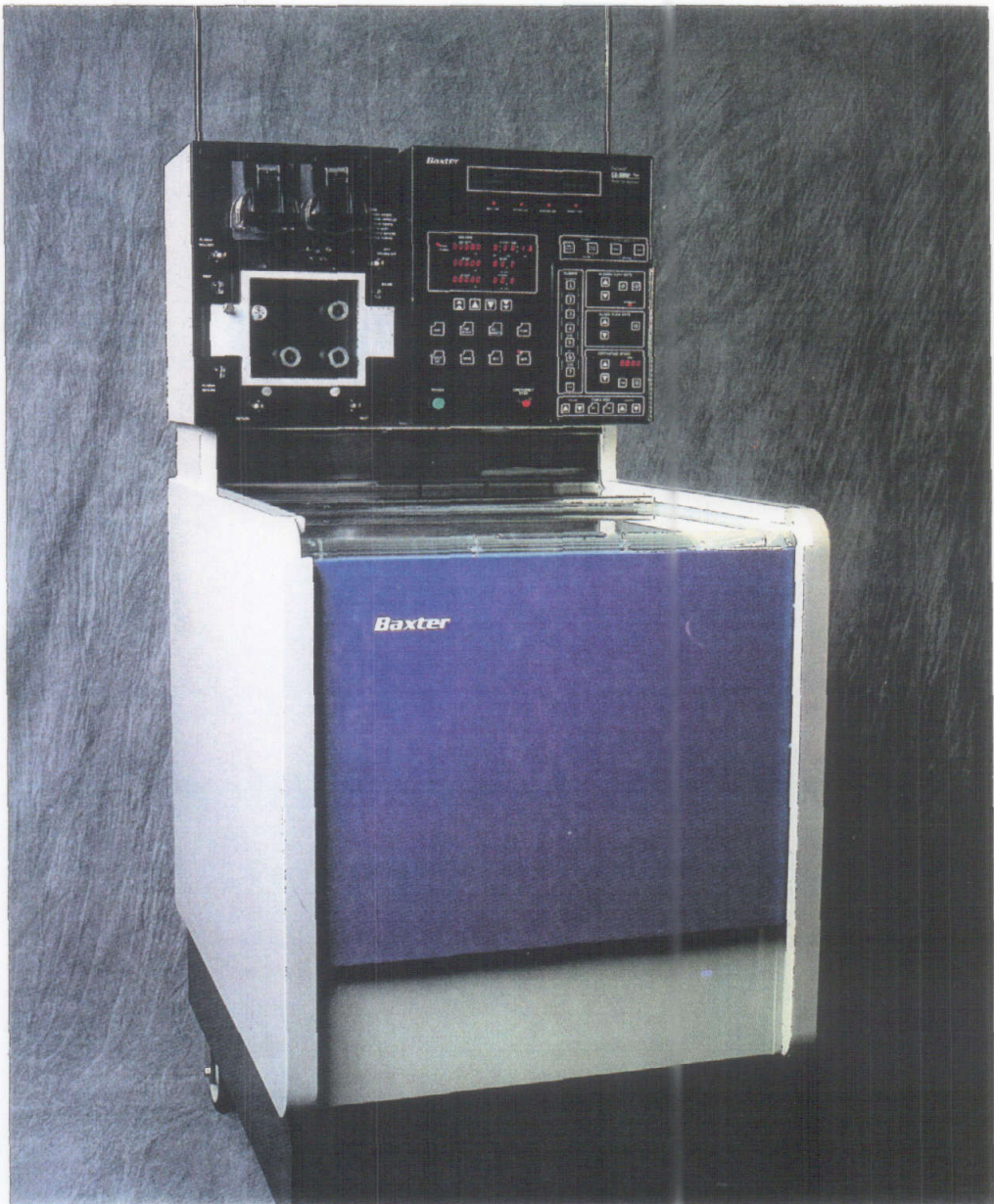


FIGURA 1 : Separador celular CS-3000.

c) Sistema de control y monitorización por microordenador: controla los parámetros de operación y muestra códigos de alarma. Este sistema permite modos de operación automático, manual y semiautomático para el separador.

Situados en el panel monitor del separador y operando en conjunción con el equipo monitor del sistema de aféresis se encuentran :

1) Monitores de presión de las líneas de entrada, bloqueo, y retorno : comprueban el nivel de presión en todo el circuito.

2) Detector de nivel de líquido : comprueba el nivel fluídico en la trampa de burbujas de la línea de retorno.

3) Detector interfacial : es un sensor óptico que mide la cantidad de luz transmitida a través de un segmento que pasa por la bomba de plasma, vigilando así la presencia de células en la línea CRP (plasma rico en componentes).

Situados en el compartimento del centrifugador se encuentran:

1) El sensor de temperatura: comprueba que la temperatura del aire dentro del compartimento no exceda los 41°C.

2) El sensor de humedad: comprueba que la humedad relativa del aire en el compartimento esté entre el 15 y el 90% .

3) El detector de desequilibrio del rotor: monitoriza el nivel de vibración del rotor de la centrífuga.

III-2.1.1.1) Descripción del sistema de separación.

El separador procesa la sangre dentro de un sistema de aféresis desechable (fig.2). Se utiliza una solución salina para cebar el sistema tras su instalación en el separador.

La sangre total del donante/enfermo se mezcla con el anticoagulante y es bombeada mediante la bomba de sangre total (WB/ACD) hasta el envase de separación dentro de la centrífuga. A medida que la sangre entera entra en el envase de separación, los componentes sanguíneos se distribuyen en la bolsa según su densidad, estableciéndose un gradiente de densidad donde los componentes más densos (principalmente hematíes) sufren un empaquetamiento contra los lados externos del envase debido a la fuerza centrífuga. Este paquete de células rojas concentradas salen de la bolsa por la línea PRBC (plasma rico en hematíes) hacia el donante/enfermo.

Los componentes de menor densidad tales como el plasma, plaquetas y leucocitos pueden ser extraídos mediante la bomba de plasma hasta el envase de recolección por la vía CRP. A medida que el plasma rico en componentes entra en el envase de recolección, sus componentes de mayor densidad (plaquetas y/o leucocitos) sufren un empaquetamiento contra la pared del

envase a causa de la fuerza centrífuga. Los componentes separados quedan concentrados dentro del envase mientras que el plasma pobre en componentes, de densidad inferior, sale del envase por la línea CPP (plasma pobre en componentes). Este plasma puede ser depositado en una bolsa de transferencia o re combinado con los hematíes concentrados que por la línea PRBC vienen del envase de separación, y devuelto al donante/enfermo.

La línea CRP que une las bolsas de separación y recolección pasa por el detector interfacial. Este es un detector óptico que monitoriza la densidad óptica a través de un segmento de la línea CRP. Con ello el separador puede controlar la separación celular y el proceso de recolección, ajustando la velocidad de la bomba de plasma a la densidad óptica del plasma rico en componentes.

III-2.1.1.2) Definición de la separación automática.

El separador realiza tres funciones básicas:

1) Forma una capa de plasma rico en componentes en la bolsa de separación

2) Extrae el plasma rico en componentes de la bolsa de separación hasta que suceda un rebosamiento de la capa de hematíes por la línea CRP.

3) El producto de la bolsa de recolección no debe contaminarse de un excesivo volumen de hematíes.

Por ello la separación automática se puede definir en dos fases distintas:

1) Formación del gradiente de densidad en la bolsa de separación y extracción del plasma rico en componentes: la bomba de plasma ajusta su velocidad para permitir la formación de la capa de plasma rico en componentes y su recolección durante intervalos regulares hasta que el detector interfacial detecta un rebosamiento de hematíes.

2) Rebosamiento de hematíes: en dicho rebosamiento se reajustan las velocidades de la bomba de plasma y de sangre total para reducir la contaminación de hematíes en la línea CRP y restablecer el gradiente de densidad en la bolsa de separación. Este rebosamiento sucede cuando el detector interfacial lee una densidad óptica en la línea CRP superior a un límite definido.

Así pues, durante un proceso automático, sucede de forma repetitiva la formación del gradiente de densidad seguida de la fase de rebosamiento de hematíes.

III-2.1.1.3) El detector interfacial.

El detector interfacial es un sensor óptico cuya principal función consiste en seleccionar las células que circulan por la línea que pasa por la bomba de plasma (línea

CRP) mediante la medición de la cantidad de luz transmitida a través del segmento. De este modo el microordenador vigila la presencia de células en el plasma rico en componentes.

El detector interfacial permite el paso de plasma rico en componentes dentro de un umbral máximo de valores de densidad óptica (voltios), que viene definido por la expresión:

$$\text{" Umbral máximo} = \text{línea base} + \text{desviación} \text{"}$$

La línea base (voltios) del detector corresponde a la densidad óptica al pasar el plasma libre de componentes por el detector. La desviación en voltios viene dada por la expresión:

$$\text{" Desviación} = 0.0392 \times \text{Amplitud de interfase} \text{"}$$

La amplitud de interfase es un valor numérico entre 0 y 200, programable según el tipo de separación que se desee realizar. Cuanto menor sea la amplitud de interfase, menor será el umbral máximo y por tanto la separación será más selectiva, y viceversa.

III-2.1.2) METODO DE OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES EN EL SEPARADOR CELULAR.

La obtención de células mononucleares de enfermos y de bolsas de donantes se realiza con el separador celular automático de flujo continuo CS-3000.

El método de obtención de células mononucleares consta de las siguientes etapas :

- 1º) Obtención de células mononucleares
- 2º) Separación de plaquetas de las células mononucleares.

III-2.1.2.1) Obtención de células mononucleares.

Se realiza en un equipo de aféresis cerrado, estéril y desechable, cuyo esquema se representa en la fig.2. El proceso consta de las siguientes etapas:

A) Preparación del separador celular y montaje del equipo de aféresis cerrado.

1.- Se coloca la cámara de gránulos en el contenedor de separación, la cámara A-35 en el contenedor de recolección, y se instala el equipo de aféresis.

2.- Se ponen los interruptores "Prime" y "Run" en posición automática y se cierran todas las bolsas de transferencia excepto una de 1000ml PL-732. Se selecciona el programa nº1 del separador (programa de obtención de plaquetas).

B) Cebado.

1.- Se ceba automáticamente todo el sistema con la solución salina del equipo.

2.- Se programa el trasvase de 200ml de salino a una bolsa PL-732 de 1000ml que se realiza al comienzo del proceso de obtención.

C) Modificación del programa de la computadora del separador CS-3000.

Se modifica el programa nº1 de la computadora (programa de obtención de plaquetas) para adaptarlo a las condiciones necesarias para la obtención de células mononucleares. Las modificaciones a introducir en el separador, según el hematocrito del enfermo y la velocidad de entrada de flujo sanguíneo, se indican en la tabla I. Se programa una velocidad de entrada de flujo sanguíneo de 50 ml/min.

D) Puesta en marcha.

1.- Se ceban los tubos de entrada y salida del equipo de aféresis, y se realizan las punciones venosas.

2.- Se programa la velocidad de la centrífuga y la amplitud de interfase según el protocolo a utilizar.

3.- Se selecciona el volumen a procesar .

4.- Se pone en marcha el proceso de separación y se regula el paso de anticoagulante en la proporción 1:11 (anticoagulante / sangre total).

MODIFICACIONES DE LA COMPUTADORA DEL SEPARADOR CS-3000

CODIGO	VALOR SEGUN VELOCIDAD DE FLUJO SANGUINEO DEL ENFERMO/DONANTE		
	40 ml/min	50 ml/min	60 ml/min
L-60	1400	1750	2100
L-61	0000	0000	0000
L-62	0120	0160	0190
L-64	0240	0320	0380
L-78	0950	0950	0950
L-68	*	*	*

* Valor según el hematocrito del paciente:

HCT%	L-68
24	0710
26	0680
28	0660
30	0640
32	0620
34	0590
36	0570
38	0550
40	0520
42	0500
44	0480
46	0460
48	0430
50	0410

TABLA I : Modificaciones de la computadora del separador celular basadas en el flujo de entrada de sangre total y el hematocrito del enfermo o donante.

E) Reinfusión.

Una vez procesado todo el volumen programado se realiza la reinfusión al enfermo o bolsa de donante con el programa nº3 del separador. Posteriormente se desconecta el tubo de extracción e infusión del enfermo o bolsa.

III-2.1.2.2) Separación de plaquetas de las células mononucleares.

Finalizada la reinfusión se realiza un cebado manual del separador y se procede a la separación de las plaquetas de las células mononucleares en el mismo separador. Para ello:

1.- Se abre la centrífuga y se pinzan los tubos de la bolsa de recolección, se resuspende su contenido con agitación lenta hasta desagregar las plaquetas, y se vuelve a colocar la bolsa sin pinzas.

2.- Se pinza el tubo nº1 (línea CPP) y se centrifuga a 1000 rpm x 3 min.

3.- Finalizada la centrifugación se quita la pinza del tubo nº1 y se trasvasa el plasma rico en plaquetas de la bolsa de recolección a la bolsa de 600ml.

4.- Cuando empiezan a pasar hematíes se pinza el tubo 1 antes de la bifurcación.

5.- Se cierra la bolsa de 600ml y se vuelve a su posición original en la parte superior de la centrífuga.

III-2.1.3) OPTIMIZACION DEL PROGRAMA DE OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES EN EL SEPARADOR CELULAR.

Se ha optimizado el programa de obtención de células mononucleares en el separador celular modificando dos parámetros básicos: la velocidad de la centrífuga y el detector interfacial.

El protocolo inicial suministrado por el fabricante (Baxter) es el indicado en la sección anterior III-2.1.2, utilizando una velocidad de centrífuga de 1600 rpm, una amplitud de interfase de 100, y con las modificaciones del programa nº1 del computador indicadas en la tabla I.

El nuevo programa que se propone se compone de las mismas etapas que el anterior, pero con una velocidad de centrífuga de 1400 rpm (290xg) para conseguir un gradiente de células en la bolsa de separación más favorable a la recolección masiva de células mononucleares sin que aumente considerablemente la recolección de los demás componentes sanguíneos. También se modifica la amplitud de interfase a 150 para evitar que el detector interfacial sea tan selectivo y permita un mayor paso de células hacia la bolsa de recolección. En este nuevo programa también se realizan las mismas modificaciones del programa nº1 del computador indicadas en la tabla I.

En resumen, la diferencia entre el programa suministrado por el fabricante (programa original) y el nuevo programa que aquí se diseña (programa modificado) radica en :

1º) Velocidad de la centrífuga:

-Programa original : 1600 rpm.

-Programa modificado : 1400 rpm.

2º) Amplitud de interfase:

-Programa original : 100

-Programa modificado : 150

III-2.1.4) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE BOLSAS DE DONANTES.

Se realiza un estudio comparativo de los dos programas de obtención de células mononucleares señalados en el apartado anterior III-2.1.3. Para ello se procesan en el separador 20 bolsas de donantes con el programa original, y otras 20 bolsas de donantes con el nuevo programa modificado a partir del anterior. El volumen procesado en el separador con cada bolsa de donante es de 2000 ml.

Se evalúan ambos programas de separación comparando el grado de recuperación de células mononucleares y la contaminación de las demás poblaciones celulares en el concentrado celular obtenido. Para ello se analizan en ambos grupos de bolsas los parámetros hematológicos iniciales y del

concentrado celular obtenido. A partir de ellos se evalúa el rendimiento del separador en cada programa mediante el porcentaje de recuperación de cada población celular, según la expresión :

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de total de células obtenidas}}{\text{n}^\circ \text{ de total de células iniciales}} \times 100$$

Se analiza la fórmula leucocitaria y el porcentaje de células mononucleares (suma de linfocitos y monocitos) y de granulocitos (suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos), tanto en las muestras iniciales como en el concentrado celular obtenido. Los recuentos celulares se realizan en el contador celular Technicon H-1 y en microscopio óptico con tinción de May-Grünwald-Giemsa.

III-2.1.5) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE ENFERMOS LEUCEMICOS.

Se realiza un estudio de la obtención de células mononucleares de enfermos leucémicos en el separador celular con el programa modificado.

Se realiza la obtención de células mononucleares a 30 enfermos leucémicos en fase de remisión completa tras quimioterapia, las cuales se utilizaran en el trasplante medular autólogo posterior. Se procesa un volumen sanguíneo

aproximado al doble de la volémiya del enfermo. Las aféresis se realizan una vez alcanzada la remisión completa y no se utiliza ninguna manipulación para aumentar el número de células previamente a la aféresis.

Se analizan los parámetros hematológicos iniciales y del concentrado celular obtenido, así como el número total de células obtenidas. A partir de ellos se evalúa el rendimiento del separador mediante la eficiencia de recolección (EC) de cada población celular según la expresión:

$$EC = \frac{\text{n}^\circ \text{ total de células obtenidas}}{(\text{n}^\circ \text{ células iniciales/ml}) \times \text{Volumen procesado en el separador (ml)}} \times 100$$

Se analiza la fórmula leucocitaria y el porcentaje de células mononucleares (suma de linfocitos y monocitos) y de granulocitos (suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos), tanto en la muestra inicial como en el concentrado celular obtenido. Los recuentos celulares se realizan en el contador celular Technicon H-1 y en microscopio óptico con tinción de May-Grünwald-Giemsa.

III-2.2) OBTENCION DE CELULAS LAK.

La obtención de células LAK a partir de enfermos y donantes para el estudio de su actividad lítica se realiza mediante gradiente de densidad en ficoll a partir de sangre periférica, y posteriormente las células mononucleares obtenidas se activan mediante su incubación con IL-2.

El estudio de la actividad lítica "in vitro" de las células LAK frente a los blastos leucémicos se realiza mediante un test de lisis en el que se enfrentan como células efectoras las células mononucleares sin activar (actividad NK) y activadas con IL-2 (actividad LAK); y como células diana los blastos leucémicos y las líneas celulares K-562 y Daudi, según la metodología que se expone en los apartados siguientes (96, 133, 138-141).

III-2.2.1) METODO DE OBTENCION Y CONGELACION DE BLASTOS LEUCEMICOS.

III-2.2.1.1) Método de obtención de blastos leucémicos.

Se obtienen muestras de sangre periférica de enfermos con un porcentaje de blastos superior al 70% . Se extraen por punción venosa con material desechable y estéril, con 2% de heparina (20 U/ml) sin conservantes como anticoagulante.

Las muestras se procesan inmediatamente según las siguientes etapas, y trabajando siempre en esterilidad:

1º) La muestra se centrifuga a 400 g x 10min. y se elimina el sobrenadante.

2º) Se lavan las células sanguíneas 2 veces con medio HBSS por centrifugación a 400 g x 10min. y se elimina el sobrenadante.

3º) Se resuspende el botón celular en tubos de 50ml con unos 5 ml de medio HBSS por ml de botón celular.

4º) Se obtienen los blastos mediante extracción en gradiente de densidad con ficoll (1.077 sp. gr.).

5º) Se lavan las células recogidas 3 veces con medio HBSS.

6º) Se resuspende el botón celular final en 1 ó 2 ml de suero humano AB inactivado por calor con 7% de ACD-A.

7º) Se realiza el recuento celular y se determina la viabilidad de las células con solución de azul tripán.

III-2.2.1.2) Método de congelación de blastos leucémicos.

Se realiza la congelación de los blastos diana en una solución compuesta de suero humano AB inactivado por calor con dimetil sulfóxido (DMSO) 10% y anticoagulante ACD-A 7% .

La congelación se realiza en un congelador biológico Cryoson BV-10, y posteriormente se almacena la muestra en un contenedor con nitrógeno líquido hasta su utilización para el test de lisis. Las etapas a seguir en la congelación son :

1º) Se resuspenden los blastos diana en una solución con 93% de suero humano AB y 7% de ACD-A a una concentración entre 20 y 60 x 10⁶ células/ml (solución A).

2º) Se prepara en un baño de hielo una solución con 73% de suero humano AB, 7% de ACD-A y 20% de DMSO (solución B).

3º) En un baño de hielo se vierte lentamente (gota a gota) la solución B sobre la A en iguales proporciones, obteniéndose finalmente una solución de blastos de concentración entre 10 y 30 x 10⁶ células/ml, que es la solución final a congelar.

4º) En un baño de hielo se distribuye rápidamente la solución en porciones de 1ml en tubos Nunc de 1.8 ml estériles, y se introducen rápidamente en la cámara del congelador biológico.

5º) Se procede a la congelación propiamente dicha de las muestras en el congelador biológico con un descenso térmico de 1°C/min hasta -60°C y de 5°C/min hasta -120°C.

6º) Una vez finalizado el programa de congelación se extraen los tubos Nunc del congelador y se introducen en el contenedor de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

III-2.2.2) OBTENCION Y CONGELACION DE BLASTOS DE ENFERMOS LEUCEMICOS.

Se obtienen y congelan blastos de 21 enfermos diagnosticados de leucemia aguda para su posterior utilización en los test de lisis frente a células mononucleares de donantes y enfermos.

Se determina el porcentaje de blastos en la muestra final obtenida tras la extracción con ficoll, así como su viabilidad antes y después de la congelación.

III-2.2.3) CULTIVO DE LINEAS CELULARES K-562 Y DAUDI.

Las líneas leucemógenas K-562 y Daudi son utilizadas como controles del test de lisis al proporcionar un índice del grado de activación de las células LAK. Las líneas K-562 y Daudi están consideradas respectivamente como sensible y resistentes a las células NK, aunque ambas ven potenciadas su sensibilidad a las células LAK.

Previo a su utilización en el test de lisis estas líneas son mantenidas en medio de cultivo compuesto de RPMI-1640 con suero bovino fetal 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 0.1 mM, gentamicina 0.1 mg/ml, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 0.05 mg/ml, anfotericina-B 2.5 ug/ml, y

tamponado con bicarbonato sódico 2 g/l a pH=7.2-7.4. El cultivo se realiza en frascos de cultivo a 37°C, 5% CO₂ y humedad saturante, a una concentración de 3-5 x 10⁵ células/ml.

Se pueden criopreservar las células en una solución que contiene el mismo medio de cultivo con DMSO 10% a una concentración de 5-10 x10⁶ células/ml en tubos de congelación mantenidos 24 horas a -70°C, y almacenados posteriormente en nitrógeno líquido.

III-2.2.4) METODO DE CULTIVO DE CELULAS MONONUCLEARES CON IL-2.

La obtención de células mononucleares de donantes o enfermos para el test de lisis se realiza mediante extracción en gradiente de densidad con ficoll a partir de sangre periférica, según la siguiente metodología:

1º) Se obtienen muestras de sangre periférica anticoaguladas con 2% de heparina sin conservantes de donantes voluntarios o enfermos en remisión completa.

2º) Se obtienen las células mononucleares mediante extracción en gradiente de densidad con ficoll.

3º) Se lavan 2 veces con medio HBSS.

Para la obtención de células LAK se procede a la activación de estas células por incubación con IL-2 humana mediante la siguiente metodología:

1º) Las células mononucleares obtenidas de enfermos o donantes se trasvasan a tubos de centrifuga de 10 ml y se lavan dos veces con medio LAK compuesto de medio RPMI-1640 con suero humano AB 10%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 0.1 mM, gentamicina 0.1 mg/ml, penicilina 50 U/ml, estreptomycinina 0.05 mg/ml, anfotericina-B 2.5 ug/ml, y tamponado con bicarbonato sódico 2 g/l a pH=7.2-7.4.

2º) Se realiza el recuento celular y se determina la viabilidad de las células con solución de azul tripán.

3º) Se resuspenden las células mononucleares a una concentración de 1×10^6 células/ml en medio LAK con 1000 U/ml de IL-2 humana, en frascos de cultivo estériles. Se cultivan en paralelo células mononucleares con medio LAK sin IL-2 en las mismas condiciones para medir la actividad NK.

4º) Se incuban las células mononucleares en una estufa a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 días.

III-2.2.5) OBTENCION DE CELULAS LAK DE ENFERMOS Y DONANTES.

Se obtienen células mononucleares de 20 donantes sanos y 10 enfermos con leucemia aguda en remisión completa y se cultivan en medio LAK, con y sin IL-2, durante 4 días según la metodología del apartado anterior.

III-2.2.6) METODO DE CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD NK Y LAK.

Para evaluar la actividad citolítica de las células mononucleares cultivadas con IL-2 (actividad LAK) y sin IL-2 (actividad NK), se realiza un test de lisis de dichas células frente a células K-562, Daudi y blastos de enfermos como células diana.

III-2.2.6.1) Preparación de las células mononucleares.

1) Se toman aproximadamente 20×10^6 células del cultivo con y sin IL-2 de la estufa y se lavan dos veces con 10 ml de medio LAK por centrifugación a 400 g x 10min en tubos de 10 ml.

2) Se ajustan a 2×10^6 células/ml en medio LAK, y se hacen las diluciones necesarias en dicho medio para el test de lisis.

III-2.2.6.2) Preparación de células diana para el marcaje.

III-2.2.6.2.1) Preparación de blastos de enfermos.

Los blastos de enfermos se descongelan previamente al proceso de marcaje con Cr^{51} según la siguiente metodología:

1) Se preparan 10ml de medio LAK por cada ml de solución celular a descongelar, y se deposita en un baño de hielo picado.

2) Se procede a la descongelación de la muestra de blastos leucémicos en medio estéril, poniendo 1 ml de solución celular en un tubo de 10ml sobre baño de hielo, y añadiendo a dichas células el medio LAK en cantidades de 0.1ml, 0.2ml, 0.4ml, 0.8ml, etc. hasta completar 10ml a intervalos de 1 min. cada una.

3) Se centrifuga a 400 g x 10min. y se tira el sobrenadante.

4) Se lavan 2 veces más con medio LAK y se realiza el recuento celular y la viabilidad tras el último lavado.

5) Se toman unas 10×10^6 células diana y se resuspenden en 200 ul de medio LAK.

III-2.2.6.2.2) Preparación de células diana K-562 y Daudi.

Se preparan a partir de los cultivos celulares según la siguiente metodología :

1) Se realiza el recuento celular y la viabilidad del cultivo.

2) Se toman 10×10^6 células diana y se lavan 2 veces con medio LAK, se tira el sobrenadante, y se resuspenden en 200 ul de medio.

III-2.2.6.3) Marcaje de las células diana con Cr⁵¹.

Se sigue la siguiente metodología, tanto para blastos de enfermos como para las líneas celulares K-562 y Daudi.

1) Se añaden 300 uCi de Cr⁵¹ a los blastos de enfermos y 100 uCi de Cr⁵¹ a las células diana K-562 y Daudi.

2) Se incuban durante 90 minutos en una estufa a 37°C y con 5% CO₂ sobre un agitador Nutator.

3) Se lavan 2 veces con 10 ml de medio LAK.

4) Se añaden 20 ml de medio LAK en tubos de 25 ml y se incuban nuevamente en estufa a 37°C y 5% CO₂ sobre un agitador Nutator durante 45 minutos.

5) Se lavan 2 veces con 10 ml de medio LAK y se resuspende en 3 ml de medio.

6) Se filtra a través de un filtro de 100 um para eliminar los grumos de células.

7) Se realiza el recuento celular y la viabilidad, y se resuspenden a una concentración de 1×10^5 células/ml, siendo ésta la suspensión diana final.

III-2.2.6.4) Test de lisis.

Se utilizan las soluciones de células mononucleares preparados en el apartado III-2.2.6.1, y las soluciones de células diana preparadas en el apartado III-2.2.6.3. Las etapas a seguir son:

1) En una placa microtiter de 96 pocillos de fondo redondo y estéril se pone :

a) 100 ul de medio LAK con IL-2 en los 3 primeros pocillos. Es el control negativo.

b) Se añaden 100 ul de SDS al 2% en los 3 siguientes pocillos para romper la membrana celular de las células diana y liberar el Cr^{51} que habían tomado. Es el control positivo.

c) En los siguientes pocillos se ponen 100 ul de células activadas en triplicado de cada una de las diluciones preparadas, realizándose a las proporciones efector:diana (E:D) de 2.5:1, 5:1, 10:1, 20:1, y 40:1. Análogamente se procede con las células cultivadas sin IL-2.

d) A todos los pocillos se añaden 50 ul de blastos diana.

e) Se centrifuga la placa a 500 rpm x 5 min.

Este esquema de trabajo en placa se repite para cada tipo de célula diana a utilizar.

2) Se cubren las placas de microtitulación y se incuban durante 4h. a 37°C con 5% CO_2 en estufa.

3) Se centrifugan a 1000 rpm y se separa el sobrenadante con un sistema de filtros Skatron.

4) Los filtros del sistema Skatron con el sobrenadante absorbido se ponen dentro de tubos de 1 ml en un contador de radiaciones gamma para cuantificar el Cr^{51} como cuentas por minuto (cpm).

5) Se calcula el porcentaje de lisis según la siguiente expresión:

$$\% \text{lisis} = \frac{\text{cpm experimental} - \text{cpm espontáneo}}{\text{cpm máximo} - \text{cpm espontáneo}} \times 100$$

siendo dichas cpm experimental, cpm espontáneo y cpm máximo, las cpm de la muestra, el control negativo, y el control positivo, respectivamente.

III-2.2.6.5) Validez del test de lisis.

Se consideran válidos los test de lisis que cumplan las siguientes características :

1º) La solución celular de blastos ha de tener al menos un 70% de blastos, y una viabilidad superior al 70% .

2º) Las líneas celulares K-562 y Daudi han de tener una viabilidad superior al 80% .

3º) Las cpm máximas han de ser superiores a 3000 cpm.

4º) Las cpm espontáneas han de ser inferiores al 20% de las cpm máximas.

5º) El fondo ha de ser inferior al 20% de las cpm espontáneas.

III-2.2.7) CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD NK Y LAK.

Se realiza la cuantificación de las actividades NK y LAK frente a blastos leucémicos de células mononucleares autólogas de 10 enfermos con leucemia aguda y de 20 donantes sanos, según la metodología expuesta anteriormente. Se utilizan como control del test de lisis las células K-562 y Daudi.

Posteriormente se comparan:

- las actividades NK y LAK para comprobar la activación debida a la IL-2,
- las actividades LAK frente a blastos leucémicos tipo LLA y LMA,
- las actividades que presentan los enfermos y donantes,
- y se determina el porcentaje de enfermos sensibles a las células LAK autólogas y alogénicas.

Se considera que los blastos de un enfermo son sensibles a las células LAK cuando éstas presentan una actividad lítica mayor que el límite de confianza superior de la media de actividad NK a la misma proporción E:D, definido por la expresión:

$$" \text{ actividad media NK} + t \times \text{DE} "$$

siendo DE la desviación estándar y "t" el valor de la t-Student (para n-1 grados de libertad y $p < 0.05$)

III-2.3) TRATAMIENTO ESTADISTICO.

La comparación estadística de medias se realiza mediante pruebas no paramétricas: el test de Wilcoxon o del rango con signo para muestras apareadas y el test de Mann-Whitney para muestras independientes (142). El intervalo de confianza considerado fue del 95% ($p < 0.05$).

El análisis estadístico se realiza con el programa de software "Tadpole" versión 2.01 (T.H. Caradoc-Davies, Elsevier-Biosoft, Cambridge UK, 1986).

IV. RESULTADOS

**IV-1. OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES
EN EL SEPARADOR CELULAR**

IV-1.1) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE BOLSAS DE DONANTES.

Se obtienen células mononucleares de bolsas de donantes en el separador celular CS-3000 mediante dos programas de separación, el programa original suministrado por el fabricante, y el modificado a partir de éste. Se procesan 20 bolsas de donantes con cada programa. El volumen procesado con cada bolsa es de 2000 ml.

IV-1.1.1) PARAMETROS HEMATOLOGICOS DE BOLSAS DE DONANTES.

Los valores medios y las desviaciones estándar de los parámetros hematológicos de la bolsa inicial y del concentrado celular obtenido de 20 bolsas de donante procesadas con cada programa de separación se exponen en la tabla II. Entre los parámetros hematológicos se indican las células mononucleares como suma de linfocitos y monocitos; y los granulocitos como suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos. También se indica el volumen de la bolsa inicial y el de la bolsa de recolección.

En dicha tabla se exponen las comparaciones estadísticas de los parámetros hematológicos entre ambos programas de separación.

BOLSAS DE DONANTES

HEMOGRAMA INICIAL

POBLACION CELULAR	P. ORIGINAL	P. MODIFICADO
HEMATIES xE9 #	4.11 (0.73)	4.41 (0.34)
PLAQUETAS xE8 #	1.81 (0.58)	2.06 (0.41)
LEUCOCITOS xE6 #	4.84 (1.37)	5.62 (1.00)
LINFOCITOS xE6 #	1.90 (0.69)	2.15 (0.60)
MONOCITOS xE6 #	0.35 (0.24)	0.41 (0.21)
NEUTROFILOS xE6 #	2.44 (0.76)	2.87 (0.64)
EOSINOFILOS xE6 #	0.10 (0.06)	0.13 (0.06)
BASOFILOS xE6 #	0.05 (0.02)	0.06 (0.02)
C. MONONUCLEARESx E6 #	2.25 (0.88)	2.56 (0.56)
GRANULOCITOS xE6 #	2.59 (0.77)	3.06 (0.66)
HB (mg/dl) #	12.8 (2.0)	13.4 (1.2)
HTC (%) #	38.8 (6.1)	40.8 (3.6)
VOLUMEN (ml) #	496 (16)	488 (10)

HEMOGRAMA OBTENIDO

POBLACION CELULAR	P. ORIGINAL	P. MODIFICADO
HEMATIES xE9 *	0.08 (0.08)	0.18 (0.16)
PLAQUETAS xE8 #	1.15 (0.39)	1.42 (0.36)
LEUCOCITOS xE6 *	2.58 (0.88)	5.20 (1.27)
LINFOCITOS xE6 *	2.32 (0.78)	4.32 (1.32)
MONOCITOS xE6 *	0.19 (0.13)	0.54 (0.24)
NEUTROFILOS xE6 *	0.07 (0.05)	0.32 (0.30)
EOSINOFILOS xE6 *	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)
BASOFILOS xE6 *	0.00 (0.00)	0.01 (0.01)
C. MONONUCLEARESx E6 *	2.51 (0.88)	4.86 (1.32)
GRANULOCITOS xE6 *	0.07 (0.05)	0.34 (0.30)
HB (mg/dl) *	0.3 (0.3)	0.6 (0.4)
HTC (%) *	0.9 (0.8)	1.7 (1.4)
VOLUMEN (ml) #	199 (3)	200 (2)

TABLA II : Parámetros hematológicos iniciales y del concentrado celular obtenido (n° de células/ml) de bolsas de donantes en el separador celular. Valores medios (DE) de 20 bolsas con cada programa.
 # NSD, $p > 0.05$
 * SD, $p < 0.05$

IV-1.1.2) RECUPERACION CELULAR DE BOLSAS DE DONANTES.

Los porcentajes medios de recuperación celular y las desviaciones estándar de las distintas poblaciones celulares obtenidos tras procesar 20 bolsas de donantes con cada programa se exponen en la figura 3.

La comparación estadística de los porcentajes de recuperación celular de ambos programas se expone en dicha figura.

IV-1.1.3) FORMULAS LEUCOCITARIAS DE BOLSAS DE DONANTES.

Las fórmulas leucocitarias medias y desviaciones estándar de la muestra inicial y del concentrado celular obtenido de 20 bolsas con cada programa se exponen en la figura 4. Se determinan las células mononucleares como suma de linfocitos y monocitos, y los granulocitos como suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

La comparación estadística de las fórmulas leucocitarias de ambos programas se expone en dicha figura.

BOLSAS DE DONANTES RECUPERACION CELULAR (%)

POBLACION CELULAR	P. ORIGINAL	P. MODIFICADO
HEMATIES *	0.9 (0.8)	1.7 (1.5)
PLAQUETAS #	26.3 (6.3)	27.9 (2.7)
LEUCOCITOS *	21.6 (4.9)	37.9 (7.3)
LINFOCITOS *	50.1 (7.7)	82.7 (12.7)
MONOCITOS *	25.7 (12.3)	56.1 (11.5)
NEUTROFILOS *	1.2 (0.9)	4.7 (4.6)
EOSINOFILOS *	0.0 (0.0)	4.7 (4.5)
BASOFILOS *	0.0 (0.0)	8.0 (5.2)
C. MONONUCLEARES*	46.2 (8.3)	77.2 (9.4)
GRANULOCITOS *	1.2 (0.9)	4.8 (4.5)

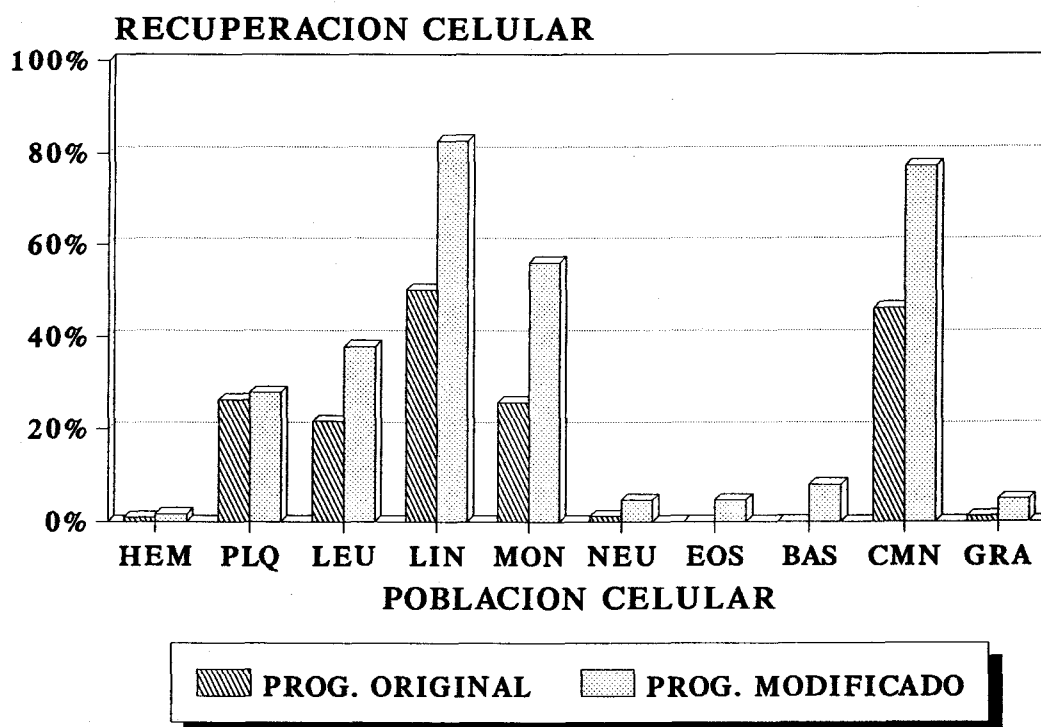


FIGURA 3 : Recuperación celular (%) obtenida de bolsas de donantes procesadas en el separador con cada programa. Valores medios (DE) de 20 bolsas.

NSD, $p > 0.05$

* SD, $p < 0.05$

BOLSAS DE DONANTES FORMULA LEUCOCITARIA

POBL. CELULAR	P. ORIGINAL	P. MODIFICADO
MUESTRA INICIAL		
LINFOCITOS #	39.3 (9.6)	38.0 (7.3)
MONOCITOS #	7.0 (3.7)	7.6 (3.7)
NEUTROFILOS #	50.6 (12.3)	50.9 (6.6)
EOSINOFILOS #	2.0 (1.2)	2.4 (1.0)
BASOFILOS #	1.1 (0.4)	1.1 (0.4)
C. MONONUCLEARES #	46.3 (11.8)	45.8 (6.5)
GRANULOCITOS #	53.7 (11.8)	54.4 (6.5)
MUESTRA OBTENIDA		
LINFOCITOS *	90.0 (3.5)	82.1 (7.7)
MONOCITOS *	7.0 (3.3)	11.0 (5.6)
NEUTROFILOS *	2.9 (2.4)	6.5 (6.5)
EOSINOFILOS *	0.1 (0.1)	0.2 (0.2)
BASOFILOS *	0.1 (0.1)	0.2 (0.2)
C. MONONUCLEARES *	97.0 (2.4)	93.1 (6.5)
GRANULOCITOS *	3.0 (2.4)	6.9 (6.5)

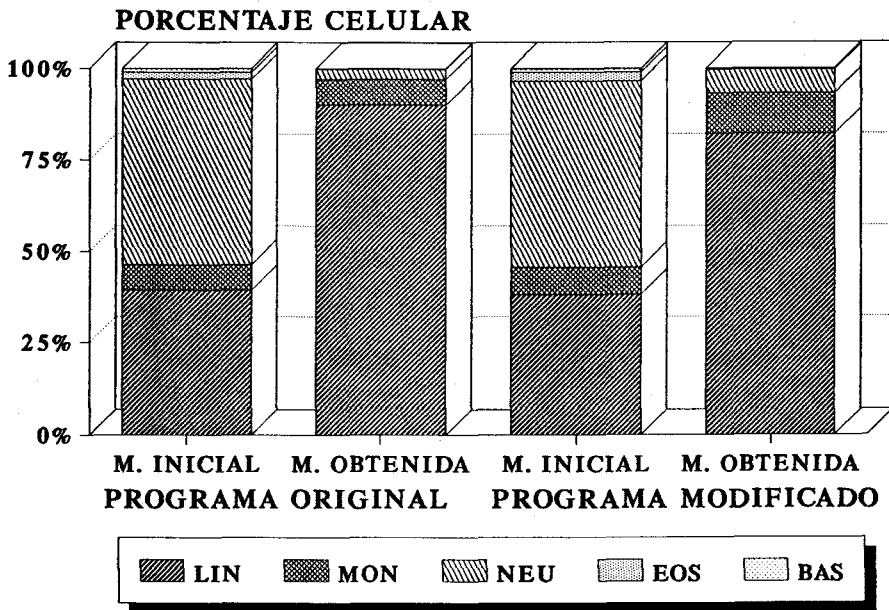


FIGURA 4 : F6rmula leucocitaria (%) inicial y obtenida de bolsas de donantes procesadas en el separador. Valores medios (DE) de 20 bolsas.

NSD, $p > 0.05$

* SD, $p < 0.05$

**IV-1.2) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE ENFERMOS
LEUCEMICOS.**

Se obtienen células mononucleares de 30 enfermos leucémicos en remisión completa tras quimioterapia en el separador celular con el programa modificado. Se procesa un volumen sanguíneo aproximado al doble de la volémi del enfermo. El volumen sanguíneo medio (\pm DE) procesado es de 6787 (\pm 1257)ml.

IV-1.2.1) PARAMETROS HEMATOLOGICOS DE ENFERMOS.

Los valores medios y las desviaciones estándar de los parámetros hematológicos iniciales del enfermo y del concentrado celular obtenido de 30 enfermos en el separador se exponen en la tabla III.

Entre los parámetros hematológicos se indican las células mononucleares como suma de linfocitos y monocitos; y los granulocitos como suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos. También se indica la volémi del enfermo y el volumen de la bolsa de recolección.

ENFERMOS

HEMOGRAMA INICIAL

	MEDIA	DE
HEMATIES	3.43xE9	0.43xE9
PLAQUETAS	0.70xE8	0.66xE8
LEUCOCITOS	2.16xE6	0.81xE6
LINFOCITOS	0.95xE6	0.47xE6
MONOCITOS	0.31xE6	0.28xE6
NEUTROFILOS	0.88xE6	0.49xE6
EOSINOFILOS	0.01xE6	0.01xE6
BASOFILOS	0.02xE6	0.01xE6
C. MONONUCLEARES	1.26xE6	0.63xE6
GRANULOCITOS	0.91xE6	0.51xE6
HB. (mg/dl)	10.6	0.9
HTC.(%)	30.6	2.9
VOLEMIA (ml)	3655	645

HEMOGRAMA OBTENIDO

	MEDIA	DE
HEMATIES	0.49xE9	0.30xE9
PLAQUETAS	6.65xE8	8.27xE8
LEUCOCITOS	27.1xE6	16.7xE6
LINFOCITOS	19.3xE6	9.98xE6
MONOCITOS	5.83xE6	7.01xE6
NEUTROFILOS	1.94xE6	2.16xE6
EOSINOFILOS	0.01xE6	0.02xE6
BASOFILOS	0.03xE6	0.02xE6
C. MONONUCLEARES	25.1xE6	15.0xE6
GRANULOCITOS	1.99xE6	2.17xE6
HB. (mg/dl)	1.3	0.8
HTC.(%)	4.3	3.3
VOLUMEN (ml)	199	3

TABLA III : Parámetros hematológicos iniciales y del concentrado celular obtenido (n° de células/ml) de enfermos en el separador celular. Valores medios y DE de 30 enfermos con el programa modificado.

IV-1.2.2) CELULAS TOTALES OBTENIDAS DE ENFERMOS.

Los valores medios y desviaciones estándar del número de células totales obtenidas de 30 enfermos para cada población celular se exponen en la figura 5.

IV-1.2.3) EFICIENCIA DE RECOLECCION CELULAR DE ENFERMOS.

La eficiencia de recolección celular media y las desviaciones estándar de las distintas poblaciones celulares de 30 enfermos se exponen en la figura 6.

IV-1.2.4) FORMULAS LEUCOCITARIAS DE ENFERMOS.

Las fórmulas leucocitarias medias y desviaciones estándar de la muestra inicial y del concentrado celular obtenido de 30 enfermos se exponen en la figura 7. Se determinan las células mononucleares como suma de linfocitos y monocitos, y los granulocitos como suma de neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

ENFERMOS CELULAS TOTALES OBTENIDAS

POBLACION CELULAR	MEDIA	DE
HEMATIES	9.807xE10	6.081xE10
PLAQUETAS	1.340xE11	1.686xE11
LEUCOCITOS	5.426xE9	3.362xE9
LINFOCITOS	3.863xE9	2.011xE9
MONOCITOS	1.170xE9	1.362xE9
NEUTROFILOS	0.389xE9	0.433xE9
EOSINOFILOS	0.003xE9	0.004xE9
BASOFILOS	0.006xE9	0.004xE9
C. MONONUCLEARES	5.028xE9	3.017xE9
GRANULOCITOS	0.398xE9	0.433xE9

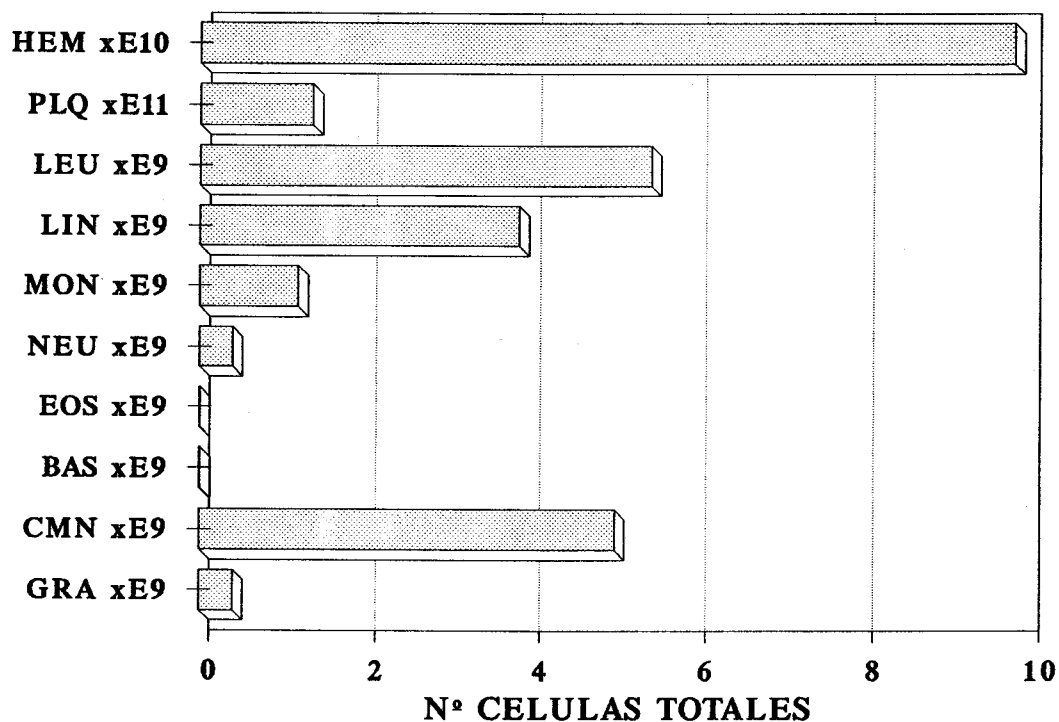


FIGURA 5 : Células totales obtenidas de enfermos en el separador con el programa modificado. Valores medios y DE de 30 enfermos.

ENFERMOS

EFICIENCIA DE RECOLECCION CELULAR (%)

POBLACION CELULAR	MEDIA	DE
HEMATIES	0.4	0.2
PLAQUETAS	27.5	9.4
LEUCOCITOS	37.4	12.3
LINFOCITOS	62.4	11.3
MONOCITOS	52.3	11.6
NEUTROFILOS	7.7	5.6
EOSINOFILOS	5.4	9.1
BASOFILOS	5.7	4.3
CEL. MONONUCLEARES	59.4	9.9
GRANULOCITOS	7.5	5.4

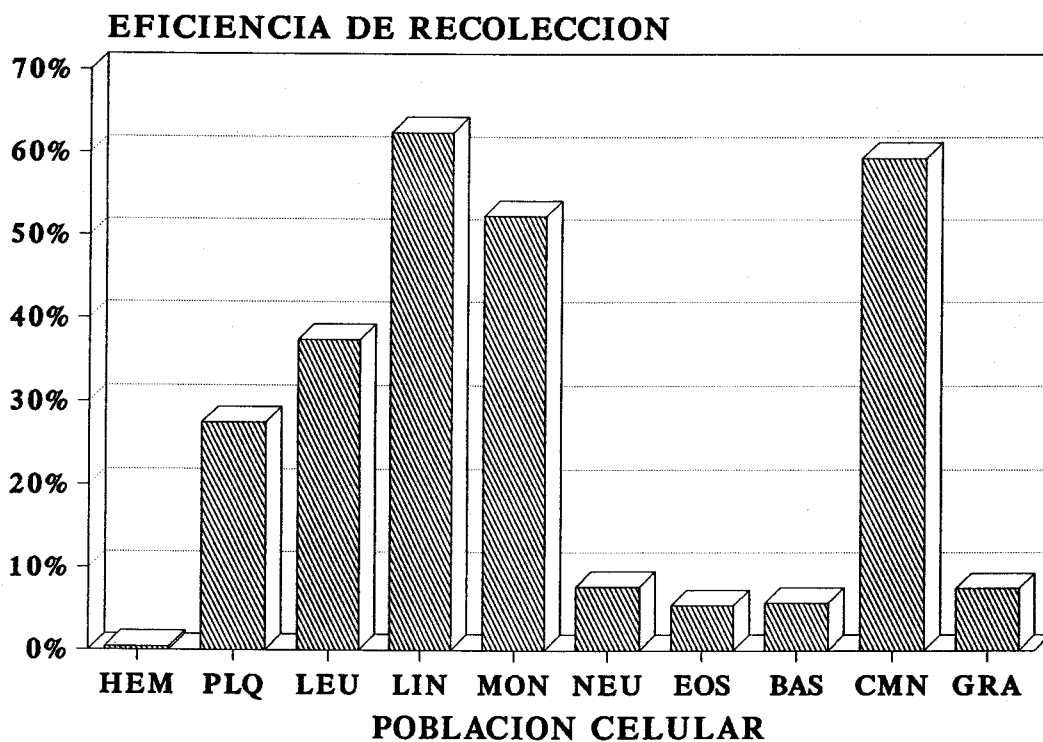


FIGURA 6 : Eficiencia de recolección celular (%) de enfermos en el separador con el programa modificado. Valores medios y DE de 30 enfermos.

ENFERMOS FORMULA LEUCOCITARIA

POBLACION CELULAR	M. INICIAL	M. OBTENIDA
LINFOCITOS	45.3 (20.6)	72.1 (16.8)
MONOCITOS	13.8 (8.2)	20.6 (12.4)
NEUTROFILOS	39.5 (17.9)	7.1 (5.4)
EOSINOFILOS	0.5 (0.3)	0.1 (0.1)
BASOFILOS	0.9 (0.5)	0.1 (0.1)
C. MONONUCLEARES	59.1 (18.0)	92.7 (5.4)
GRANULOCITOS	40.9 (18.0)	7.3 (5.4)

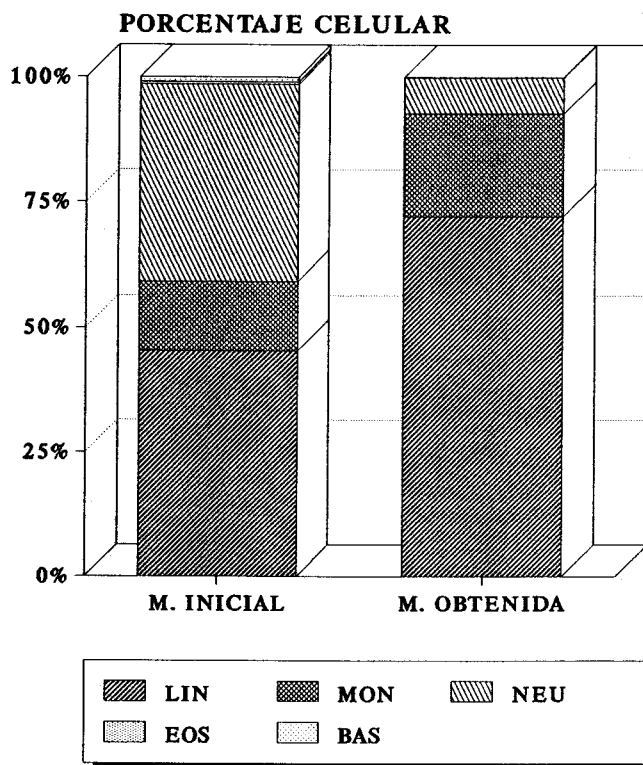


FIGURA 7 : F6rmula leucocitaria (%) inicial y obtenida de enfermos en el separador con el programa modificado. Valores medios (DE) de 30 enfermos.

IV-2. OBTENCION DE CELULAS LAK

IV-2.1) OBTENCION Y CONGELACION DE BLASTOS LEUCEMICOS.

Se obtienen blastos de 21 enfermos diagnosticados de leucemia aguda (tabla IV) con edades comprendidas entre los 3 y 77 años. Tras la obtención de blastos mediante extracción en gradiente de densidad con ficoll, las muestras presentan un porcentaje medio (\pm DE) de blastos del 88.1% (\pm 13.8%).

Las viabilidades medias y desviaciones estándar de las 21 muestras de blastos antes de la congelación y tras la descongelación para su utilización en los test de lisis se muestran en la figura 8.

La comparación estadística de ambas viabilidades se expone en dicha figura.

ENFERMOS DIAGNOSTICOS

CLASIFICACION FAB	Nº ENFERMOS
L. linfoblástica aguda (LLA)	10
* LLA tipo L1	1
* LLA tipo L2	9
L. mieloblástica aguda (LMA)	11
* LMA tipo M1	4
* LMA tipo M2	2
* LMA tipo M3	1
* LMA tipo M5	4

TABLA IV : Diagnósticos según la clasificación FAB de 21 enfermos leucémicos.

BLASTOS LEUCEMICOS VIABILIDAD (%)

	MEDIA	DE
VIABILIDAD PRE-CONGELACION	96.0	3.1
VIABILIDAD POST-DESCONGELACION	88.4	6.1

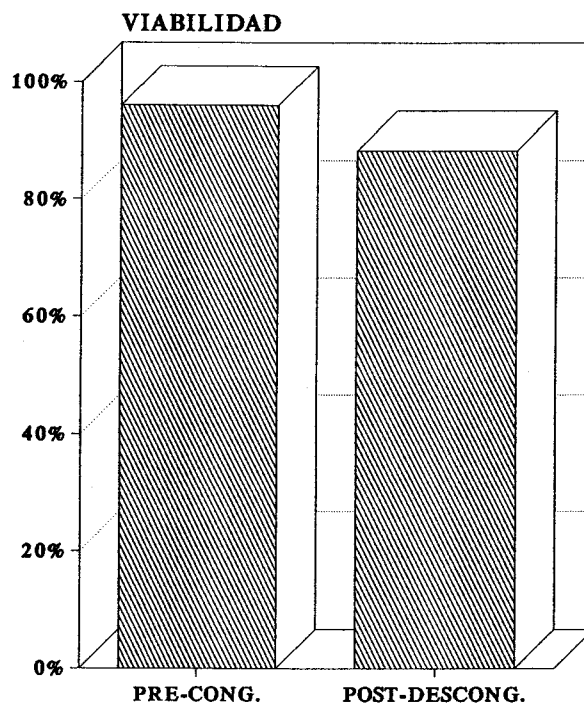


FIGURA 8 : Viabilidades de blastos leucémicos antes y después del proceso de congelación. Viabilidades medias y DE de 21 enfermos. Ambas son significativamente diferentes, $p < 0.05$

IV-2.2) ACTIVIDADES CITOLITICAS NK Y LAK FRENTE A CELULAS TUMORALES.

IV-2.2.1) ACTIVIDAD CITOLITICA DE DONANTES SANOS.

IV-2.2.1.1) Actividad citolítica de donantes sanos frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos.

Las actividades citolíticas medias y las desviaciones estándar de células NK y LAK de 20 donantes sanos frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos se exponen respectivamente en las figuras 9 a 11.

La comparación estadística de actividades NK y LAK a todas las proporciones E:D (efector:diana) aparecen en dichas figuras.

DONANTES SANOS ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A K562

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	1.9	3.6	6.1	8.4	12.4
DE	2.6	2.3	2.8	4.7	6.8
ACTIVIDAD LAK	26.1	41.3	53.0	59.0	67.6
DE	6.6	5.4	6.7	7.1	7.0

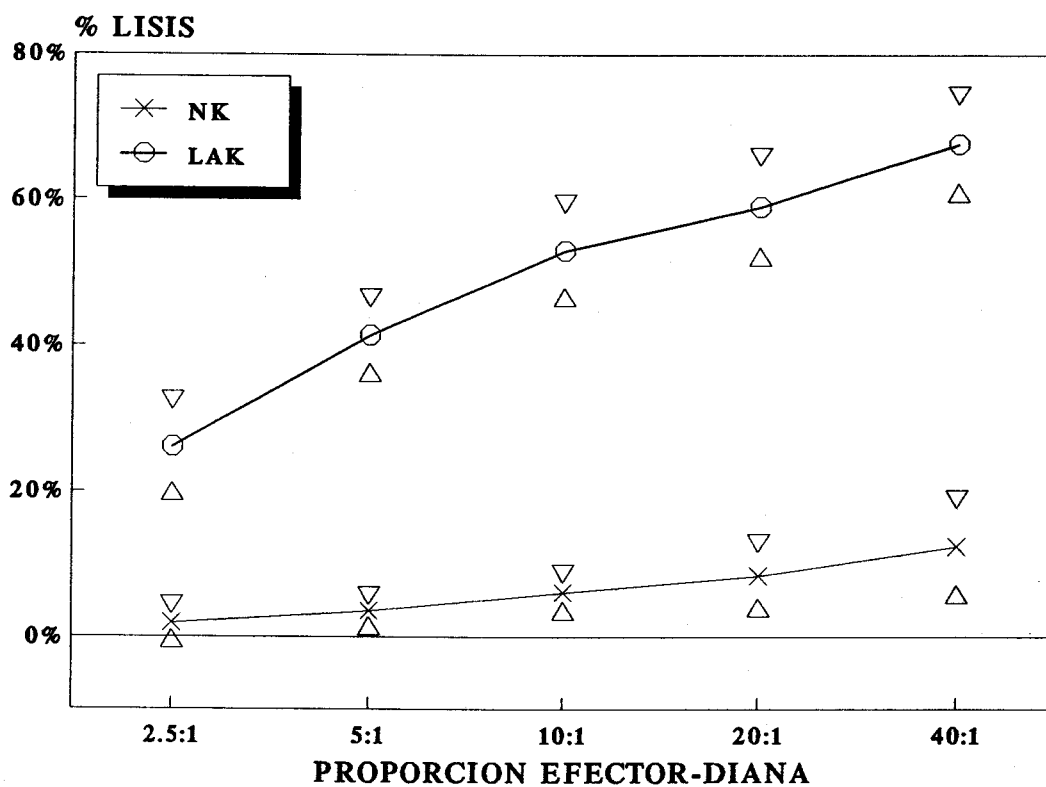


FIGURA 9 : Actividades citolíticas NK y LAK de donantes sanos frente a células K562. Actividades medias (n=20) y DE.
* SD, $p < 0.05$

DONANTES SANOS ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A DAUDI

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	0.5	1.5	1.9	3.0	3.9
DE	1.4	2.0	2.5	1.7	2.1
ACTIVIDAD LAK	23.8	37.3	48.8	54.3	61.9
DE	7.0	9.7	7.2	7.7	8.8

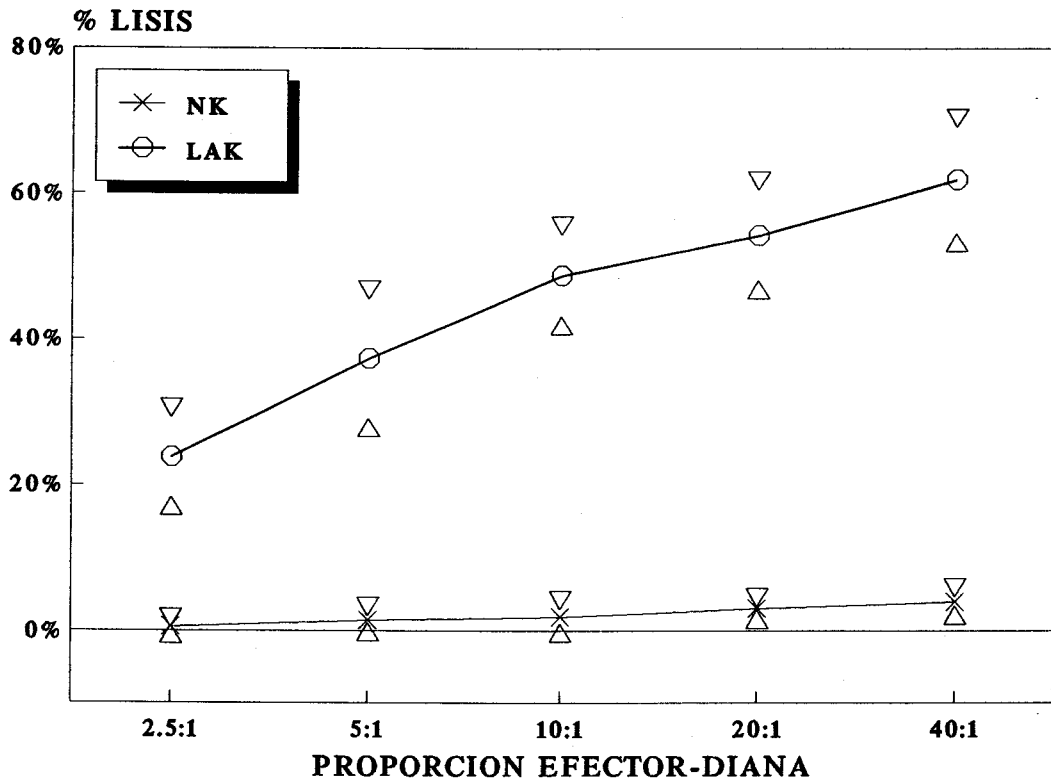


FIGURA 10 : Actividades citolíticas NK y LAK de donantes sanos frente a células Daudi. Actividades medias (n=20) y DE.

* SD, $p < 0.05$

DONANTES SANOS

ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A BLASTOS LEUCEMICOS

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	0.1	0.8	1.1	3.4	4.5
DE	2.7	2.8	3.7	5.1	5.6
ACTIVIDAD LAK	7.7	10.7	13.6	17.7	19.6
DE	8.6	9.2	10.3	10.8	11.2

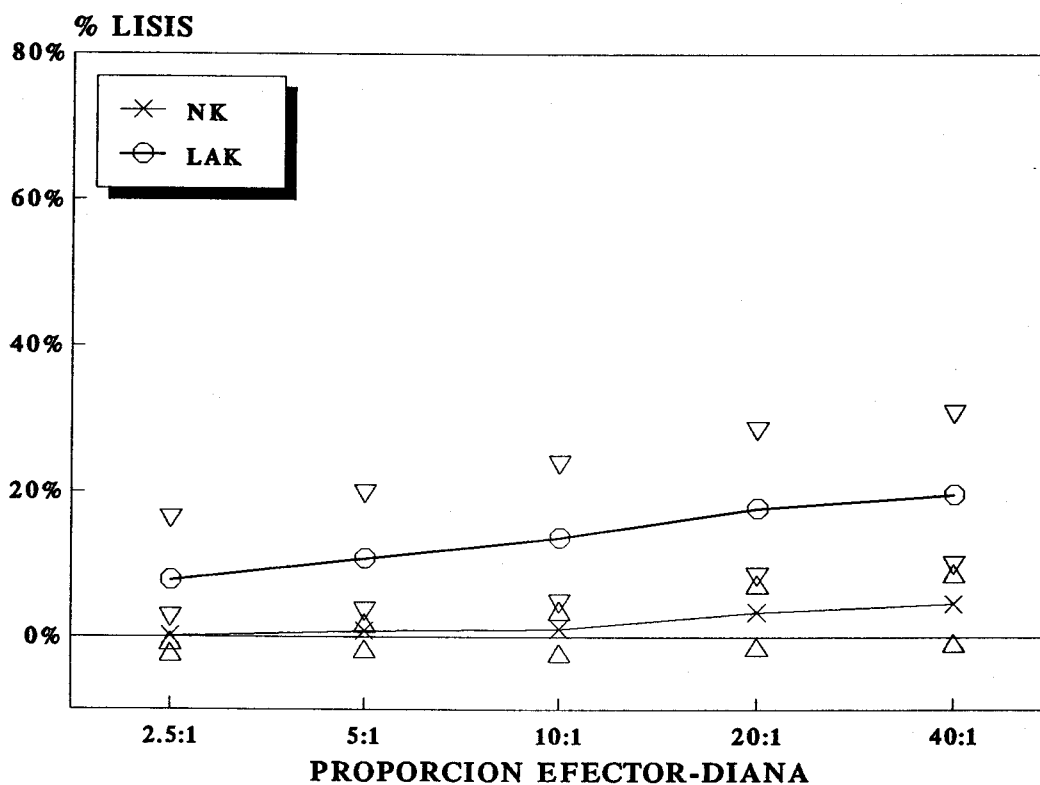


FIGURA 11 : Actividades citolíticas NK y LAK de donantes sanos frente a blastos leucémicos. Actividades medias (n=20) y DE.

* SD, $p < 0.05$

IV-2.2.1.2) Actividad citolítica de donantes sanos frente a blastos leucémicos tipo LLA y LMA.

Las actividades citolíticas medias de células NK y LAK de donantes sanos frente a blastos tipo LLA (n=10) y LMA (n=10) se exponen en la figura 12.

La comparación estadística de actividades frente a blastos tipo LLA y LMA se expone en dicha figura.

DONANTES SANOS

ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A BLASTOS LLA/LMA

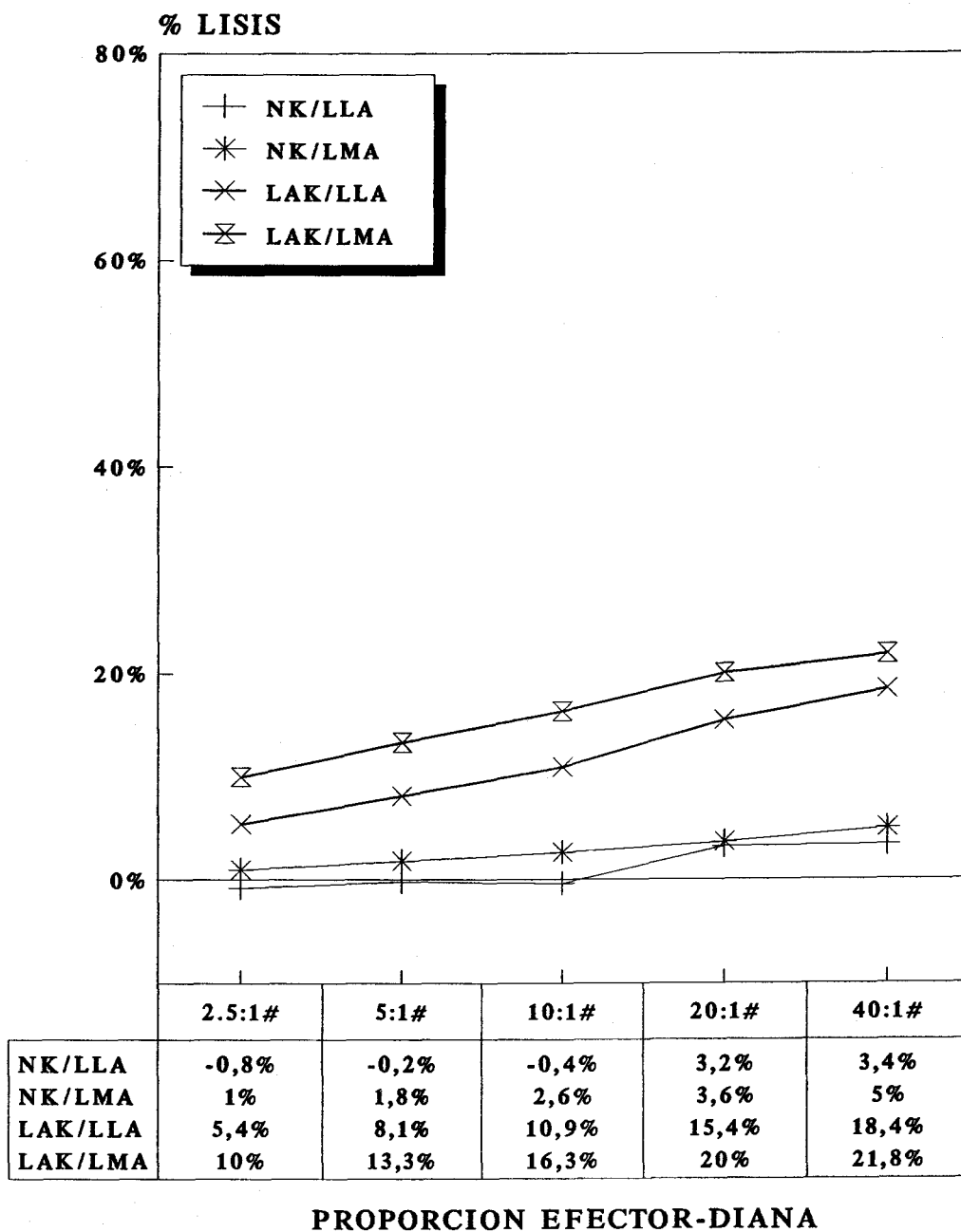


FIGURA 12 : Actividades citolíticas medias NK y LAK de donantes sanos frente a blastos tipo LLA (n=10) y LMA (n=10).
NSD, $p > 0.05$

**IV-2.2.2) ACTIVIDAD CITOLITICA DE ENFERMOS CON LEUCEMIA
AGUDA.**

IV-2.2.2.1) Actividades citolíticas de enfermos.

Las actividades citolíticas de células NK y LAK de 10 enfermos frente a células K-562, Daudi y blastos leucémicos autólogos se representan en las figuras 13 a 22.

ENFERMO N°1 : LLA ACTIVIDAD CITOLITICA

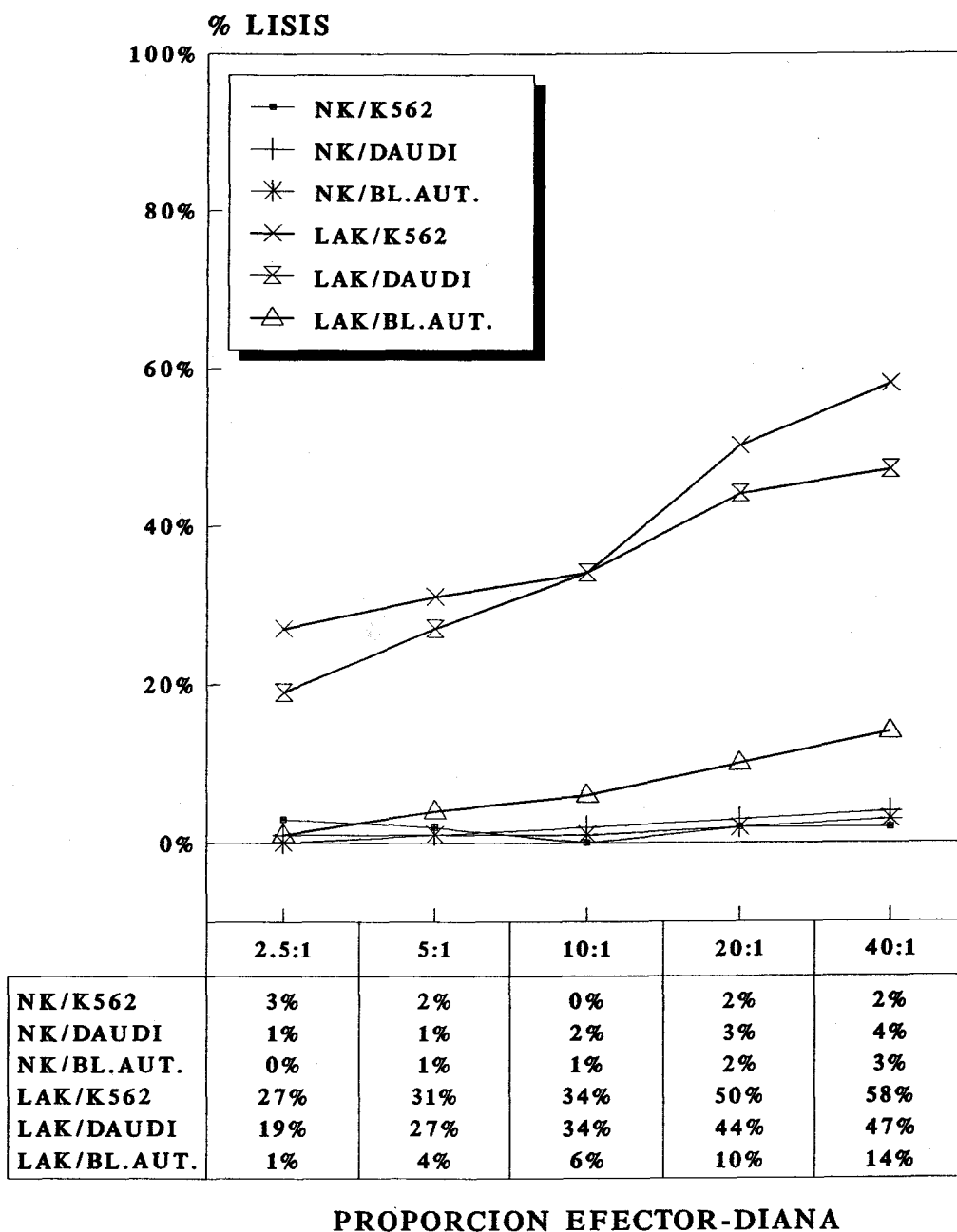


FIGURA 13 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LLA en remisión completa.

ENFERMO N°2 : LLA ACTIVIDAD CITOLITICA

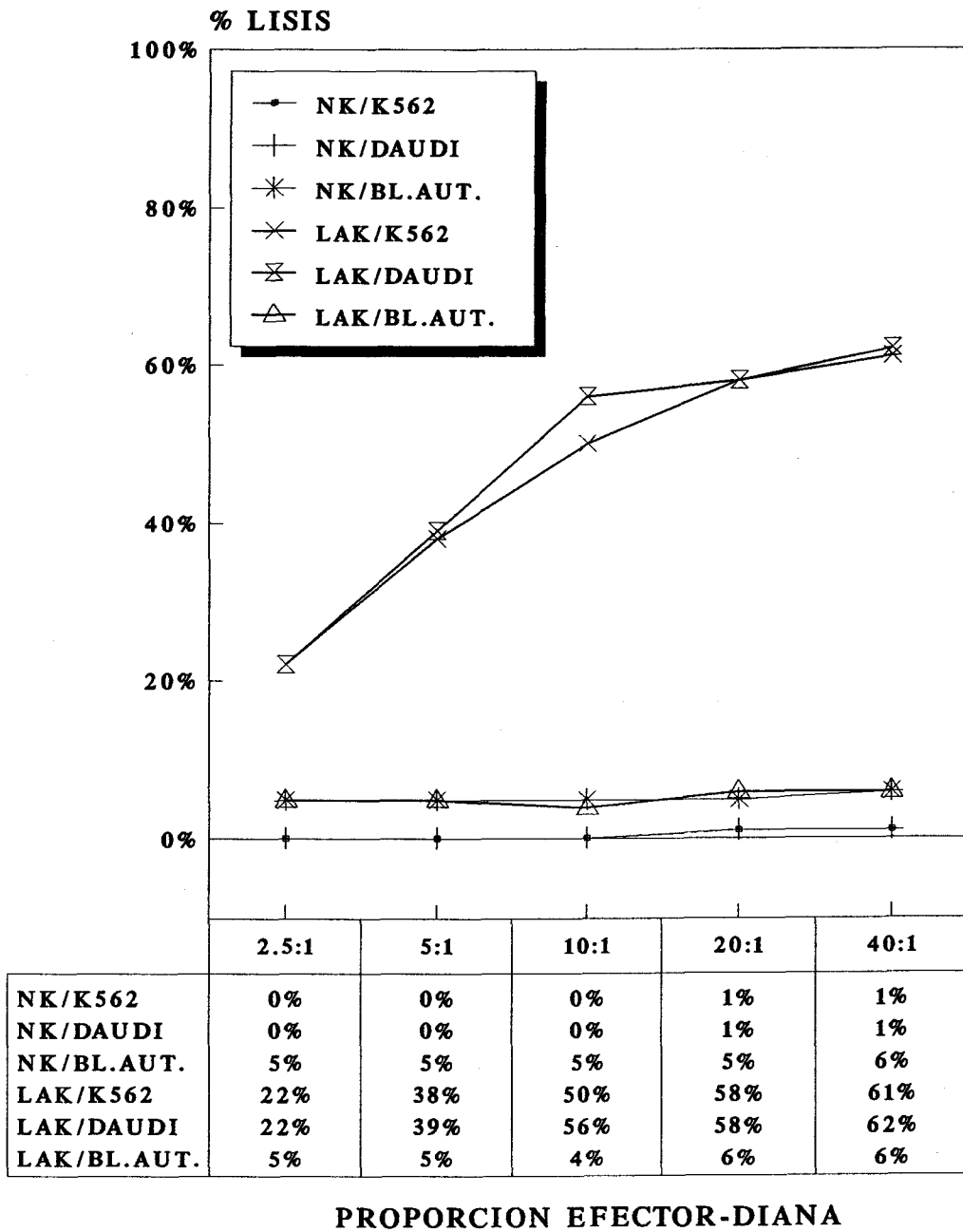


FIGURA 14 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LLA en remisión completa.

ENFERMO N°3 : LLA ACTIVIDAD CITOLITICA

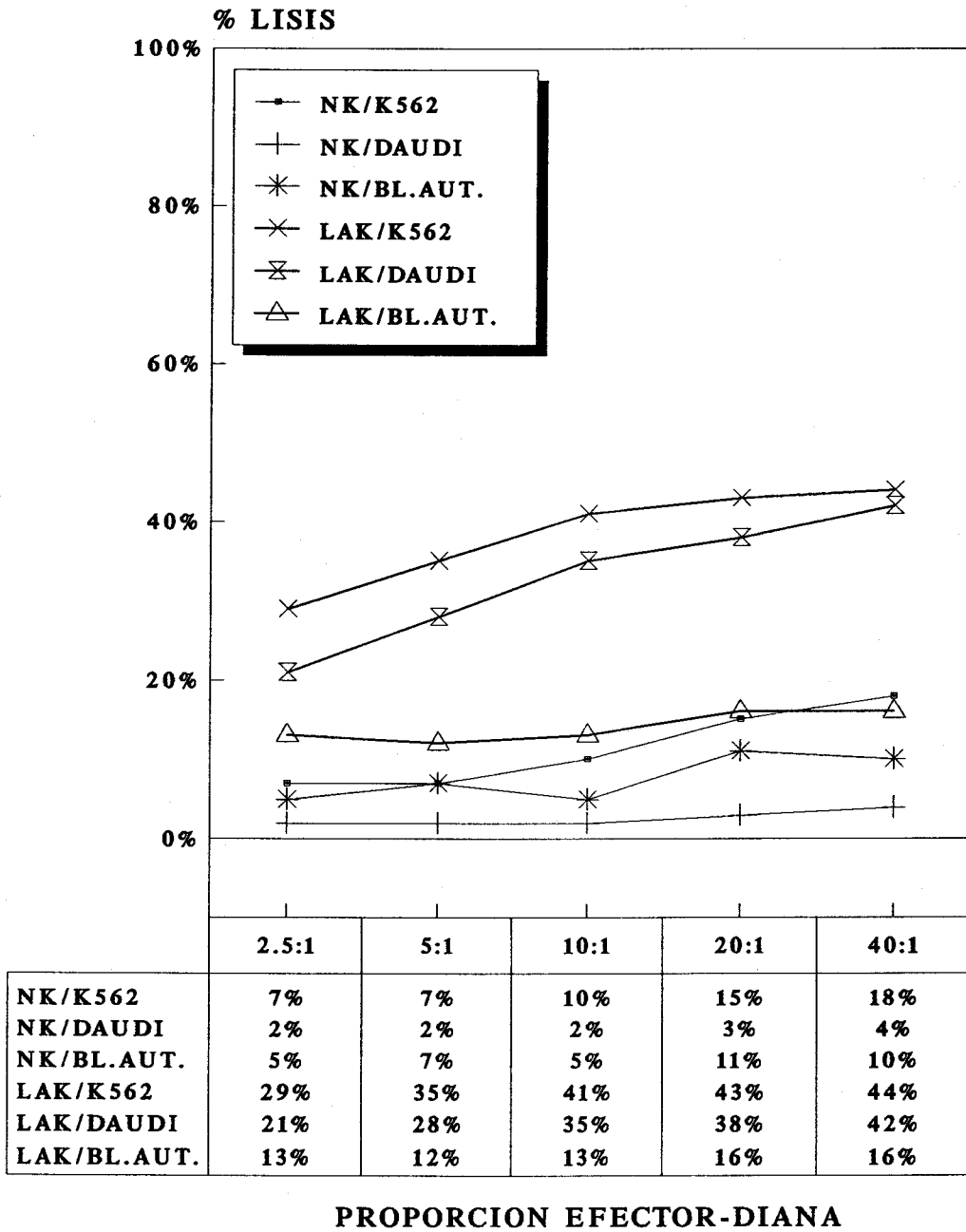


FIGURA 15 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LLA en remisión completa.

ENFERMO N°4 : LLA ACTIVIDAD CITOLITICA

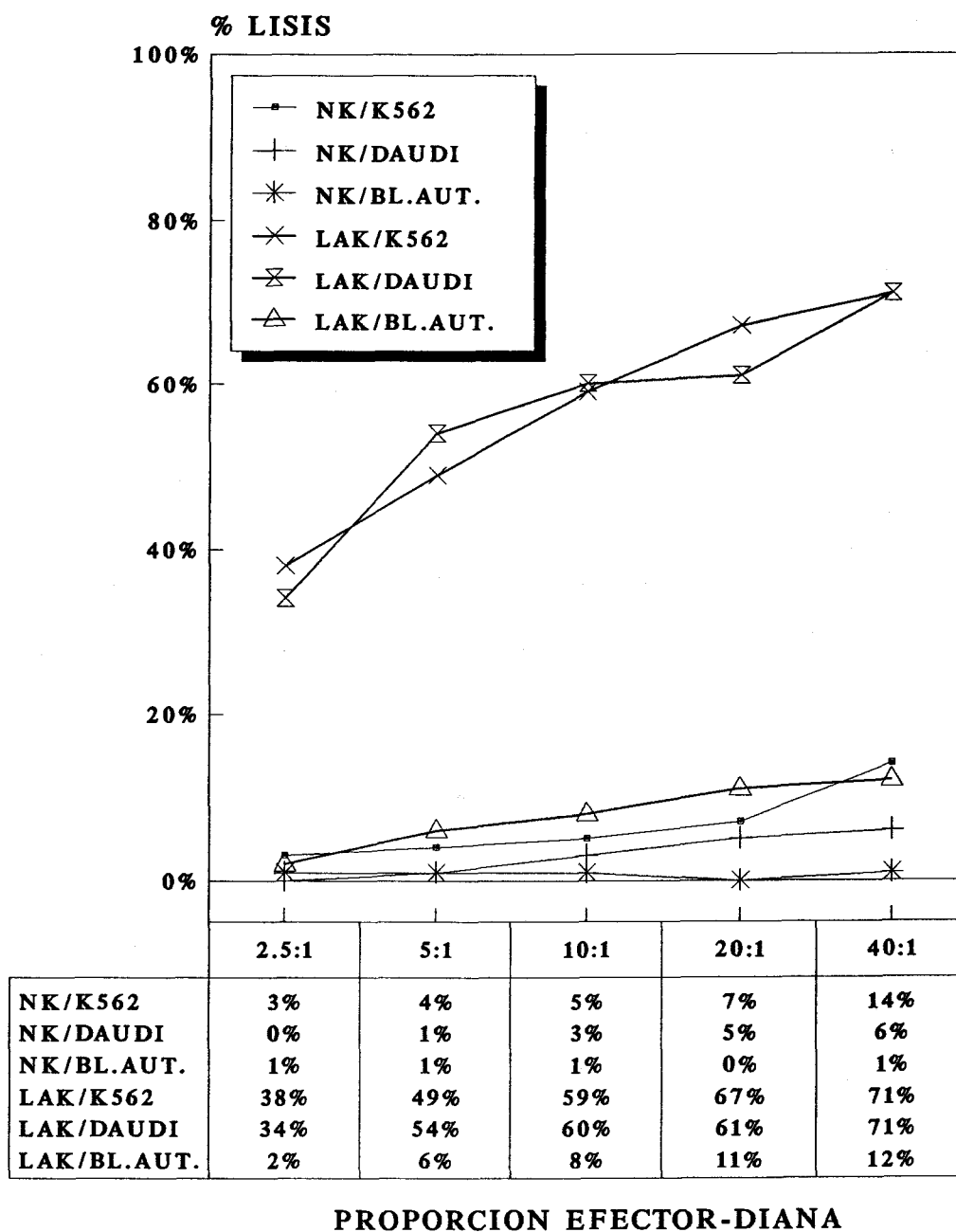


FIGURA 16 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LLA en remisión completa.

ENFERMO N°5 : LLA ACTIVIDAD CITOLITICA

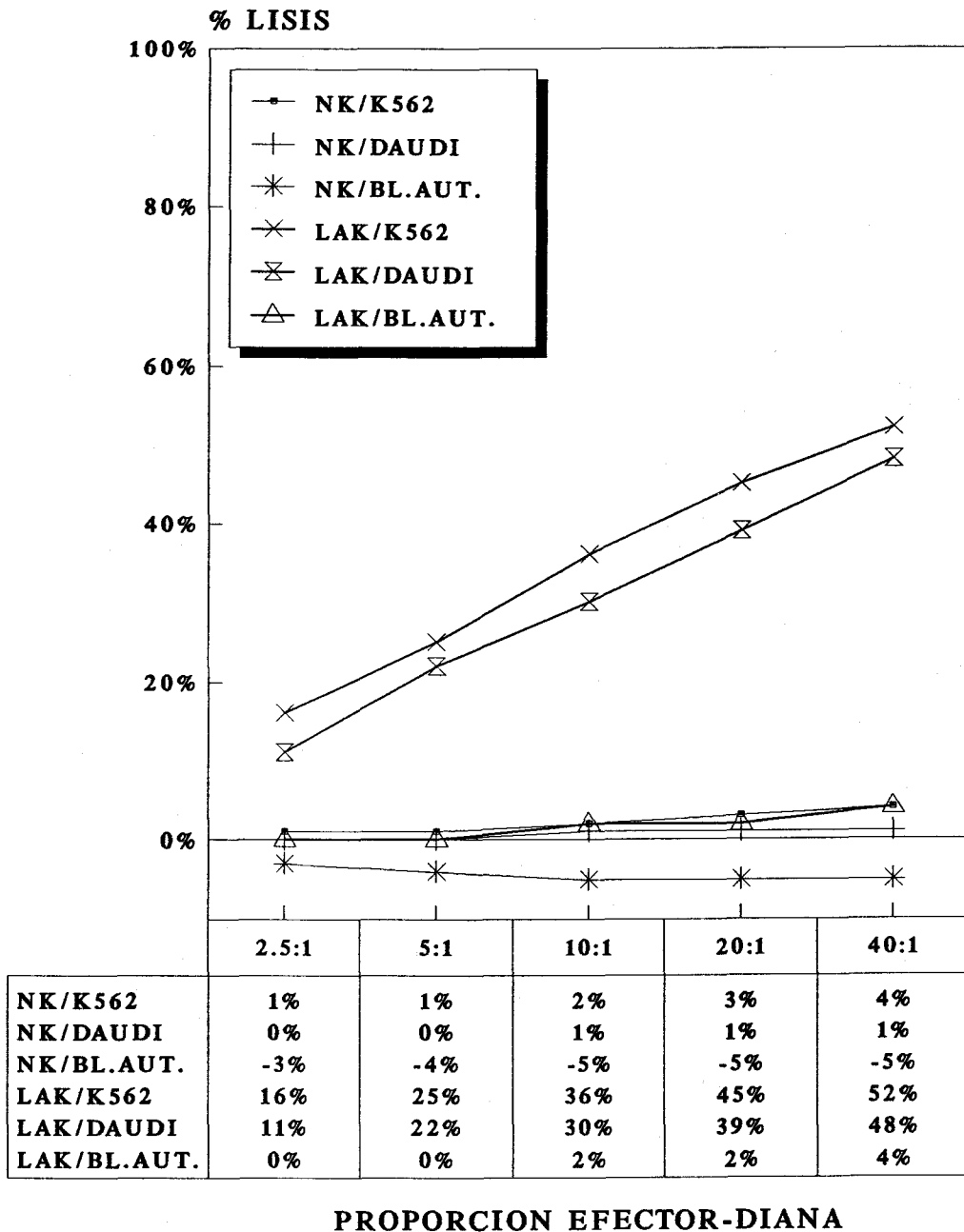


FIGURA 17 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LLA en remisión completa.

ENFERMO N°6 : LMA ACTIVIDAD CITOLITICA

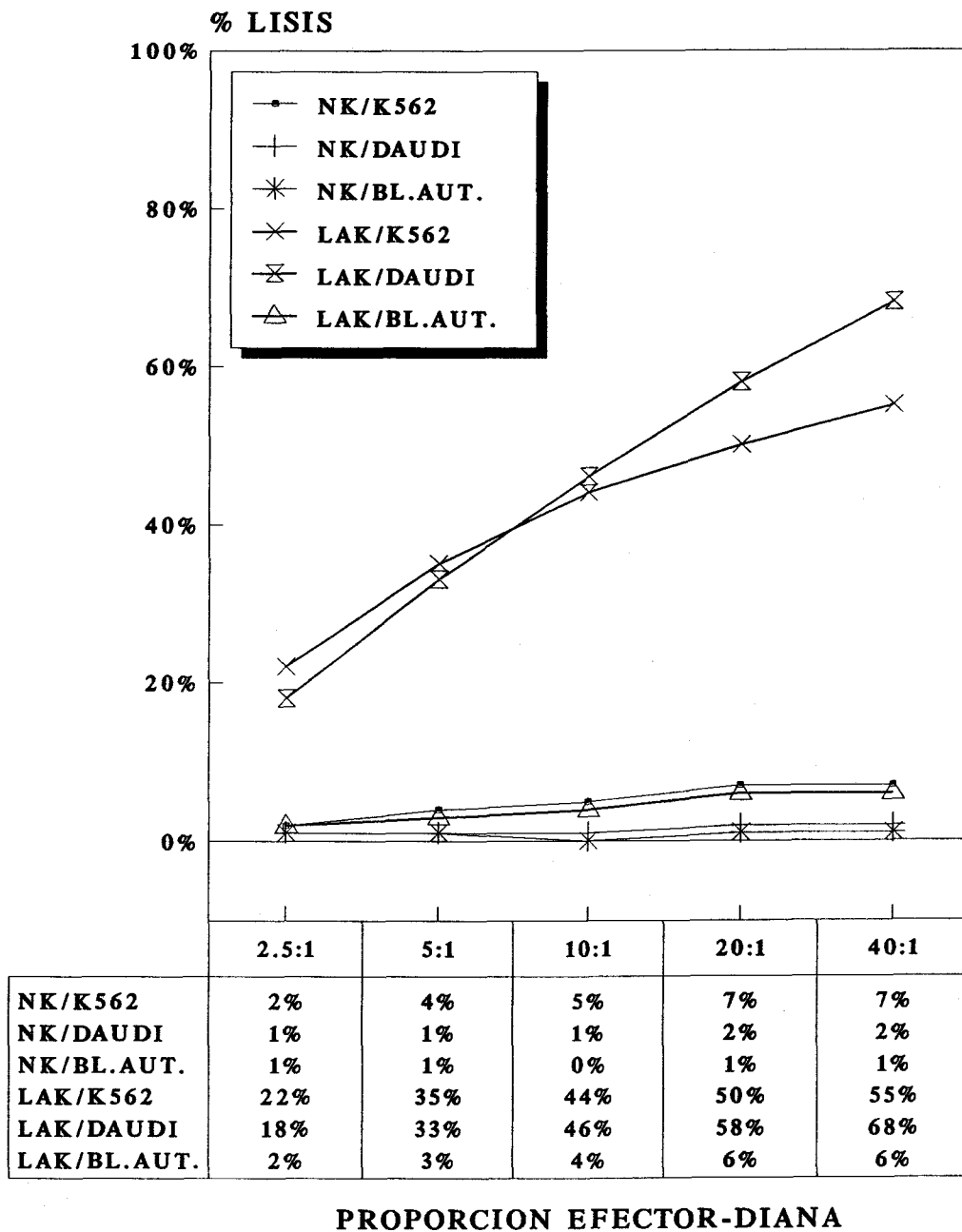


FIGURA 18 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LMA en remisión completa.

ENFERMO N°7 : LMA ACTIVIDAD CITOLITICA

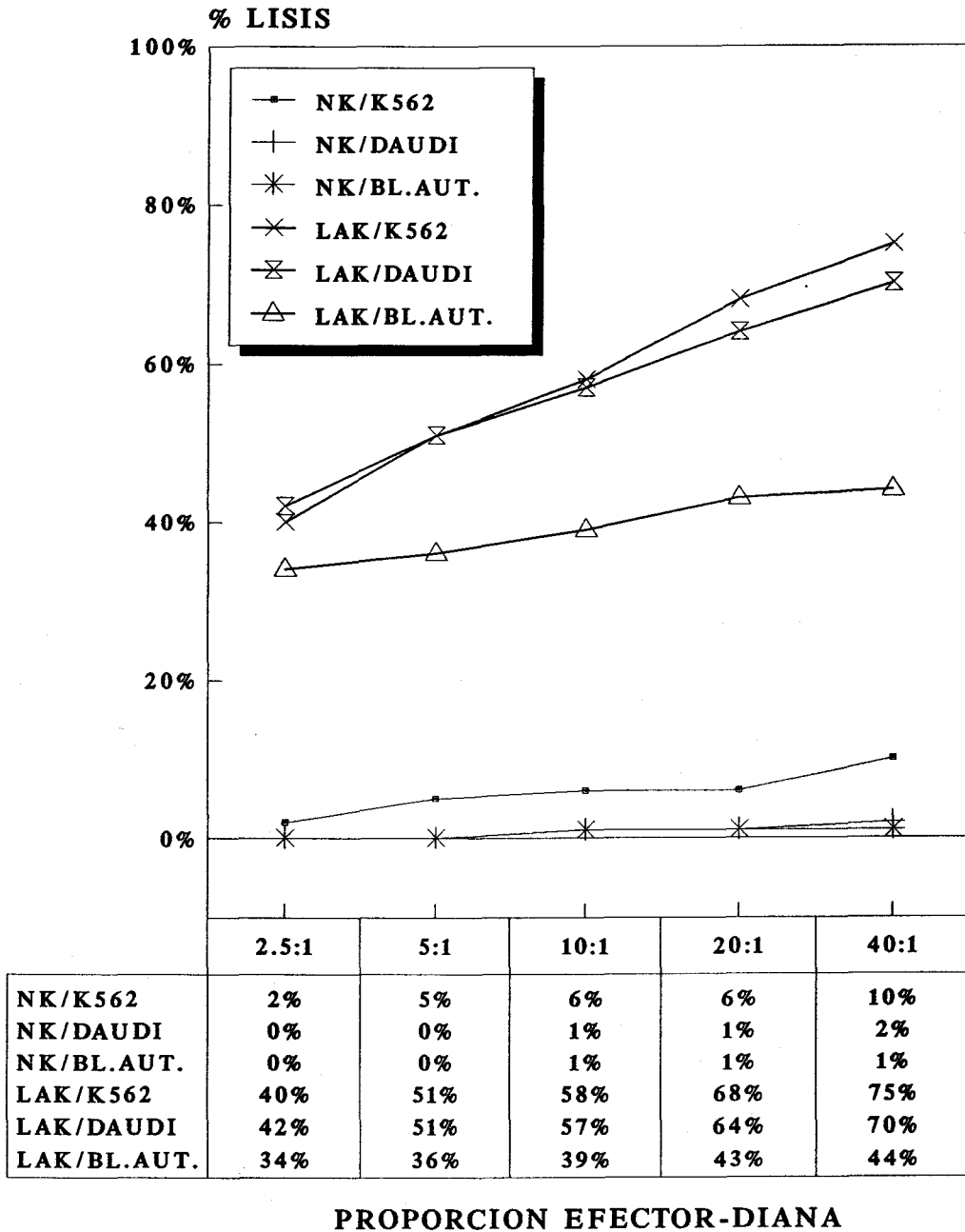


FIGURA 19 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LMA en remisión completa.

ENFERMO N°8 : LMA ACTIVIDAD CITOLITICA

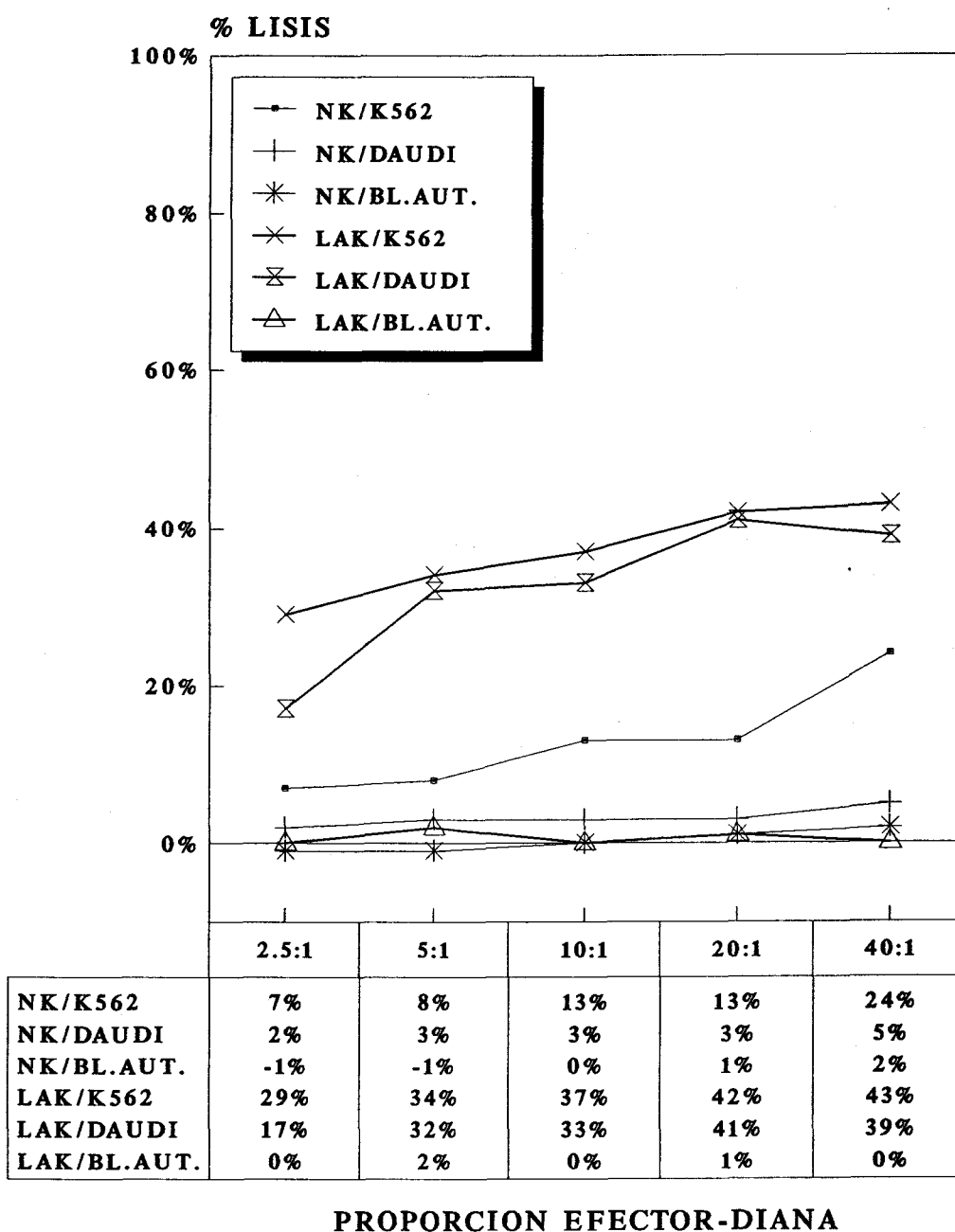


FIGURA 20 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LMA en remisión completa.

ENFERMO N°9 : LMA ACTIVIDAD CITOLITICA

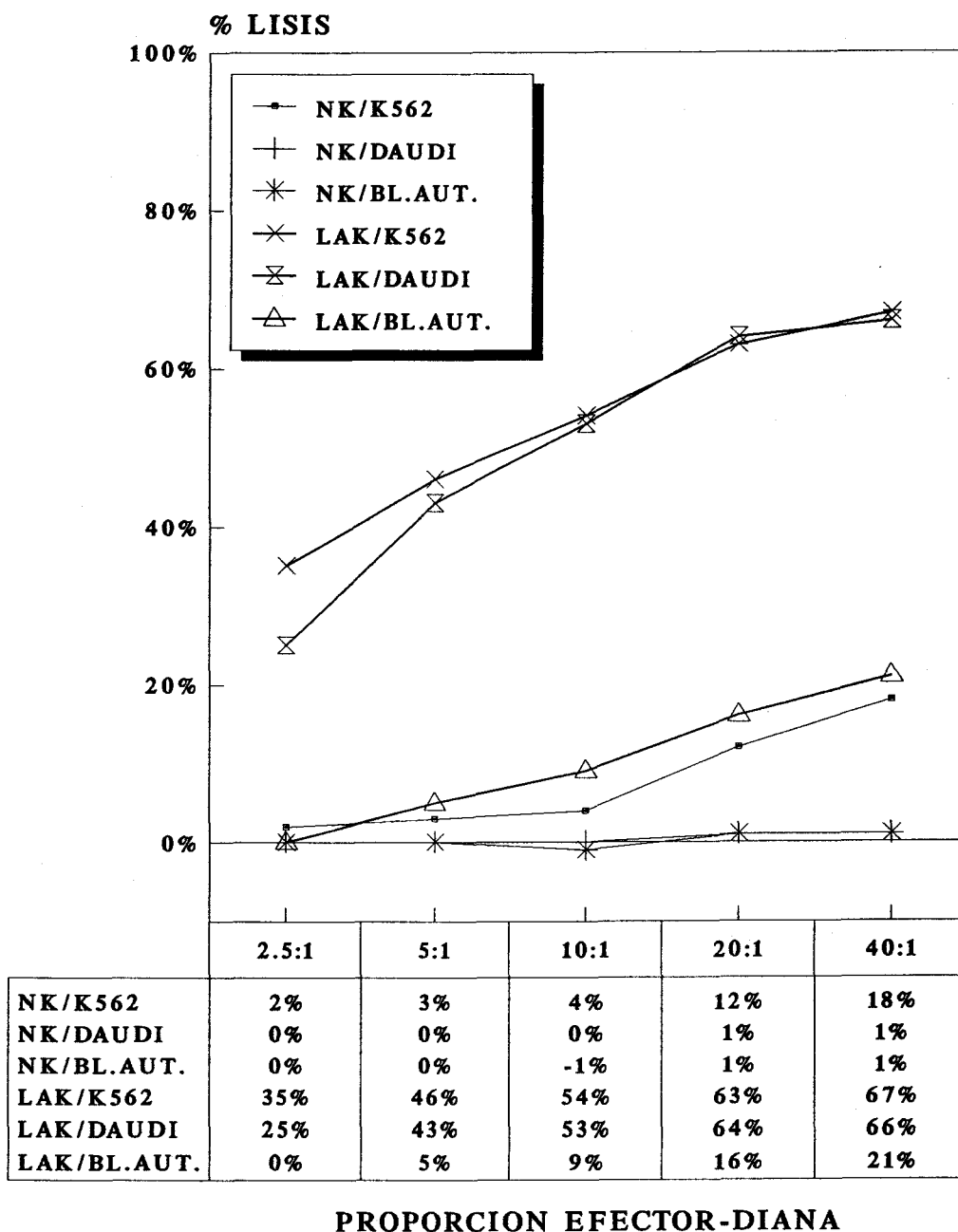


FIGURA 21 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LMA en remisión completa.

ENFERMO N°10 : LMA ACTIVIDAD CITOLITICA

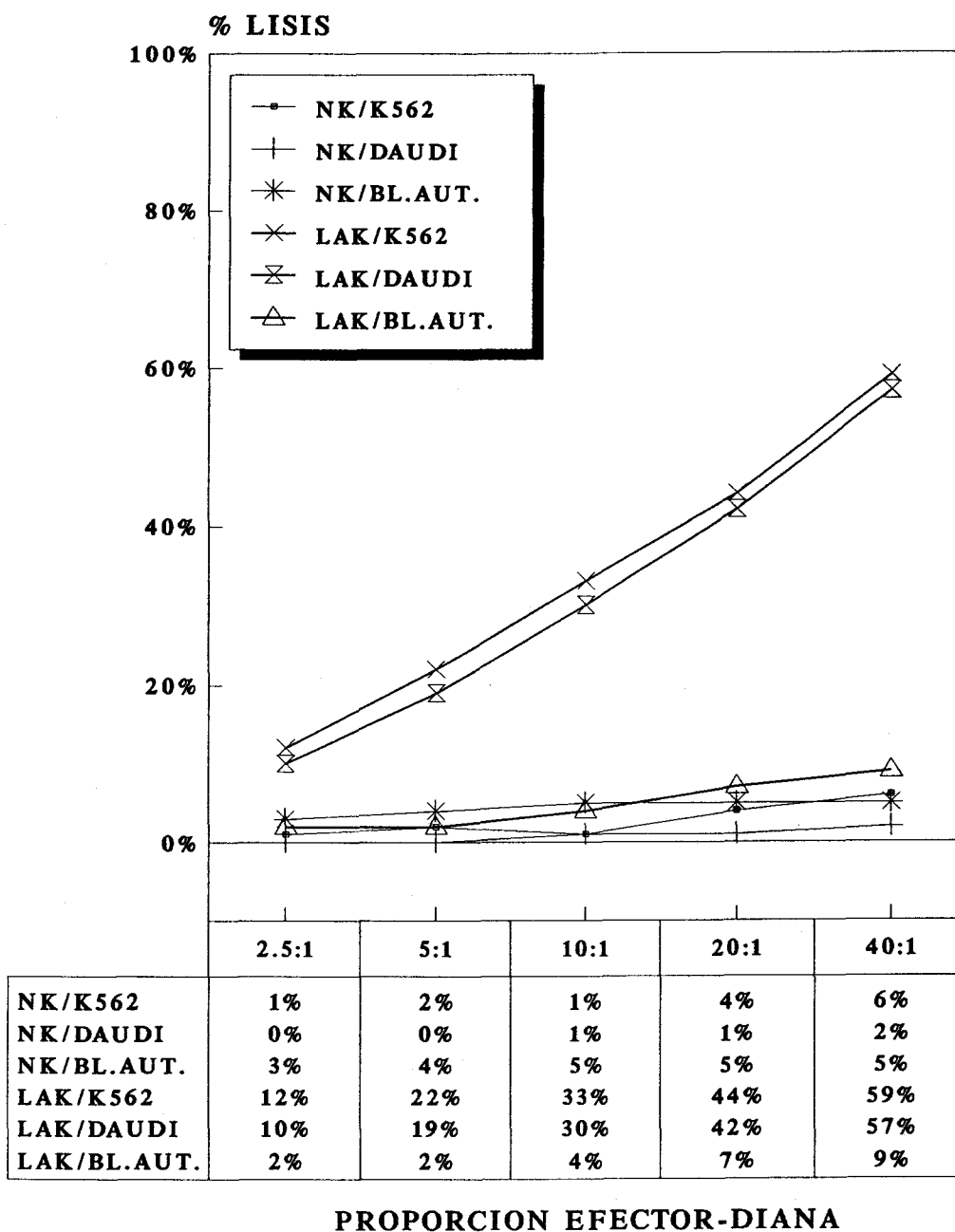


FIGURA 22 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermo con LMA en remisión completa.

IV-2.2.2.2) Actividad citolítica media de enfermos frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos autólogos.

La actividades citolíticas medias y las desviaciones estándar de células NK y LAK de 10 enfermos frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos se exponen respectivamente en las figuras 23 a 25.

La comparación estadística de actividades NK y LAK a todas las proporciones E:D aparecen en las correspondientes figuras.

ENFERMOS ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A K562

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	2.8	3.6	4.5	7.0	10.3
DE	2.4	2.5	4.4	4.8	7.9
ACTIVIDAD LAK	27.4	37.4	45.3	52.3	58.5
DE	8.5	9.3	10.1	10.3	10.6

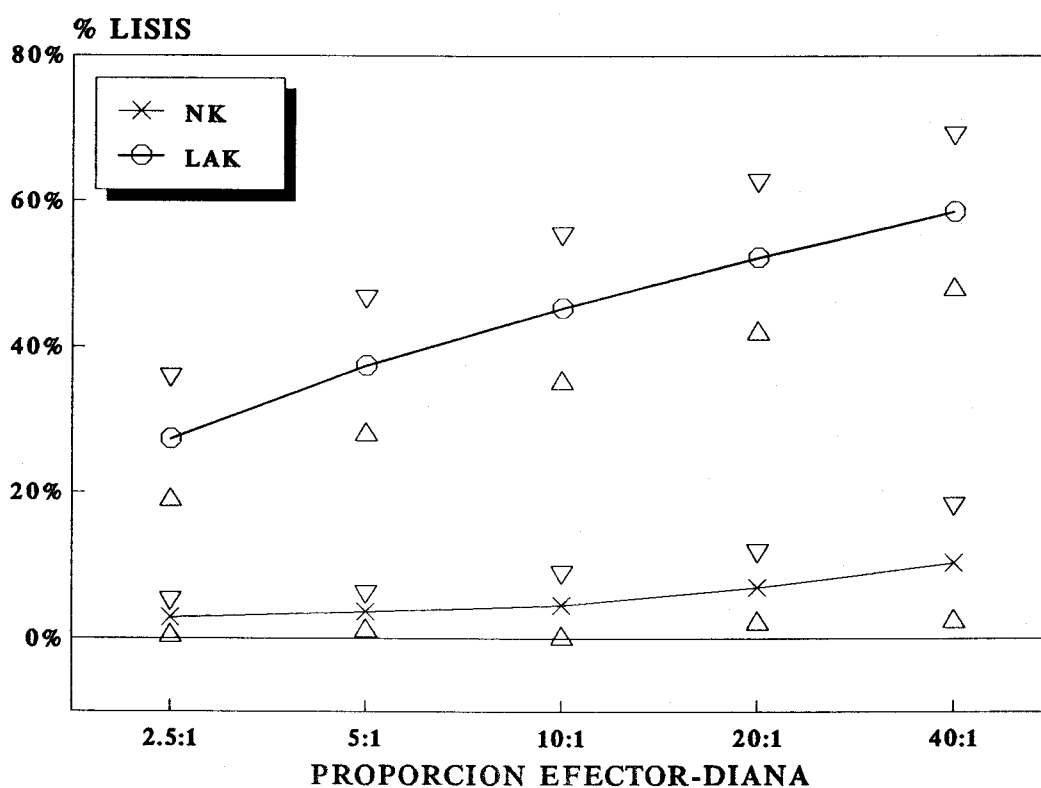


FIGURA 23 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermos frente a células K562. Actividades medias (n=10) y DE.

* SD, $p < 0.05$

ENFERMOS ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A DAUDI

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	0.6	0.8	1.4	2.0	2.7
DE	0.8	1.0	1.1	1.5	1.9
ACTIVIDAD LAK	22.1	35.3	44.7	51.0	57.0
DE	9.6	11.5	12.9	10.9	12.1

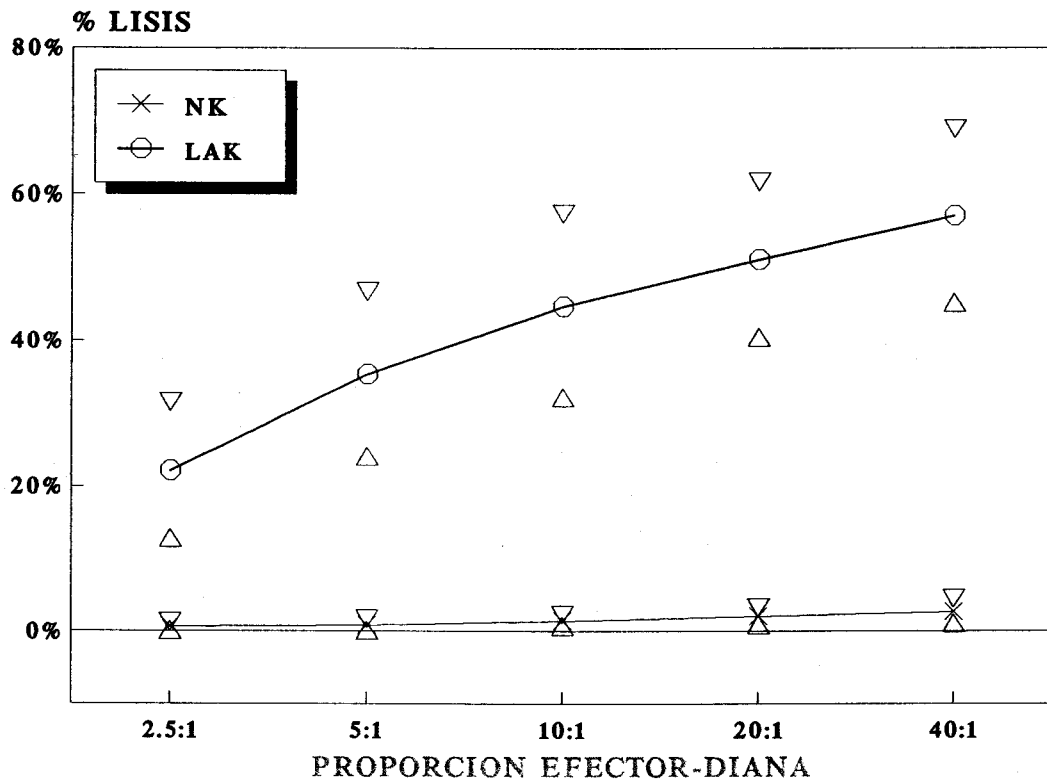


FIGURA 24 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermos frente a células Daudi. Actividades medias (n=10) y DE.

* SD, $p < 0.05$

ENFERMOS

ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A BLASTOS LEUCEMICOS

	PROPORCION EFECTOR-DIANA				
	2.5:1*	5:1*	10:1*	20:1*	40:1*
ACTIVIDAD NK	1.1	1.4	1.2	2.2	2.5
DE	2.5	3.2	3.2	4.2	3.9
ACTIVIDAD LAK	6.0	7.7	9.1	11.6	13.2
DE	10.6	10.4	11.1	10.9	12.5

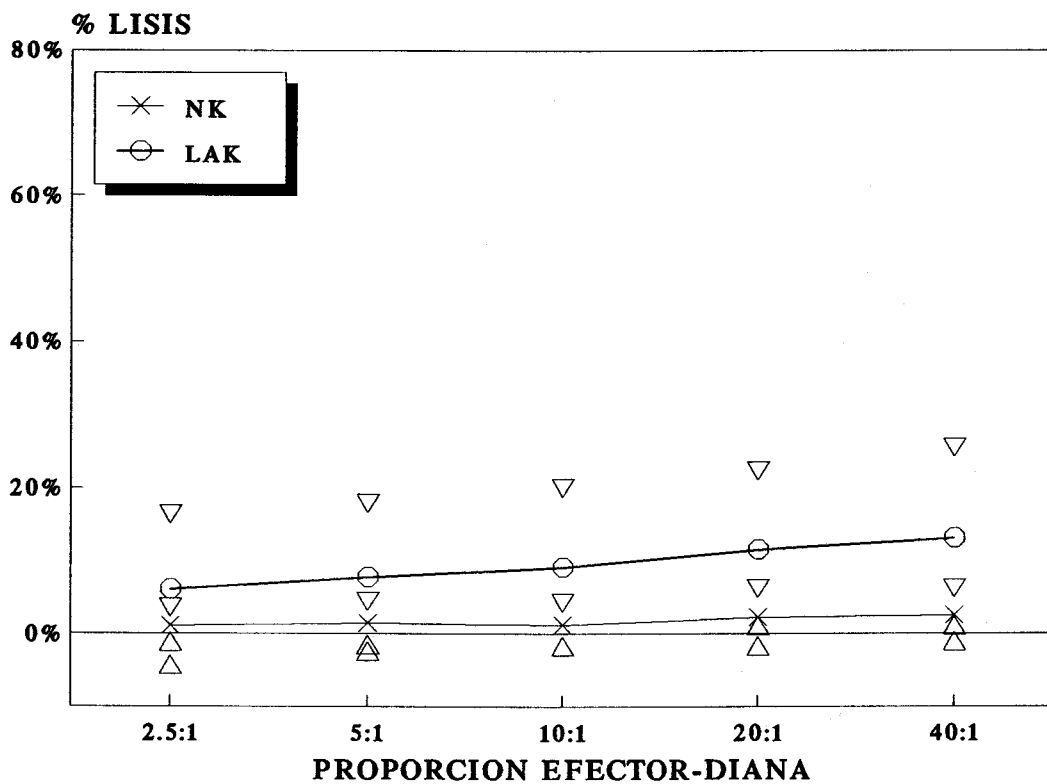


FIGURA 25 : Actividades citolíticas NK y LAK de enfermos frente a blastos leucémicos. Actividades medias (n=10) y DE.

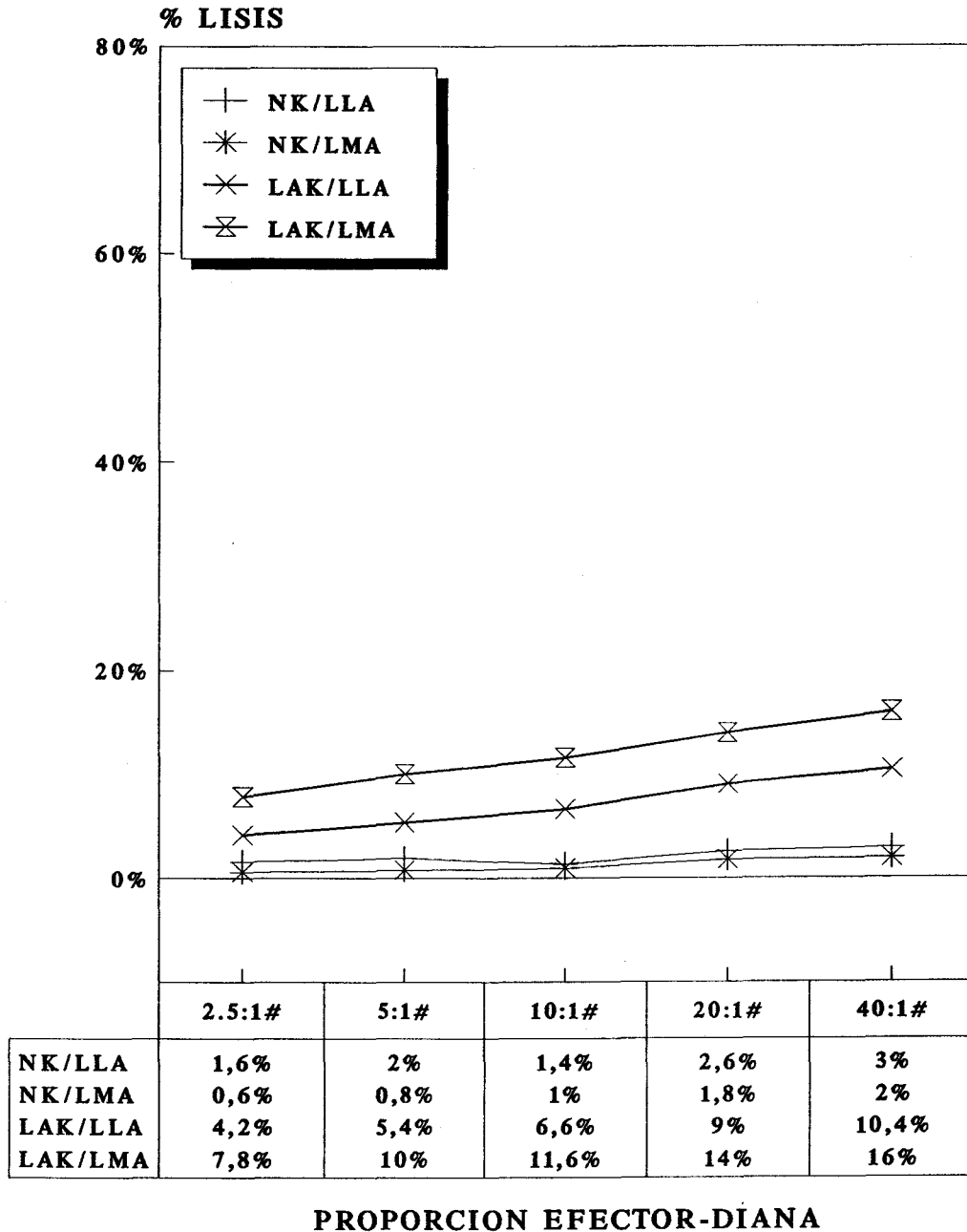
* SD, $p < 0.05$

**IV-2.2.2.3) Actividad citolítica de enfermos frente a
blastos leucémicos autólogos tipo LLA y LMA.**

Las actividades citolíticas medias de células NK y LAK de enfermos frente a blastos autólogos tipo LLA (n=5) y LMA (n=5) se exponen en la figura 26.

La comparación estadística de actividades frente a blastos tipo LLA y LMA se expone en dicha figura.

ENFERMOS ACTIVIDAD CITOLITICA FRENTE A BLASTOS LLA/LMA



**FIGURA 26 : Actividades citolíticas medias NK y LAK de enfermos frente a blastos tipo LLA (n=5) y LMA (n=5).
NSD, $p > 0.05$**

**IV-2.2.3) COMPARACION DE LAS ACTIVIDADES CITOLITICAS DE
ENFERMOS Y DONANTES SANOS.**

**IV-2.2.3.1) Actividades citolíticas NK de enfermos y
donantes sanos.**

Las actividades citolíticas medias de células NK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos se representan en las figuras 27 a 29 respectivamente.

La comparación estadística de las actividades de enfermos y donantes sanos se exponen en las respectivas figuras.

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD NK FRENTE A K562

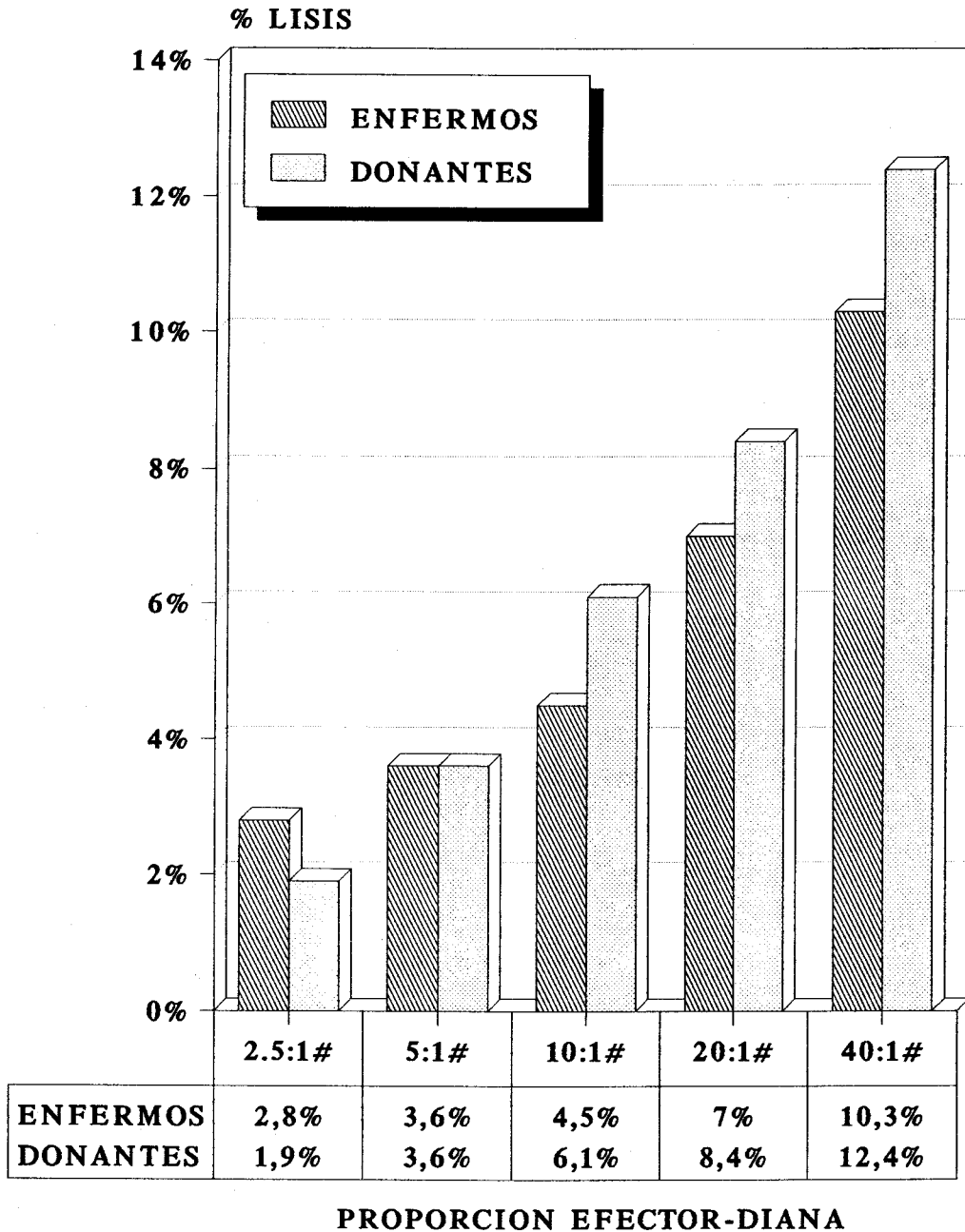


FIGURA 27 : Actividades citolíticas medias NK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células K562.

NSD, $p > 0.05$

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD NK FRENTE A DAUDI

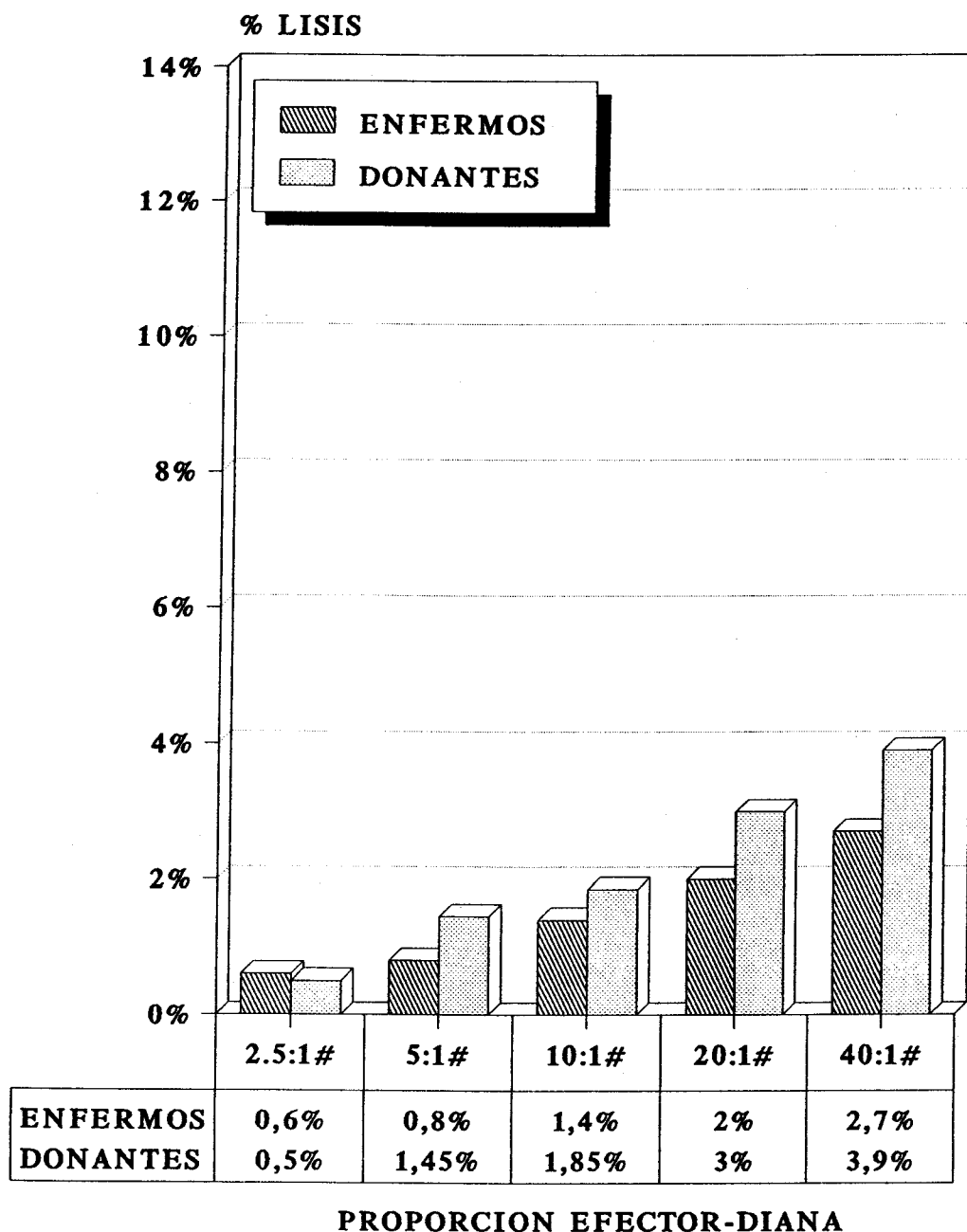


FIGURA 28 : Actividades citolíticas medias NK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células Daudi.
NSD, $p > 0.05$

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD NK FRENTE A BLASTOS LEUCEMICOS

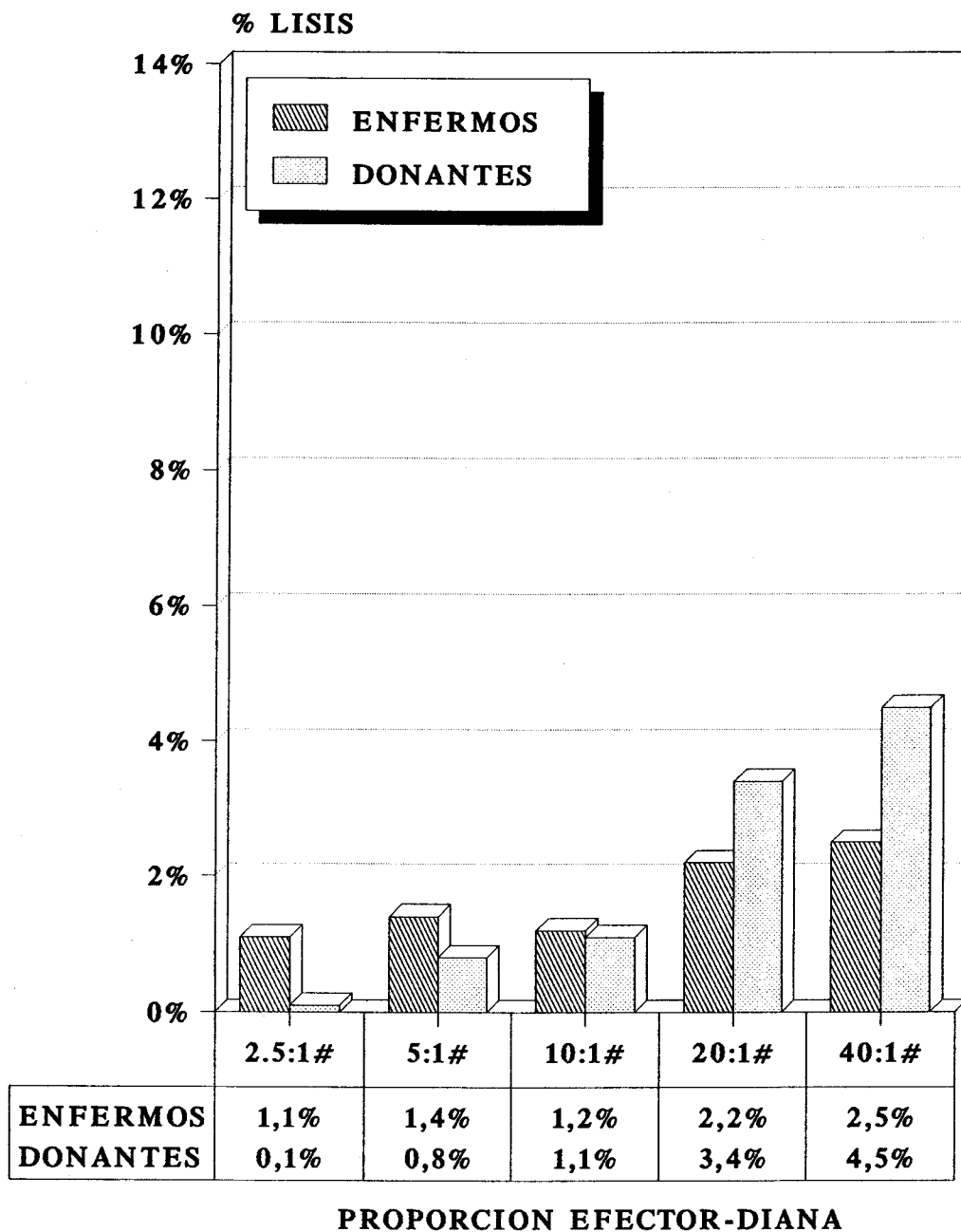


FIGURA 29 : Actividades citolíticas medias NK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a blastos leucémicos.

NSD, $p > 0.05$

IV-2.2.3.2) Actividades citolíticas LAK de enfermos y donantes sanos.

Las actividades citolíticas medias de células LAK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células K-562, Daudi, y blastos leucémicos se representan en las figuras 30 a 32 respectivamente.

La comparación estadística de las actividades de enfermos y donantes sanos se expone en las respectivas figuras.

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD LAK FRENTE A K562

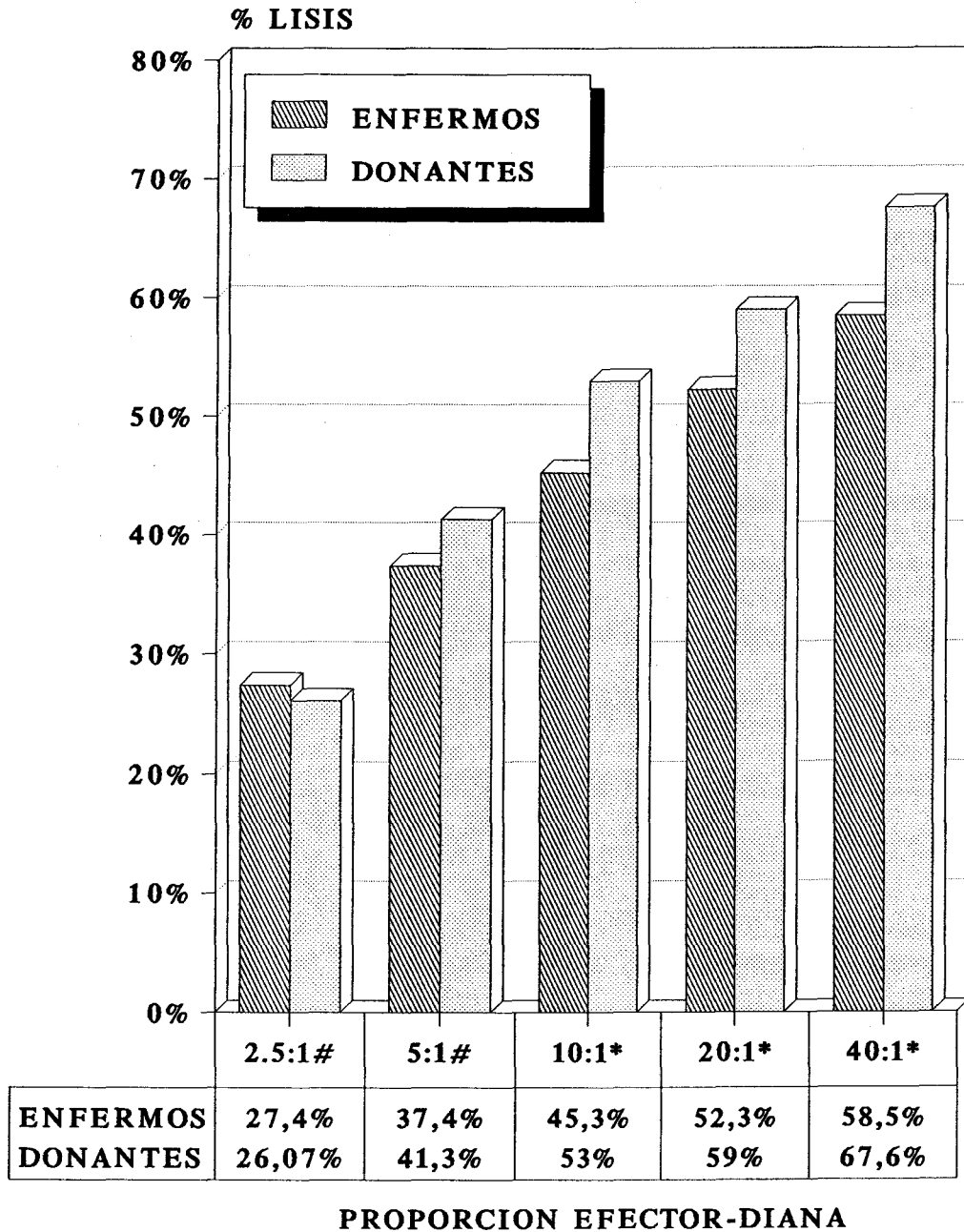


FIGURA 30 : Actividades citolíticas medias LAK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células K562.
 # NSD, $p > 0.05$
 * SD, $p < 0.05$

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD LAK FRENTE A DAUDI

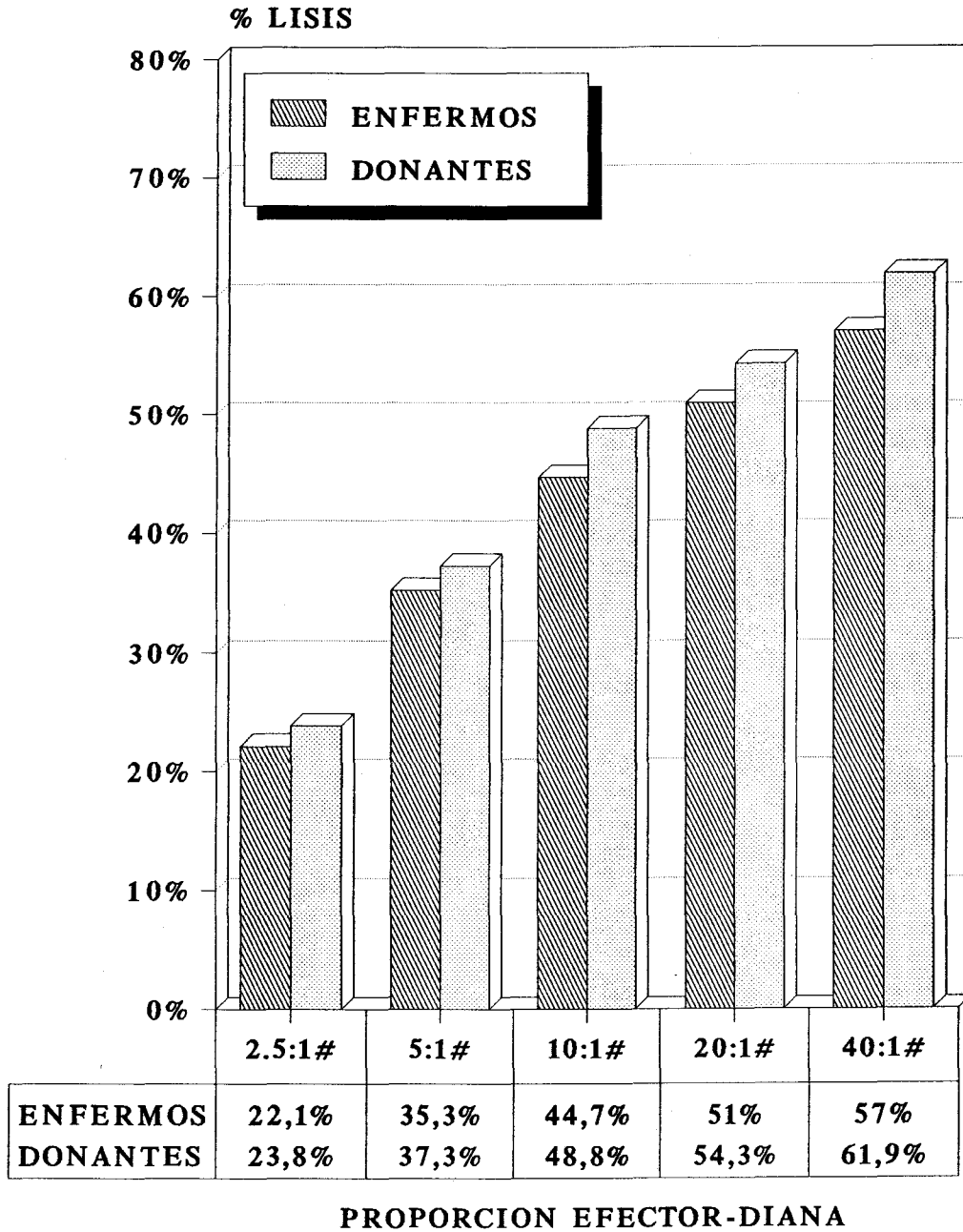


FIGURA 31 : Actividades citolíticas medias LAK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a células Daudi.

NSD, $p > 0.05$

ENFERMOS Y DONANTES SANOS ACTIVIDAD LAK FRENTE A BLASTOS LEUCEMICOS

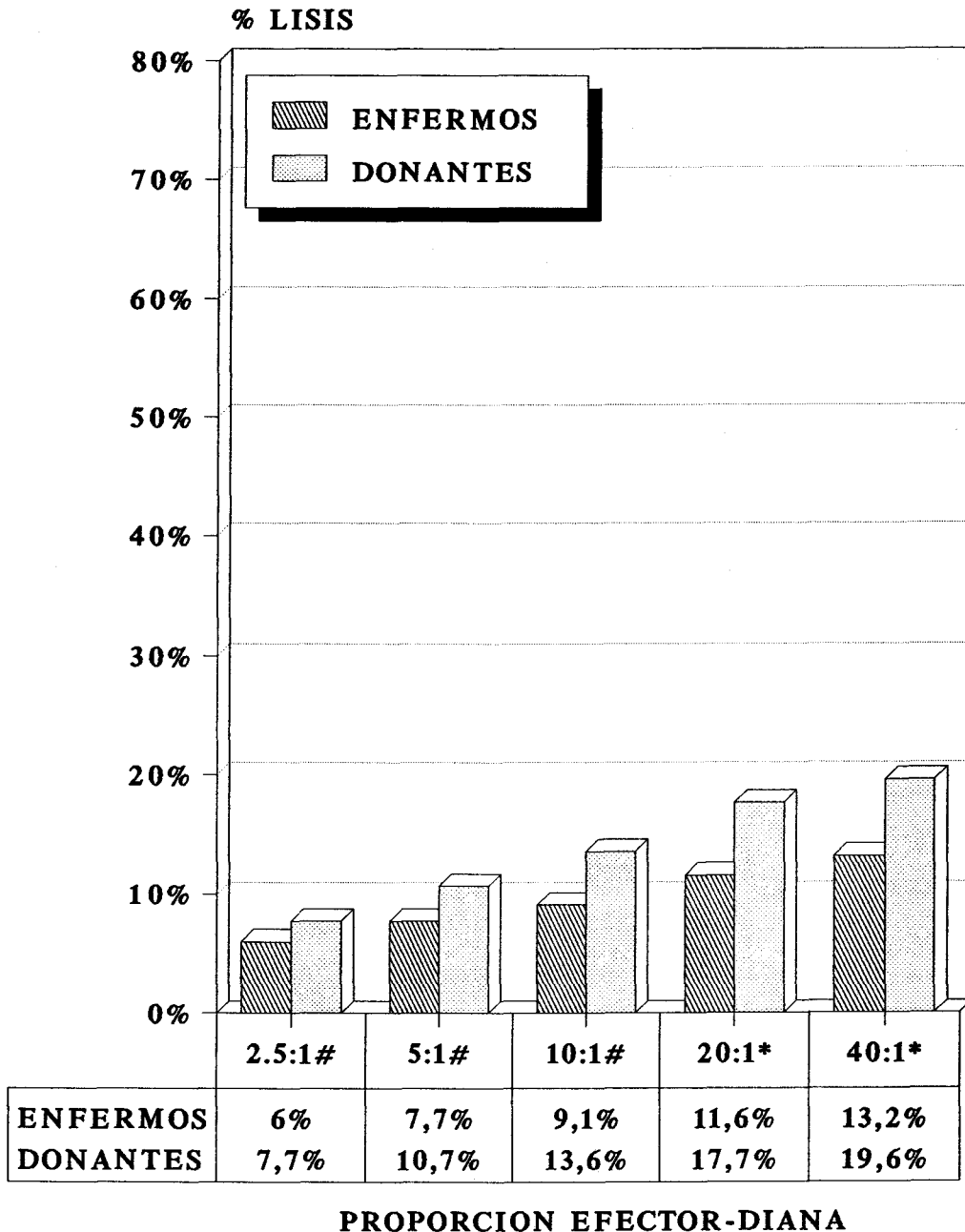


FIGURA 32 : Actividades citolíticas medias LAK de enfermos (n=10) y donantes sanos (n=20) frente a blastos leucémicos.

NSD, $p > 0.05$

* SD, $p < 0.05$

IV-2.2.4) SENSIBILIDAD DE LOS BLASTOS LEUCEMICOS A LAS CELULAS LAK AUTOLOGAS Y ALOGENICAS.

En la tabla V se expone la sensibilidad mostrada por los blastos leucémicos frente a células LAK autólogas (enfermos) y alogénicas (donantes sanos) a las proporciones E:D de 20:1 y 40:1.

Se considera que existe una activación positiva cuando la actividad LAK presenta un porcentaje de lisis mayor que el límite de confianza superior de la media de actividad NK a la misma proporción E:D, definido por la expresión:

$$\text{" actividad media NK + txDE "}$$

siendo DE la desviación estándar y "t" el valor de la t-Student (para n-1 grados de libertad y $p < 0.05$).

**ENFERMOS Y DONANTES SANOS
SENSIBILIDAD DE BLASTOS LEUCEMICOS A CELULAS LAK**

	20:1	40:1
DONANTES SANOS		
MEDIA NK+tDE	14.1%	16.2%
Nº CASOS POSITIVOS	8	8
SENSIBILIDAD	40%	40%
ENFERMOS		
MEDIA NK+tDE	11.7%	11.3%
Nº CASOS POSITIVOS	3	5
SENSIBILIDAD	30%	50%

TABLA V : Sensibilidad de los blastos leucemicos a las células LAK autólogas (enfermos) y alogénicas (donantes sanos) a las proporciones E:D de 20: 1 y 40:1. Se considera test de lisis positivo el que supera la actividad media NK+tDE.

V. DISCUSSION

La justificación del presente trabajo está fundamentada en la problemática actual del enfermo con leucemia aguda. Un porcentaje elevado de enfermos con leucemia aguda fallecen en recaída tras una remisión completa; ni el trasplante alogénico (por los escasos enfermos que pueden recibirlo y su alta morbilidad) ni el autólogo (aun complejo y con elevado porcentaje de recaídas) han ofrecido una salida definitiva a estos enfermos. El tratamiento con células LAK ofrece a estos enfermos con previsible alto riesgo de recaída una nueva posibilidad terapéutica menos agresiva, y cuya efectividad dependerá en gran parte de la estrategia montada en su atención.

Se ha probado que las células NK de individuos con leucemia aguda tienen una actividad funcional disminuida, y que pueden generarse a partir de ellas células LAK con actividad citolítica "in vitro" potenciada frente a células diana NK-sensibles y NK-resistentes, incluyendo los blastos leucémicos autólogos (143).

La eficacia biológica de las células LAK e IL-2 ha sido probada en unos trabajos iniciales realizados en enfermos con tumores diseminados, en especial melanomas, carcinomas renales y linfomas, donde la terapia habitual había resultado poco esperanzadora (112, 114).

Dado que la terapia en oncología es más efectiva cuando la masa tumoral es menor, es más indicado utilizar la terapia con células LAK e IL-2 en enfermos en remisión completa, pero con evidencia de enfermedad residual. Estos enfermos tienen una alta probabilidad de padecer una nueva recaída, sin poseer de momento una alternativa terapéutica satisfactoria.

Diversas etapas del proceso terapéutico están todavía en fase de desarrollo o investigación, tales como la recolección masiva de células mononucleares, eficacia citolítica frente a blastos leucémicos, activación con diversas citoquinas, etc.

V-1) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES EN EL
SEPARADOR CELULAR.

La primera parte del trabajo se ha centrado en la búsqueda de un proceso de obtención de células LAK lo más simplificado y automatizable posible, conscientes de que ello es un avance importante para instaurar el tratamiento en nuestro medio hospitalario.

Una vez comprobada la activación, no solo de linfocitos, sino también de monocitos (71) por la IL-2, nuestro objetivo es desarrollar un proceso de obtención de células mononucleares que nos permita recoger de forma simplificada la mayor cantidad de linfocitos y monocitos con la menor contaminación posible de las demás poblaciones celulares, y al mismo tiempo compatible con la dinámica de tratamiento del enfermo.

Esto es hoy día uno de los grandes problemas técnicos, aunque para ello se dispone de separadores celulares automatizados capaces de obtener un concentrado celular con una alta recuperación de células mononucleares, pero también con una estimable contaminación de hematíes y granulocitos. Ello conlleva realizar una segunda separación en gradiente de densidad con ficoll o percoll (144) para purificar las células mononucleares. Este proceso tiene el inconveniente de una mayor manipulación de células que tras cultivarse han de

infundirse al enfermo, aumentando el riesgo de contaminación microbiana, un mayor coste económico del proceso, y un tiempo de realización amplio.

Por ello queda justificado el conseguir un sistema de recolección en un separador automático que obtenga una gran cantidad de células mononucleares sin que la contaminación por hematíes o granulocitos sea muy importante. Así se conseguiría evitar un segundo proceso de separación largo y complejo por el gran volumen de células a manipular.

Con éste fin se utiliza un sistema de obtención de células basado en un separador celular automatizado por su mejor rendimiento que las técnicas manuales (144) . El método automático permite disminuir el riesgo potencial de contaminación microbiana al trabajar en un circuito cerrado, disminuye necesidades instrumentales tales como campanas de flujo laminar o centrífugas convencionales, y realiza el proceso en un tiempo inferior.

Generalmente para la obtención masiva de células mononucleares suelen emplearse separadores de flujo continuo tales como el separador CS-3000 (Baxter), o el IBM-2997 (Cobe Laboratories, Lakewood, CO); o bien separadores de flujo discontinuo como Haemonetics modelo 30 (Haemonetics Corporation, Braintree, Massachusetts) o Aminco Celltrifuge (American Instrument Company, Silver Spring). Los separadores

de flujo continuo presentan la ventaja sobre los otros de un manejo más automatizado, así como requieren un volumen extracorpóreo menor, lo que evita episodios de hipotensión.

Uno de los separadores más empleados en la recolección de células mononucleares de enfermos es el separador CS-3000. Actualmente el proceso de separación de células mononucleares se ha conseguido automatizar en gran medida realizándolo todo en dicho separador (133), incluyendo la segunda separación con ficoll.

V.1.1) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE BOLSAS DE DONANTES.

Para realizar un estudio del proceso de separación utilizamos como materia prima bolsas de donantes sanos, por ser este un material asequible en nuestro medio y suficiente para evaluar en pequeña escala el comportamiento del separador. Inicialmente se realiza el estudio de un programa de separación suministrado por el fabricante para la obtención de células mononucleares.

Para evaluar el grado de recolección del separador en las bolsas de donantes no empleamos la expresión matemática que utilizamos en enfermos, dada la imposibilidad de estimar el número de células procesadas en el separador, puesto que la concentración de células a la entrada del separador

disminuye en gran medida conforme avanza el proceso de separación. Considerando que todos los procesos los realizamos en las mismas condiciones, al ser el volumen de las bolsas poco variable y al procesar siempre 2000 ml de sangre en el separador, nos parece más exacto y suficiente hacer la evaluación en base al porcentaje de células recuperadas respecto a las que había inicialmente en la bolsa de donante.

En cuanto a los resultados obtenidos con este primer programa, los porcentajes de recuperación de células mononucleares son bajos (46.2%), siendo muy baja la recuperación de monocitos (25.7%) y mejor la de linfocitos (50.1%). No obstante es favorable el bajo grado de recuperación de los demás componentes celulares, fundamentalmente hematíes (0.9%) y granulocitos (1.2%). El hematocrito final es muy bajo (0.9%). Las plaquetas son recuperadas en un porcentaje importante (26.3%), aunque pueden eliminarse en posteriores centrifugaciones a baja velocidad en la misma centrífuga del separador, sin necesidad de manipulación externa.

Si observamos los resultados obtenidos de la fórmula leucocitaria, vemos como en el proceso de separación hemos pasado de tener una muestra inicial en la cual las células mononucleares y los granulocitos se hallan casi en la misma proporción (46.3% y 53.7% respectivamente) a un producto en

el que el 97% son células mononucleares, y solo hay un 3% de granulocitos. El producto obtenido se ha enriquecido fundamentalmente en linfocitos (90%), siendo los monocitos el 7% . De los granulocitos presentes (3%) la mayoría siguen siendo neutrófilos (2.9%).

En definitiva en el proceso de separación hemos obtenido casi la mitad de las células mononucleares iniciales reduciendo notablemente la contaminación de granulocitos, hematíes y plaquetas en la muestra.

En estas condiciones el producto obtenido sería apto para su cultivo con IL-2, sin necesidad de una segunda separación con Ficoll, pero dado el bajo rendimiento en la recuperación de células mononucleares serían necesarios numerosas aféresis para obtener una cantidad adecuada de éstas para el tratamiento.

A partir de estos resultados proponemos unas modificaciones al programa con el objetivo de aumentar el rendimiento de recolección de células mononucleares, sin que aumente de forma excesiva la contaminación de los demás componentes celulares. De una parte actuamos disminuyendo la velocidad de la centrífuga a 1400 rpm para conseguir un gradiente en la bolsa de separación con una capa más rica en células mononucleares, y de otra parte elevamos la amplitud de interfase a 150 para que el detector óptico no sea tan

selectivo en el paso de células mononucleares de la bolsa de separación a la de recolección.

Análogamente a como se procede con el grupo de bolsas anterior, evaluamos el proceso calculando el porcentaje de células recuperadas respecto a las que había inicialmente en la bolsa. El grupo de bolsas utilizado con el programa modificado presenta unos parámetros hematológicos iniciales que no son estadísticamente diferentes de los del grupo de bolsas utilizado con el programa original.

Si analizamos los resultados obtenidos con este programa modificado, respecto al programa original, observamos que la recuperación de células mononucleares es significativamente superior (77.2%), tanto de linfocitos (82.7%), como de monocitos (56.1%). La recuperación de plaquetas (27.9%) es similar. La recuperación de granulocitos (4.8%) y de hematíes (1.7%) son significativamente superiores, pero la elevación no es importante y siguen manteniéndose en unos niveles aceptables. El hematocrito final (1.7%) también es bajo.

Analizando la fórmula leucocitaria en la muestra obtenida vemos que presenta mayoritariamente células mononucleares (93.1%) y solo hay un 6.9% de granulocitos. En este caso el producto final también se halla enriquecido de linfocitos (82.1%), con un 11% de monocitos. De los

granulocitos obtenidos (6.9%) la mayoría siguen siendo neutrófilos (6.5%).

En definitiva, hemos obtenido las tres cuartas partes de las células mononucleares iniciales reduciendo notablemente la contaminación de hematíes, plaquetas, y granulocitos.

Tras los resultados obtenidos creemos que estas modificaciones son de gran interés. El programa que proponemos recupera casi el doble de células mononucleares que el original, a expensas de un ligero incremento en la contaminación de granulocitos que no creemos vaya a alterar el paso siguiente del proceso (cultivo), evitando así el tener que realizar una segunda purificación de las células mononucleares con ficoll. La proporción "hematíes/células mononucleares" obtenida con ambos programas se mantiene en los mismos niveles. Además, la mayor recolección de células mononucleares nos permitirá reducir prácticamente a la mitad el número de aféresis necesarias para obtener una cantidad suficiente de células mononucleares para el tratamiento, con la consiguiente disminución de costes económicos, tiempo, y problemas para el enfermo.

V.1.2) OBTENCION DE CELULAS MONONUCLEARES DE ENFERMOS LEUCEMICOS.

Una vez obtenida una mejora en el programa de separación, nuestro objetivo es evaluar los resultados de este programa modificado en enfermos leucémicos. Por ello se plantea el estudio en un grupo de enfermos leucémicos incluidos en el programa de autotrasplante medular y a los que se necesita realizar una extracción masiva de células mononucleares, que tras congelar y almacenar en nitrógeno líquido han de reinfundirse posteriormente al enfermo. Los enfermos se hallan en fase de remisión completa tras quimioterapia, y no se realiza ninguna manipulación previa a la aféresis para aumentar el número de células mononucleares en sangre periférica.

Para evaluar el rendimiento del separador en la recolección de células mononucleares de enfermos, mejor que calcular el porcentaje de recuperación celular respecto a las células iniciales en el enfermo, preferimos determinar el porcentaje de recuperación respecto al número total de células procesadas. Así se obtiene un parámetro denominado eficiencia de recolección, mucho más objetivo de la efectividad del separador ya que cada enfermo posee una volemia diferente y se le procesan volúmenes de sangre diferentes en el separador. En este caso el número total de células procesadas lo podemos determinar como el número de

células iniciales/ml multiplicado por el volumen de sangre procesada en el separador. Consideramos que esta aproximación es válida debido a que el nivel de células en sangre periférica prácticamente no varía durante la extracción (145).

Los resultados obtenidos con enfermos indican una alta eficiencia de recolección de células mononucleares (59.4%), tanto de linfocitos (62.4%) como de monocitos (52.3%). La eficiencia de recolección de granulocitos (7.5%) y sobre todo de hematíes (0.4%) es baja, siendo la de plaquetas de un 27.5% ; pero éstas son fácilmente eliminables por centrifugación en el mismo separador, como ya se ha apuntado anteriormente.

La fórmula leucocitaria final esta compuesta mayoritariamente por células mononucleares (92.7%), de los cuales el 72.1% son linfocitos y el 20.6% monocitos. La proporción de granulocitos (7.3%) en la muestra final es baja, siendo fundamentalmente neutrófilos (7.1%). El hematocrito final (3.3%) es bajo.

En definitiva, obtenemos una alta eficacia de recolección de células mononucleares con una baja contaminación de hematíes, plaquetas y granulocitos.

Así obtenemos en cada aféresis una cantidad media de 5.03×10^9 células mononucleares (3.86×10^9 linfocitos y 1.17×10^9 monocitos) en condiciones óptimas para el cultivo con IL-2 sin necesidad de realizar separaciones adicionales.

En la bibliografía hay una gran variedad de resultados obtenidos con diferentes programas en el separador celular CS-3000. Muul y cols. (133) obtienen inicialmente un concentrado celular con una eficiencia de recolección superior ($71.5 \pm 4.4\%$, $n=11$), pero tras realizar un segundo proceso de separación con ficoll ésta se reduce a un $54.6 \pm 4.3\%$ ($n=9$) en un proceso automático en el separador CS-3000, o a un $62.3 \pm 4\%$ ($n=9$) en un proceso manual, similares a los que obtenemos en un solo proceso.

En el mismo separador, Carter y cols. (146), ensayan dos programas diferentes. Con uno obtienen similares cantidades de leucocitos (6.92×10^9), mayor cantidad de plaquetas (4.47×10^{11}), y sobre todo de hematíes (30.47×10^{10}), con un 94% de células mononucleares en el producto final. Con el otro programa obtienen resultados similares a los nuestros en cuanto a leucocitos (7.60×10^9) y hematíes (8.19×10^{10}), con una mayor cantidad de plaquetas (4.26×10^{11}), presentando el concentrado final un 98% de células mononucleares. Sin embargo, aunque la cantidad de células obtenida es similar a la obtenida en nuestro trabajo, incluso

con un porcentaje de células mononucleares en la muestra final algo superior al nuestro, la eficiencia de recolección del proceso es inferior, ya que las aféresis se realizan a 20 donantes sanos voluntarios que poseen una cifra inicial de células mononucleares en sangre periférica de 2 a 3 veces superior a los enfermos empleados en nuestro ensayo.

En el mismo separador, De la Rubia y cols. (147) obtienen a partir de enfermos leucémicos una eficiencia de recolección de células mononucleares similar (56.4% , n=91). No obstante, la muestra obtenida posee un menor porcentaje de células mononucleares (81.8%) y una mayor contaminación de granulocitos (17.1%).

Blanchette y cols. (148) en el mismo separador y procesando un volumen sanguíneo similar (7 litros), obtienen a partir de donantes sanos una cantidad de células mononucleares algo superior (7.6×10^9 , n=5), pero con el doble de hematocrito final ($9.2 \pm 1.1\%$) y cinco veces más de plaquetas ($6.5 \pm 2.4 \times 10^{11}$) que las obtenidas en nuestro trabajo.

Con otros separadores los resultados son diversos. Así en el separador celular IBM-2997, Muul y cols. (133) obtienen una eficiencia de recolección de células mononucleares superior ($80.2 \pm 6.4\%$, n=11), pero tras reducir la

contaminación mediante una segunda purificación con ficoll obtienen una eficiencia de recolección inferior, entre el 54% y el 62% .

Con el separador IBM-2997, Carter y cols. (146), obtienen resultados similares a los nuestros en cuanto al número de leucocitos (7.14×10^9) y plaquetas (2.94×10^{11}), siendo la cifra de hematíes inferior (5.89×10^{10}). Sin embargo, como también apuntamos anteriormente, estos resultados se obtienen a partir de 20 donantes sanos, que poseen una mayor cantidad de células mononucleares en sangre periférica, con lo cual la eficiencia de recolección es inferior.

Con este mismo separador, IBM-2997, Blanchette y cols. (148) a partir de donantes sanos obtienen una mayor cantidad de linfocitos ($9.8 \pm 1.1 \times 10^9$, $n=5$) y monocitos ($1.4 \pm 1.6 \times 10^9$, $n=5$) que nosotros, pero con una mayor cantidad de neutrófilos ($1.2 \pm 1.2 \times 10^9$) y plaquetas ($5.1 \pm 1.0 \times 10^{11}$), y un hematocrito ($6.1 \pm 0.9\%$) superior.

Blanchette y cols. (148) con el separador Haemonetics modelo-30 obtienen a partir de donantes sanos ($n=5$) similares cantidades de linfocitos ($4.6 \pm 1.1 \times 10^9$) y monocitos ($1.0 \pm 0.3 \times 10^9$), pero con el doble de neutrófilos ($0.7 \pm 0.7 \times 10^9$) y casi el triple de plaquetas ($3.7 \pm 0.6 \times 10^{11}$). El hematocrito final ($21 \pm 3\%$) es muy alto.

Utilizando el separador Aminco Celltrifuge, Korbling y cols. (145) obtienen a partir de donantes sanos una mayor cantidad de células mononucleares ($12 \pm 3.1 \times 10^9$, $n=35$), pero a costa de procesar el doble de volumen sanguíneo en el separador (12 litros), y proporcionalmente con una mayor contaminación de granulocitos ($1.5 \pm 1.8 \times 10^9$) y plaquetas ($3.9 \pm 2.1 \times 10^{11}$). La contaminación de hematíes es proporcionalmente algo inferior ($12.5 \pm 6.5 \times 10^{10}$).

La revisión bibliográfica realizada nos confirma que el programa diseñado en este trabajo obtiene mejores resultados que los procesos de obtención existentes basados en una sola etapa; éstos pueden obtener una cantidad similar de células mononucleares, pero a costa de una mayor presencia de otras células. Por otra parte el programa diseñado obtiene resultados similares a los procesos de obtención en dos etapas, técnicamente mucho más complejos y con mayores riesgos de contaminación microbiana para el enfermo.

V-2) ACTIVIDAD CITOLITICA DE LAS CELULAS LAK.

La segunda parte del trabajo lo centramos en determinar la actividad citolítica "in vitro" de las células LAK frente a los blastos leucémicos autólogos, con el fin de predecir en estos enfermos la eficacia de la terapia con células LAK e IL-2. Sobre este tema existen pocos trabajos publicados, y éstos apoyan en general la eficacia citolítica "in vitro" de las células LAK frente a los blastos leucémicos, aunque todavía no existen ensayos clínicos publicados debido a la novedad del tema.

Para ello estudiamos la actividad citolítica "in vitro" de las células LAK obtenidas de células mononucleares en enfermos con leucemia aguda en remisión completa tras quimioterapia, frente a los blastos leucémicos congelados al diagnóstico. Primero realizamos un estudio de la sensibilidad de los blastos leucémicos a las células LAK alogénicas de donantes sanos, y posteriormente se evalúa la sensibilidad de los blastos leucémicos frente a células LAK autólogas. Dado que para un test de lisis el número de células mononucleares necesarias no es elevado, y ante la dificultad de realizar un proceso de extracción de unas 3 horas en el separador celular a donantes sanos, obtenemos las células mononucleares mediante separación en gradiente de densidad con ficoll de una muestra de sangre periférica extraída por punción venosa.

Análogamente procedemos para obtener células mononucleares de enfermos para la realización del test de lisis.

Mediante un test de lisis medimos la actividad citolítica de las células mononucleares de enfermos y donantes, cultivados con y sin IL-2, frente a blastos de enfermos con leucemia aguda, y frente a células tumorales K-562 y Daudi como control de la técnica. Estas células se utilizan como control de citolisis por su significativa correlación de actividad LAK con los blastos leucémicos, aunque en éstos la actividad lítica es inferior (138, 149).

El concentrado de blastos leucémicos obtenido por separación en gradiente de densidad con ficoll de sangre periférica presenta un alto porcentaje medio de blastos (88.1%). Asimismo la viabilidad de los blastos obtenidos tras la extracción es alta (96%), y aunque desciende significativamente tras el proceso de congelación (88.4%), ésta sigue siendo alta cuando van a utilizarse en el test de lisis.

V-2.1) ACTIVIDAD CITOLITICA NK DE DONANTES SANOS.

La actividad citolítica NK de donantes sanos que observamos es mayor frente a células K-562 (12.4%) que frente a células Daudi (3.9%), como era de esperar al ser éstas NK-resistentes.

Respecto a la actividad NK de donantes sanos frente a células K-562, los resultados publicados por Panayotides ($20.3 \pm 12\%$, $n=3$) (140) son algo superiores, aunque el número de casos es bastante inferior y la desviaciones estándar alta indica una gran dispersión de los resultados. Se observan resultados superiores en los trabajos publicados por Trentin ($27.5 \pm 2.9\%$, $n=10$) (150), Adler ($31.6 \pm 9.9\%$, $n=17$) (151), y Archimbaud ($34 \pm 20\%$, $n=20$) (149). Los resultados publicados de actividad NK frente a células Daudi por Trentin ($1.1 \pm 0.3\%$, $n=10$) (150) son similares; Archimbaud muestra unos resultados superiores ($8 \pm 9\%$, $n=15$) (149) como consecuencia de la alta actividad mostrada por dos donantes con una infección viral.

La actividad NK que encontramos frente a blastos leucémicos (4.5%) es similar a la que observamos frente a células Daudi, poniéndose de manifiesto la gran resistencia a la lisis de estas células blásticas.

Los resultados publicados por Panayotides ($2.4 \pm 2.5\%$, $n=12$) (140), Lotzova ($1.6 \pm 2.1\%$, $n=17$) (143), y Archimbaud ($3 \pm 5\%$, $n=20$) (149) dan valores bajos similares, confirmando nuestros resultados.

V-2.2) ACTIVIDAD CITOLITICA LAK DE DONANTES SANOS.

Los donantes sanos presentan un aumento significativo de actividad LAK frente a células K-562 (67.6%) y Daudi (61.9%), respecto a la actividad NK.

Otros autores obtienen actividades LAK similares frente a células K-562, como Trentin (69.3±1.2% , n=10) (150), Adler (76±19% , n=18) (151), Panayotides (74±2% , n=3) (140) y Archimbaud (59±20% , n=20) (149). Frente a células Daudi, Archimbaud muestra resultados similares (65±17% , n=15) (149), y Trentin obtiene valores algo superiores (79.8±3.1% , n=10) (150).

En nuestros resultados con donantes sanos observamos que la actividad LAK es menor frente a los blastos leucémicos (19.6%) que frente a las células diana control, aunque su incremento respecto a la actividad NK también es estadísticamente significativo a todas las proporciones E:D. Ello indica que los blastos leucémicos son sensibles a las células LAK alogénicas de donantes sanos, aunque el grado de citólisis alcanzado sea menor que frente a las células control K-562 y Daudi. Esto demuestra que la IL-2 es capaz de generar células LAK a partir de células mononucleares de donantes sanos.

Los resultados publicados frente a los blastos leucémicos son algo más dispersos. Archimbaud ($12 \pm 13\%$, $n=20$) (149) y Panayotides ($22 \pm 12\%$, $n=12$) (140) obtienen resultados similares, mientras que Adler ($27.6 \pm 17\%$, $n=18$) (151), Lotzova ($28 \pm 16\%$, $n=20$) (143), y Oshimi ($35 \pm 19\%$, $n=54$) (138) obtienen resultados superiores. En general, todos ponen de manifiesto la gran variabilidad de actividades, con valores que oscilan incluso entre el 1% y el 66% en el trabajo de Oshimi y cols.

V-2.3) ACTIVIDAD CITOLITICA NK DE ENFERMOS CON LEUCEMIA

AGUDA.

Analizando los resultados del grupo de enfermos observamos que la actividad NK es mayor frente a células K-562 (10.3%) que frente a células Daudi (2.7%), análogamente a como se observó en el caso de donantes sanos.

Son superiores las actividades frente a células K-562 publicadas por Trentin ($21.9 \pm 3.9\%$, $n=18$) (150), Adler ($28 \pm 19\%$, $n=11$) (151), Panayotides ($20 \pm 13\%$, $n=3$) (140), y Archimbaud ($18 \pm 15\%$, $n=41$) (149); y similares las de Teichman ($6 \pm 2.8\%$, $n=2$) (152). Frente a células Daudi, son también bajos las actividades publicadas por Teichman ($1.5 \pm 0.7\%$, $n=2$) (152), Trentin ($0.9 \pm 0.2\%$, $n=18$) (150), y Archimbaud ($2 \pm 3\%$, $n=31$) (149).

La actividad NK que encontramos frente a blastos autólogos (2.5%) es similar a la de las células Daudi, mostrando así su gran resistencia a la lisis.

Las publicaciones de Trentin ($1.5 \pm 0.6\%$, $n=4$) (150) y Lotzova ($-0.5 \pm 1\%$, $n=4$) (143) presentan unos resultados similares. Archimbaud presenta una actividad ($5 \pm 10\%$, $n=18$) (149) un poco superior, debido a la actividad NK anormalmente alta que presentaban dos enfermos tras ser sometidos recientemente a un trasplante de médula ósea.

V-2.4) ACTIVIDAD CITOLITICA LAK DE ENFERMOS CON LEUCEMIA

AGUDA.

Nuestros resultados de actividad LAK en el grupo de enfermos indican un aumento de citólisis frente a células K-562 (58.5%) y Daudi (57%), respecto a la actividad NK, siendo ambas actividades (NK y LAK) significativamente diferentes a todas las proporciones E:D.

Los actividades frente a células K-562 publicadas por Trentin ($52.1 \pm 2.4\%$, $n=18$) (150), Archimbaud ($61 \pm 20\%$, $n=41$) (149), Teichman ($65 \pm 0\%$, $n=2$) (152), y Panayotides ($72.3 \pm 4.5\%$, $n=3$) (140), muestran también valores altos similares a los nuestros, siendo superiores los de Adler ($84.3 \pm 12.3\%$, $n=12$) (151). Frente a células Daudi las actividades publicadas por Archimbaud ($62 \pm 23\%$, $n=31$) (149)

son similares, siendo inferiores las de Teichman ($46.5 \pm 2.1\%$, $n=2$) (152), y sobre todo las de Trentin ($16.3 \pm 2.7\%$, $n=18$) (150).

En nuestro trabajo observamos que la actividad LAK frente a blastos leucémicos autólogos (13.2%) es inferior a la de las células control, pero también es significativamente mayor que la correspondiente actividad NK, a todas las proporciones E:D. Ello nos indica que existe una activación de las células mononucleares de enfermos por la IL-2, generándose células LAK capaces de lisar blastos leucémicos autólogos.

Observando las gráficas individuales de cada enfermo vemos que los mejores resultados se presentan en el enfermo nº7, y en menor grado en el enfermo nº9, con una actividad LAK frente a blastos autólogos de 44% y 21% respectivamente. La gran variabilidad de la actividad LAK frente a blastos leucémicos autólogos (0% a 44%) nos indica la necesidad de realizar el test de lisis "in vitro" a cada enfermo para comprobar su comportamiento previsible frente a la terapia, teniendo en cuenta además que no se ha encontrado ninguna relación entre la actividad LAK inducida y las características hematológicas de la enfermedad, la edad o el sexo del enfermo (149).

Los trabajos publicados por Archimbaud ($12 \pm 16\%$, $n=18$) (149), Oshimi ($17.6 \pm 15.7\%$, $n=13$) (138), Trentin ($22.5 \pm 17.6\%$, $n=4$) (150), y Lotzova ($21.8 \pm 12.1\%$, $n=4$) (143) presentan una actividad LAK similar o algo superior. También presentan unas desviaciones estándar altas, que ponen de manifiesto la gran variabilidad de resultados con valores que oscilan entre -6% y 47% en el trabajo de Oshimi y cols., o entre 0% y 54% en el de Archimbaud y cols.

V-2.5) COMPARACION DE LA ACTIVIDAD LAK FRENTE A BLASTOS LEUCEMICOS TIPO LLA/LMA.

En cuanto al diferente comportamiento que puedan presentar los blastos leucémicos tipo LMA y LLA, en nuestro trabajo observamos que los blastos leucémicos tipo LMA son más sensibles a las células LAK de enfermos y donantes que los blastos tipo LLA, aunque las diferencias alcanzadas no son estadísticamente significativas.

Oshimi y cols. (138) y Teichman y cols. (152) no encuentran diferencias estadísticamente significativas en el comportamiento de ambos tipos de blastos leucémicos frente a las células LAK.

**V-2.6) COMPARACION DE ACTIVIDADES CITOLITICAS DE ENFERMOS
Y DONANTES.**

Si comparamos los niveles de actividad NK obtenidos de enfermos y donantes sanos se observa en general una mayor actividad en donantes que en enfermos, debido a que éstos poseen un déficit de actividad NK (143), aunque las diferencias alcanzadas no son estadísticamente significativas.

Respecto a los resultados obtenidos de actividad LAK, los donantes presentan una mayor actividad que los enfermos, observándose diferencias significativas en el comportamiento de estos dos grupos frente a las células K-562 y blastos leucémicos autólogos. Frente a las células K-562, la actividad LAK es significativamente mayor en donantes a proporciones E:D de 10:1, 20:1, y 40:1 ; es decir, los donantes sanos lisan mejor las células K-562. Frente a los blastos leucémicos, la actividad LAK es significativamente mayor en donantes a proporciones E:D de 20:1 y 40:1 ; es decir, los donantes sanos lisan mejor los blastos leucémicos, aunque los enfermos también pueden generar altos niveles de actividad LAK.

Se observa como tanto las células LAK autólogas de enfermos con leucemia aguda en remisión completa como las alogénicas de donantes sanos son capaces de lisar a los

blastos leucémicos en gran número de casos, siendo algo mayor esta capacidad en las de donantes sanos. También observamos en general una gran variabilidad de la capacidad lítica de las células LAK sobre los blastos leucémicos, pero en muchos casos se observa un aumento de actividad citolítica tras la incubación con IL-2.

V-2.7) SENSIBILIDAD DE LOS BLASTOS LEUCEMICOS A LAS CELULAS LAK.

Para seleccionar enfermos candidatos a la terapia LAK hemos de fijar un nivel de lisis en el que la respuesta de las células LAK frente a blastos autólogos pueda considerarse claramente positiva.

Algunos autores (143) (138) consideran como resultado positivo aquel cuyas cpm experimentales son significativamente superiores a las cpm espontáneas, por lo que el número de casos positivos suele ser alto. Teichman y cols. (152) fijan de forma arbitraria un límite de lisis más alto (20%) a partir del cual consideran el test positivo, ante la posibilidad de una aplicación clínica. También Panayotides y cols. (140) fijan como límite de lisis el 10% de actividad LAK, y Archimbaud y cols. (149) lo establecen en el 15% .

En nuestro estudio, y ante la posibilidad de una aplicación clínica del tratamiento, no consideramos muy adecuada la definición de resultado positivo como aquel que presente unas cpm experimentales significativamente superiores a las espontaneas, y estamos de acuerdo con Teichman y cols. en la necesidad de definir un límite de actividad superior para asegurar el éxito de la terapia.

Por ello consideramos que la activación es positiva cuando el valor de la actividad LAK es mayor que el límite superior de confianza de la media de actividad NK medida a la misma proporción E:D. De esta forma el límite que definimos en nuestro trabajo es 16.1% y 14.1% para las actividades LAK de donantes sanos, y de 11.3% y 11.7% para las de enfermos, a las proporciones E:D de 40:1 y 20:1 respectivamente.

A partir de ello observamos que un 50% de las leucemias agudas examinadas son susceptibles al efecto de las células LAK autólogas a la proporción 40:1 (E:D), siendo de un 30% a la proporción 20:1. Frente a las células LAK alogénicas (donantes sanos) los blastos leucémicos presentan una sensibilidad del 40% a ambas proporciones E:D.

Otros autores observan unos porcentajes similares. Archimbaud y cols. (149) observan que el 33% de 18 enfermos con leucemia aguda presentan una actividad LAK frente a blastos autólogos superior al 15% (E:D de 60:1). Teichman y

cols. (152) obtienen que el 64% de un total de 51 leucemias agudas examinadas son susceptibles al efecto de las células LAK de donantes sanos a la proporción 50:1. Panayotides (140) encuentra que los blastos leucémicos son sensibles a las células LAK de donantes sanos en un 75% (E:D de 20:1) de 12 casos estudiados. En otros trabajos las proporciones son superiores, aunque esto puede ser debido al bajo número de leucemias examinadas, o a la definición del límite de positividad adoptado. Así Oshimi y cols. (138) observan que a la proporción E:D de 80:1 el 96% de 27 leucemias agudas son sensibles a las células LAK de donantes sanos, y que el 85% de 20 leucemias agudas lo son a las células LAK autólogas.

Con los resultados que obtenemos y los de otros autores podemos esperar que el tratamiento con células LAK sea un complemento eficaz contra las leucemias agudas en un porcentaje importante de enfermos. Esta terapia puede abrir un camino de esperanza en el tratamiento de leucemias agudas, sobre todo en el grupo de enfermos con LMA, donde la quimioterapia y/o el trasplante de médula ósea no han conseguido que la supervivencia media libre de enfermedad sea superior a los 20-26 meses, y que el porcentaje de enfermos con una supervivencia prolongada, y por tanto con posibilidad de curación, sea superior al 10-30% (153, 154). En estos enfermos sin posibilidad de curación la terapia con células LAK e IL-2 podría ser efectiva en la erradicación de la leucemia residual siguiente a la quimioterapia.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo extraemos las siguientes conclusiones :

1º) El diseño de trabajo ensayado para la extracción de células mononucleares con el separador celular CS-3000 ha resultado ser de gran utilidad en la rutina asistencial de la terapia antitumoral en base a:

1a) Las modificaciones introducidas al programa de separación se han mostrado efectivas al obtener una mayor recuperación de células mononucleares (77.2%), tanto de linfocitos (82.7%) como de monocitos (56.1%), que con el programa suministrado por el fabricante, en el ensayo realizado en bolsas de donantes. La recuperación de las demás células contaminantes también aumenta paralelamente a la de células mononucleares, excepto los granulocitos que lo hacen en mayor cuantía, pero se mantiene en unos niveles bajos aceptables para el posterior cultivo.

La muestra final obtenida tiene una fórmula leucocitaria compuesta mayoritariamente de células mononucleares (93.1%), sobre todo linfocitos (82.1%), con una baja proporción de granulocitos (6.9%).

1b) La extracción de células mononucleares de enfermos leucémicos según nuestro método presenta una buena eficiencia de recolección (59.4%), tanto de linfocitos (62.4%) como de monocitos (52.3%). La muestra final obtenida tiene una fórmula leucocitaria compuesta mayoritariamente de células mononucleares (92.7%), sobre todo linfocitos (72.1%), con una baja proporción de granulocitos (7.3%).

Los resultados son similares a los obtenidos con otras metodologías más complejas que utilizan separaciones secundarias con ficoll. Respecto a los procesos en una sola etapa en éste y otros separadores, los resultados de recuperación de células mononucleares que se obtienen en nuestro trabajo son similares, y en algunos casos algo inferiores, pero al mismo tiempo se obtiene una menor contaminación de hematíes y granulocitos.

1c) Con la metodología desarrollada se obtiene mayor cantidad de células mononucleares con un alto grado de purificación en un proceso simple y automatizado en un separador que trabaja en un sistema cerrado. De esta forma se consigue disminuir el número de aféresis requeridas para obtener la cantidad suficiente de células mononucleares para el tratamiento, con el consiguiente ahorro de problemas para el enfermo. La automatización, simplificación, y el trabajo en un circuito cerrado conlleva un menor riesgo de contaminación microbiana, y un menor coste económico y de tiempo.

2) El cultivo de células mononucleares con IL-2, tanto de enfermos leucémicos como de donantes sanos, se ha mostrado efectivo en la obtención de células LAK para la lisis "in vitro" de células blásticas de enfermos con leucemia aguda en base a :

2a) Los blastos leucémicos y las células Daudi no son sensibles a las células NK de enfermos o donantes , mostrando así su condición de células NK-resistentes. Las células K-562, muestran cierta sensibilidad a las células NK, mostrando así su condición de células NK-sensibles.

2b) En general, los blastos leucémicos muestran cierta sensibilidad a las células LAK, tanto de enfermos como de donantes, como consecuencia del efecto de la IL-2 sobre las células mononucleares. Las células K-562 y Daudi muestran una mayor sensibilidad a dichas células LAK. Ello indica que la IL-2 se muestra efectiva en la activación de células mononucleares de enfermos con leucemia aguda.

2c) Existe una notable variabilidad de la capacidad lítica de las células LAK sobre los blastos leucémicos, pero en gran número de casos se observa un aumento de actividad tras la incubación con IL-2. El déficit funcional de células NK en estos enfermos puede ser corregido tras el cultivo de las células mononucleares con IL-2.

2d) Se observa que los blastos leucémicos tipo LMA son más sensibles a la actividad de células LAK que los blastos tipo LLA, aunque las diferencias alcanzadas no se muestran estadísticamente significativas.

2e) Las células LAK de donantes sanos presentan una actividad significativamente más alta que las de enfermos frente a los blastos leucémicos y a las células K-562 a altas proporciones efector:diana. Ello indica que las células LAK de donantes sanos lisan mejor los blastos leucémicos, aunque las células LAK de enfermos también pueden generar altos niveles de citolisis. Frente a las células Daudi no hay diferencias significativas de actividad.

2f) Se obtiene un porcentaje de enfermos sensibles a las células LAK similar a otras publicaciones en las que se define la activación positiva al mismo nivel que en nuestro trabajo. El porcentaje de enfermos sensibles a las células LAK autólogas y alogénicas es similar, siendo de un 50% frente a las autólogas y de un 40% a las alogénicas (E:D de 40:1).

2g) Los resultados sugieren que la terapia con células LAK puede ser de gran valor en el tratamiento de la leucemia aguda, siendo de especial relevancia los esperanzadores resultados que se obtienen en el grupo de enfermos con LMA, donde la quimioterapia y/o el trasplante de médula ósea sólo

consiguen remisiones completas prolongadas con posibilidad de curación en menos de un tercio de estos enfermos. En este grupo de enfermos, el tratamiento con células LAK e IL-2 podría ser un complemento efectivo a los ya existentes, especialmente en la erradicación de la leucemia residual tras quimioterapia, cuando la población tumoral no es muy elevada.

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1) Terry WD, Hodes RJ. Métodos más recientes para el tratamiento del cáncer. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Cáncer. Ed. Salvat, 1984: 1639.
- 2) Busch W. Verhandlungen ärztlicher Gesellschaften. Berl Klin Wochenschr, 1868; 5:137.
- 3) Coley WB. Contributions to the Knowledge of sarcoma. Ann Surg, 1891; 14:199.
- 4) Ehrlich P. Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. Himmelweit F (ed): The Collected Papers of Paul Ehrlich. Vol II: 550. London, Pergamon Press. 1957.
- 5) Klein E. Local cytostatic chemotherapy and immunotherapy. Geriatrics, 1968; 23:154.
- 6) Klein E. Hypersensitivity reactions at tumor sites. Cancer Res, 1969; 29:2351.
- 7) Klein EO, Holterman H, Milgrom RW, et al. Immunotherapy for accesible tumors utilizing delayed hypersensitivity reactions and separated components of the inmune system. Med Clin North AM, 1976; 60:389.
- 8) Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, et al. Active Immunotherapy for acute lymphoblastic leukemia. Lancet, 1969; i:697.

- 9) Morton DL, Eilber FR, Malmgren RA, et al. Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma. *Surgery*, 1970; 68:158.
- 10) Brested JH. *The Edwin Smith Surgical Papyrus*. Chicago. University of Chicago Press. 1930.
- 11) Thorwald J. *Science and the Secrets of Early Medicine*. New York, Hancourt, Borace, and World, 1962.
- 12) Rosenberg SA. Principles of surgical Oncology. En: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer: principles and practice of oncology*. 3ª edition, 1989: 236.
- 13) Hill GJ. Historic milestones in cancer surgery. *Semin Oncol*, 1979; 6:409.
- 14) Castillo R, Gelabert A. Transfusión sanguínea y trasplante de médula ósea. En: Sans-Sabrafen J. *Hematología Clínica*. Eds. Doyma, 1988: 113.
- 15) Bast RC Jr, Sallan SE, Reynolds C, et al. Autologous bone marrow transplantation for CALLA-positive acute lymphoblastic leukemia: an update. En: Dike KA, Spitzer G, Zander AR, eds. *Autologous bone marrow transplantation*. Houston, The University of Texas M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute at Houston, 1985; 3.

- 16) Ramsay N, LeBien T, Nesbit M, et al. Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia following marrow treatment with BA-1, BA-2, BA-3 and rabbit complement. *Blood*, 1983; 62:228.
- 17) Yeager AM, Kaizer H, Santos GW, et al. Autologous bone marrow transplantation in patients with acute nonlymphocytic leukemia, using ex vivo marrow treatment with 4-hydroperoxycyclophosphamide. *N Engl J Med*, 1986; 315(3):141.
- 18) Van Bekkum DW. Graft-versus-host disease. En van Bekkum DW, Löwenberg B, eds. *Bone Marrow transplantation. Biological mechanisms and clinical practice*. New York, Marcel Dekker Inc.147, 1985.
- 19) Advisory Committee of the International Bone marrow Transplant Registry. Allogenic bone marrow transplantation for 144 patients with severe aplastic anemia. *JAMA*, 1981; 245:1132.
- 20) Gluckman E, Barret AJ, Arcese W, et al. Bone Marrow transplantation in severe aplastic anaemia: a survey of the European group for Bone Marrow Transplantation (EGBMT). *Br J Haematol*, 1981; 49:165.

- 21) Rozman C, Grañena A, Marín P, et al. Trasplante medular alogénico en aplasia medular grave. Factores determinantes del resultado en una serie de 27 casos consecutivos. Med Clín (Barc), 1985; 84:129.
- 22) Gale RP, Kay H, Rimm AA, Bortín MM. Bone marrow transplantation for acute leukemia in first remission. Lancet, 1982; 2:1006.
- 23) Gale RP, Kersey JH, Bortín MM, et al. Bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia. Lancet, 1983; 2:663.
- 24) Thomas ED, Clift RA, Fefer A, Appelbaum FR. Marrow transplantation for the treatment of chronic myelogenous leukemia. Ann Intern Med, 1986; 104:155.
- 25) Valls A. La radioterapia en el tratamiento de las hemopatías malignas. En : Sans-Sabrafen J. Hematología Clínica. Eds. Doyma, 1988: 690.
- 26) Appelbaum FR, Thomas ED. Treatment of acute leukemia in adults with chemoradiotherapy and bone marrow transplantation. Cancer, 1985; 55:2202.
- 27) Porlock CS y Goffinet DR. Manual of Clinical Problems in Oncology. Little, Brown and Company, Boston, 225, 1980.

- 28) Botnick L, Hannon EC, Heellman S. Multisystem stem cell failure after apparent recovery from alkylating agents. *Cancer Res*, 1978; 38: 1942.
- 29) Hellaman S y Botnick L. Stem cell depletion: an explanation of the late effects of cytotoxins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1977; 2:181.
- 30) Steinhorn SC. Improved survival among children with acute leukemia diagnosed in the 1970. *Cancer Treat Rep*, 1984; 68:953.
- 31) Gaynon P, Steinherz P, Bleyer WA, et al. Superiority of intensive therapy for children with previously untreated acute lymphoblastic leukemia and unfavorable prognostic features. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1986; 5:162.
- 32) Hoelzer D, Thiel E, Loffler H, et al. Intensified therapy in acute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. *Blood*, 1984; 64:38.
- 33) Pavlovsky S. Quimioterapia en el tratamiento de las hemopatías malignas. En: Sans-Sabrafen J. *Hematología Clínica*. Eds. Doyma, 1988: 701.

34) Creutzig V, Ritter J, Riehm H, et al. Improved treatment results in childhood acute Myelogenous leukemia: a report of the German Cooperative Study. AML-BFM-78. Blood, 1985; 65:298.

35) Scaglione C, Sackmann-Muriel F, Bustelo P, et al. A pilot study of combination chemotherapy in acute myeloblastic leukemia in children. Proc. Am Soc Clin Oncol, 1986; 5:154.

36) Zittoun R, Audebert A, Hoerni B, et al. Extended field versus involved fields irradiation combined with MOPP chemotherapy in early clinical stages of Hodgkin's disease. J Clin Oncol, 1985; 3:207.

37) Pavlovsky S, Dupont J, Jimenez E, et al. A randomized study of chemotherapy alone vs chemotherapy plus radiotherapy in clinical stages IA-IIA Hodgkin's disease. En: Malignant lymphomas and Hodgkin's disease experimental and therapeutic advances. Cavalli F, Bonadonna G, Rozencweig M, eds. La Haya, Martinus Nighoff Publishing 1985; 337.

38) Skarin AT, Canellos GP, Rosenthal DS, et al. III. Improved prognosis of diffuse hystiocytic and undifferentiate lymphoma by use of high dose methotrexate alternating with standard agents (M-BACOD). J Clin Oncol, 1983; 1:91.

39) Lewis JP. Clinical trials of adult acute non-lymphocytic leukemia: Evidence of progress. *Cancer Treat Rev*, 1985; 12:133.

40) Monserrat E, Alcalá A, Parody R, et al. Treatment of chronic lymphocytic leukemia in advanced stages. A randomized trial comparing chlorambucil plus prednisone. *Cancer*, 1985; 56:2369.

41) The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Results of a prospective randomized trial of early splenectomy in chronic myeloid leukemia. *Cancer*, 1984; 54:333.

42) Pavlovky S, Saslavsky J, Tezanos Pinto M, et al. A randomized trial of melpahalan and prednisone versus melphalan, prednisone, cyclophosphamide, MeCCNU and vincristine in untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*, 1984; 2:836.

43) Rosenberg SA. The low grade non-Hodgkin's lymphomas: Challenges and oportunities. *J Clin Oncol*, 1985; 3:299.

44) Terry WD, Rosenberg SA (eds). *Immunotherapy of Human Cancer*. New York, Elsevier-North Holland, 1982.

- 45) Mendelsohn J. Principios de las neoplasias. En: Braunwald E, Isselbacher KJ, Petersdorf RG, et al. Harrison: Principios de Medicina Interna, 1989: 523.
- 46) Foley EJ. Properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of strain origin. *Cancer Res*, 1953; 13:835.
- 47) Burnet FM. Immunological surveillance. Londres. Pergamon Press. 1970.
- 48) Gomez de la Concha E, Puch C, Viñuela J, Subiza JL. Mecanismos inmunológicos en la destrucción tumoral. *Rev Cancer*, 1987; 1: 97.
- 49) Reinherz EL, Schlossman SF. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, 1980; 19:821.
- 50) Schwartz RH. T-lymphocyte recognition of antigen in association with gene products of the major histocompatibility complex. *Ann Rev Immunol*, 1985; 3:237.
- 51) Mentzer SJ, Bierrer B, Crimmins M, et al. Functional T cell antigens and their role in T cell activation Primary Immunodeficiency disease. Ed. Eibl and Rosen. *Experta Medicina*, Amsterdam, 1986;165.
- 52) Henkart PA. Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Ann Rev Immunol*, 1985; 3:31.

- 53) Brodt P. Tumor immunology, three decades in review. *Ann Rev Microbiol*, 1983; 37:447.
- 54) Hebermann RB, Holden HT. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res*, 1978; 27:305.
- 55) Hebermann RB, Reynolds CV, Ortaldo JR. Mechanism of cytotoxicity by natural Killer (NK) cells. *Ann. Rev. Immunol*, 1986; 4:651.
- 56) Dennert F, Podack ER. Cytolysis by H-2 specific T Killer cells: assembly of tubular complexes on target membranes. *J Exp Med*, 1983; 157:1483.
- 57) Adams DQ. Effector mechanisms of cytolytically-activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors. *J Immunol*, 1980; 152:198.
- 58) Adams DO, Nathan CF. Molecular mechanism in tumor-cell Killing by activated macrophages. *Immunol Today*, 1983; 4:166.
- 59) Nathan C, Cohn ZA. Role of oxygen-dependent mechanisms in antibody-induced lysis of tumor cells by activated macrophages. *J Exp Med*, 1980; 152:198.
- 60) Lanier LL, Philips JH. Evidence for three types of human cytotoxic lymphocytes. *Immunol Today*, 1986; 7:132.

- 61) Dumonde DC, Wolstencraft RA, Panavei GS, et al. *Nature* (London), 1969; 224:38.
- 62) Alonso JL. La compleja fisiología del factor de necrosis tumoral. *Inmunología*, 1989; 8(3): 73.
- 63) Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculation of erysepelas: with a report of ten original cases. *Am J Med Sci*, 1893; 105:487.
- 64) Nauts HC. *Cancer Res Inst Monogr N°8*. New York, Cancer Research Institute, Inc, 1980.
- 65) Morgan DA, Ruscetti FW, Gallo RC. *Science*, 1976; 193:1007.
- 66) Erard F, Corthesy P, Nabholz M, et al. Interleukin-2 is both necessary and sufficient for the growth and differentiation of lectin-stimulated cytolytic T lymphocyte precursors. *J Immunol*, 1985; 134:1644.
- 67) Shaw AR, Belackley RC, Merryweather JP, Barr RJ. Modulation of human natural killer cell activity by recombinant human interleukin-2. *Cell Immunol*, 1985; 91:193.
- 68) Leibson HJ, Gefter M, Zlotnik A, et al. Role of gamma-interferon in antibody-producing responses. *Nature*, 1984; 309:799.

69) Herrmann F, Cannistra SA, Levine H, et al. Expression of interleukin 2 receptors and binding of interleukin 2 by gamma interferon-induced human leukemic and normal monocytic cells. *J Exp Med*, 1985; 162:1111.

70) Poplack DG, Bonnard GD, Holiman BJ, Blaese RM. Monocyte-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity: a clinical test of monocyte function. *Blood*, 1976; 48:809.

71) Le J, Prenskey W, Yip YK, et al. Activation of human monocyte cytotoxicity by natural and recombinant immune interferon. *J Immunol*, 1983; 131: 2821.

72) Welte K, Mertelsmann R. Human interleukin-2: biochemistry, physiology, and possible pathogenetic role in immunodeficiency syndromes. *Cancer Invest*, 1985; 3:35.

73) Bindon C, Czerniecki M, Ruell P, et al. *Br J Cancer*, 1983; 47:123.

74) Lotze M, Matory T, Ettinghausen L, et al. In vivo administration of purified human interleukin 2. II. Half life, immunologic effects, and expansion of peripheral lymphoid cells in vivo with recombinant IL-2. *J Immunol*, 1985; 135:2865.

75) Rosenstein M, Ettinghausen SE, Rosenberg SA. *J Immunol*, 1987; 137:1735.

- 76) Dupere SL, O'Connor TE, Oldham K. Aplicaciones clínicas de las linfoquinas. *Rev Cancer*, 1987; 1(3): 113.
- 77) Brown JH, Jardetzky T, Saper MA et al. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*, 1988; 332: 845.
- 78) Borden EC, Sondel PM. Lymphokines and Cytokines as Cancer Treatment. *Immunotherapy realized. Cancer*, 1990; 65: 800.
- 79) Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of cancer using lymphokine activated killer cells and recombinant interleukin-2. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA (eds). *Important Advances in Oncology*, Philadelphia, JB Lippincott, 1986: 55.
- 80) Rosenberg SA, Terry W. Passive immunotherapy of cancer in animals and man. *Adv Cancer Res*, 1977; 25:323.
- 81) Rosenberg SA. The adoptive immunotherapy of cancer: Accomplishments and prospects. *Cancer Treat Rep*, 1984; 68:233.
- 82) Fefer A, Cheever MA, Greenberg PD. Lymphocyte transfer as potential cancer immunotherapy. In Mihich E (ed): *Immunological Approaches to Cancer Therapies*, p.333. New York, John Wiley and Sons, 1982.

- 83) Kedar E, Weiss DW. The in vitro generation of effector lymphocytes and their employment in tumor immunotherapy. *Adv Cancer Res*, 1983; 38:171.
- 84) Alexander P. Immunotherapy of cancer. Experiments with primary tumors and syngeneic tumor grafts. *Prog Exp Tumor Res*, 1968; 10:22.
- 85) Borberg H, Oettgen HF, Choudry K, et al. Inhibition of established transplants of chemically induced sarcomas in syngeneic mice by lymphocytes from immunized donors. *Int J Cancer*, 1972; 10:539.
- 86) Smith HG, Harmel RP, Hanna MG, et al. Regression of established intradermal tumors and lymph node metastases in guinea pigs after systemic transfer of immune lymphoid cells. *J Natl Cancer Inst*, 1977; 58:1315.
- 87) Berendt MJ, North RJ. T-cell mediated suppression of antitumor immunity. An explanation for progressive growth of an immunogenic tumor. *J Exp Med*, 1980; 151:59.
- 88) Fernandez-Cruz E, Halliburton B, Feldman JD. In vivo elimination by specific effector cells of an established syngeneic rat Moloney virus-induced sarcoma. *J Immunol*, 1979; 123:1772.

- 89) Cheever MA, Kempf RA, Fefer A. Tumor neutralization, immunotherapy, and chemoimmunotherapy of a Friend leukemia with cells secondarily sensitized in vitro. *J Immunol*, 1977; 119:714.
- 90) Greenberg PD, Cheever MA, Fefer A. Eradication of disseminated murine leukemia by chemoimmunotherapy with cyclophosphamide and adoptively transferred immune syngeneic Lyt-1+,2-lymphocytes. *J Exp Med*, 1981; 154:952.
- 91) Eberlein TJ, Rosenstein M, Rosenberg SA. Regression of a disseminated syngeneic solid tumor by systemic transfer of lymphoid cells expanded in IL-2. *J Exp Med*, 1982; 156:385.
- 92) Rosenstein M, Eberlein TJ, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established syngeneic solid tumors: Role of T lymphoid subpopulations. *J Immunol*, 1984; 132:2117.
- 93) Shu S, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of newly induced murine sarcomas. *Cancer Res*, 1985; 45: 1657.
- 94) Yron I, Wood TA, Spiess P, Rosenberg SA. In vitro growth of murine T cells: V. The isolation and growth of lymphoid cells infiltrating syngeneic solid tumors. *J Immunol*, 1980; 125:238.

- 95) Lotze MT, Grimm E, Mazumder A, Strausser JL, Rosenberg SA. In vitro growth of cytotoxic human lymphocytes: IV. Lysis of fresh and cultured autologous tumor by lymphocytes cultured in T cell growth factor (TCGF). *Cancer Res*, 1981; 41:4420.
- 96) Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA. The lymphokine activated killer cell phenomenon: Lysis of NK resistant fresh solid tumor cells by IL-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med*, 1982; 155:1823.
- 97) Rosenstein M, Yron I, Kaufmann Y, Rosenberg SA. Lymphokine activated killer cells: Lysis of fresh syngeneic NK-resistant murine tumor cells by lymphocytes cultured in interleukine-2. *Cancer Res*, 1984; 44:1946.
- 98) Rosenberg SA, Grimm EA, McGrogan M, et al. Biological activity of recombinant human interleukine-2 produced in *E. coli*. *Science*, 1984; 223:1412.
- 99) Grimm EA, Robb RJ, Roth JA, et al. Lymphokine-activated killer cell (LAK) phenomenon: III. Evidence that IL-2 alone is sufficient for direct activation of PBL into LAK. *J Exp Med*, 1983; 158: 1356.

100) Grimm EA, Ramsey KM, Mazumder A, et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon: II. The precursor phenotype is serologically distinct from peripheral T lymphocytes, memory CTL, and NK cells. *J Exp Med*, 1983; 157: 884.

101) Grimm EA, Rosenberg SA. The human lymphokine-activated killer cell phenomenon. In Pick E, Candy M (eds): *Lymphokines*, vol 9, pp 279-311. New York, Academic Press, 1983.

102) Rayner AA, Grimm EA, Lotze MT, et al. Lymphokine-activated killer cell (LAK) phenomenon: IV. LAK cell clones recognize a shared determinant on fresh human tumors. *J Natl Cancer Inst*, 1985; 55:1333.

103) Rayner AA, Grimm EA, Lotze MT, Chu EW, Rosenberg SA. Lymphokine-activated killer (LAK) cells. Analysis of factors relevant to the immunotherapy of human cancer. *Cancer*, 1985; 55: 1327.

104) Rosenberg SA: Lymphokine activated killer cells: A new approach to the immunotherapy of cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1985; 75: 595.

105) Strausser JL, Mazumder A, Grimm EA, et al. Lysis of human solid tumors by autologous cells sensitized in vitro to alloantigens. *J Immunol*, 1981; 127:266.

- 106) Mazumder A, Grimm EA, Rosenberg SA. Lysis of fresh human solid tumor cells by autologous lymphocytes activated in vitro by allosensitization. *Cancer Immunol Immunother*, 1983; 15:1.
- 107) Mazumder A, Grimm EA, Zhang HZ, Rosenberg SA. Lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with lectins. *Cancer Res*, 1982; 42:913.
- 108) Mazumder A, Grimm EA, Rosenberg SA. Characterization of the lysis of fresh human solid tumors by autologous lymphocytes activated in vitro with phytohemagglutinin. *J Immunol*, 1983; 130:958.
- 109) Zarling JM, Robins HI, Raich PC, Bach FH, Bach ML. Generation of cytotoxic T lymphocytes to human leukemia cells by sensitization of pooled allogeneic normal cells. *Nature*, 1978; 274:269.
- 110) Rosenberg SA. Immunotherapy of cancer by the systemic administration of lymphoid cells plus interleukin-2. *J Biol Response Mod*, 1984; 3: 501.
- 111) Mazumder A, Eberlein TJ, Grimm EA, et al. Phase I study of the adoptive immunotherapy of human cancer with lectin activated autologous mononuclear cells. *Cancer*, 1984; 53: 896.

112) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukine-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med*, 1985; 313: 1485.

113) Lotze MT, Chang AE, Seipp CA, et al. High dose recombinant interleukin-2 in the treatment of patients with disseminated cancer: Responses, treatment related morbidity and histologic findings. *JAMA*, 1986; 256: 3117.

114) Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukine-2 or high dose interleukine-2 alone. *N Engl J Med*, 1987; 316: 889.

115) Lotze MT, Matory YL, Rayner AA, et al. Clinical effects and toxicity of interleukine-2 in patients with cancer. *Cancer*, 1986; 58: 2764.

116) Lotze MT, Custer MC, Rosenberg SA. Intraperitoneal administration of interleukine-2 in patients with cancer. *Arch Surg*, 1986; 121: 1373.

117) Rosenberg SA. Tratamiento inmunoterápico del cancer avanzado con interleukina-2 sola o combinada con células killer activadas con linfoquinas. En: Devita VT, Hellman S, Rosenberg SA. *Avances en oncología*, 1988: 251.

- 118) Mule JJ, Shu S, Schwarz SL, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy of established pulmonary metastases with LAK cells and recombinant interleukin-2. *Science*, 1984; 225: 1487.
- 119) Mule JJ, Shu S, Rosenberg SA. The anti tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo. *J Immunol*, 1985; 135:646.
- 120) Mule JJ, Ettinghausen SE, Spiess PJ, et al. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: An analysis of survival benefit and mechanisms of tumor escape in mice undergoing immunotherapy. *Cancer Res*, 1986; 46: 676.
- 121) Mule JJ, Yang J, Shu S, Rosenberg SA. The anti-tumor efficacy of lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 in vivo: Direct correlation between reduction of established metastases and cytolytic activity of lymphokine-activated killer cells. *J Immunol*, 1986; 136:3899.
- 122) Shu S, Chou T, Rosenberg SA. In vitro sensitization and expansion with viable tumor cells and interleukin-2 in the generation of specific therapeutic effector cells. *J Immunol*, 1986; 136:3891.

- 123) Shu S, Chou T, Rosenberg SA. Generation from tumor tumor-bearing mice of lymphocytes with in vivo therapeutic efficacy. *J Immunol*, 1987; 39: 295.
- 124) Lotze MT, Line BR, Mathisen DJ, Rosenberg SA. The in vivo distribution of autologous human and murine lymphoid cells grown in t cell growth factor (TCGF): Implications for the adoptive immunotherapy of tumors. *J Immunol*, 1980; 125: 1487.
- 125) Lotze MT, Frana LW, Sharrow SO, et al. In vivo administration of purified human interleukin-2. I. Half life and immunologic effects of the Jurkat cell line derived IL-2. *J Immunol*, 1985; 134:157.
- 126) Taniguchi T, Matsui H, Fujita T, et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human interleukin-2. *Nature*, 1983; 302:305.
- 127) West WH, Tauer KW, Yannelli JR, et al. Constant-infusion recombinant interleukin-2 in adoptive immunotherapy of advanced cancer. *N Engl J Med*, 1987; 316: 898.
- 128) Dutcher JP, Creekmore S, Weiss GR, et al. Phase II study of high dose interleukin-2 and lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with melanoma. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 1987; 6:246.

129) Fisher RI, Coltman CA, Doroshow JH, et al. Phase II study clinical trial of interleukin II plus lymphokine activated killer cells (IL-2/LAK) in metastatic renal cancer. Proc Am Soc Clin Oncol, 1987; 6:244.

130) Steis R, Bookman M, Clark J, Urba W, et al. Intraperitoneal lymphokine activated killer (LAK) cell and interleukin-2 (IL-2) therapy for peritoneal carcinomatosis: Toxicity, efficacy, and laboratory results. Proc Am Soc Clin Oncol, 1987; 6: 250.

131) Paciucci PA, Konefal R, Ryder J, et al. Phase I-II study of adoptive immunotherapy with rIL-2 activated cells and escalating continuous infusion rIL-2 in patients with disseminated cancer. Proc Am Soc Clin Oncol, 1987; 6:248.

132) Muul LM, Nason-Burchenal K, Hyatt C, et al. Studies of serum free culture medium in the generation of lymphokine activated killer cells. J Immunol Methods, 1987; 105:183.

133) Muul LM, Nason-Burchenal K, Carter CS, et al. Development of an automated closed system for generation of human lymphokine activated killer (LAK) cells for use in adoptive immunotherapy. J Immunol Meth, 1987; 101:171.

134) Vetto JT, Papa MZ, Lotze MT, et al. Reduction of toxicity of interleukin-2 and lymphokine activated killer cells in humans by the administration of corticosteroids. *J Clin Oncol*, 1987; 5: 496.

135) Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of acute leukemias. French-American-British (FAB) Cooperative group. *Br J Haematol*, 1976; 33:451.

136) Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative group. *Ann Intern Med*, 1985; 103: 626.

137) CS3000 blood separator operator's manual. Deerfield, IL: Travenol Laboratories, Inc., 1983.

138) Oshimi K, Oshimi Y, Akutsu M, et al. Cytotoxicity of interleukin 2 activated lymphocytes for leukemia and lymphoma cells. *Blood*, 1986; 68: 938.

139) Mageed AA, Findley H, Franco C, et al. Natural killer cells in children with acute leukemia. The effect of interleukin-2. *Cancer*, 1987; 60: 2913.

140) Panayotides P, Porwit A, Sjogren AM, et al. Resistance of some leukemic blasts to lysis by lymphokine activated killer (LAK) cells. *Eur J Haematol*, 1988; 40: 362.

141) Findley HW, Mageed AA, Nasr SA, et al. Recombinant interleukin-2 activates peripheral blood lymphocytes from children with acute leukemia to kill autologous leukemic cells. *Cancer*, 1988; 62:1928.

142) Carrasco de La Peña. Pruebas no paramétricas. En: Carrasco de La Peña. El Método estadístico en la investigación médica. 3ª edición. Ed. Ciencia. 1986: 290.

143) Lotzova E, Savary CA, Herberman RB. Induction of NK cell activity against fresh human leukemia in culture with interleukin-2. *J Immunol*, 1987; 138: 2718.

144) Muul LM, Director EP, Hyatt CL, Rosenberg SA. Large scale production of human lymphokine activated killer cells for use in adoptive immunotherapy. *J Immunol Meth*, 1986; 88:265.

145) Korbling M, Fliedner T, Pflieger H. Collection of large quantities of granulocyte/macrophage progenitor cells (CFUc) in Man by Means of Continuous-Flow Leukapheresis. *Scand J Haematol*, 1980; 24: 22.

146) Carter CS, Leitman SF, Cullis H, et al. Use of a continuous-flow cell separator in density gradient isolation of lymphocytes. *Transfusión*, 1987; 27:362.

147) De la Rubia J, García M, López F, y cols. Recolección de células mononucleares de sangre periférica en hemopatías malignas. *Sangre*, 1991; 36: 89.

148) Blanchette VS, McCombie NE, Rock G. Factors that influence lymphocyte yields in lymphocytapheresis. *Transfusión*, 1985; 25: 242.

149) Archimbaud E, Bailly M, Doré JF. Inducibility of lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with acute myelogenous leukaemia in complete remission and its clinical relevance. *Br J Haematol*, 1991; 77: 328.

150) Trentin L, Pizzolo G, Feruglio C, et al. Functional analysis of cytotoxic cells in patients with acute nonlymphoblastic leukemia in complete remission. *Cancer*, 1989; 64: 667.

151) Adler A, Chervenick PA, Whiteside TL, et al. Interleukin 2 induction of lymphokine-activated killer (LAK) activity in the peripheral blood and bone marrow of acute leukemia patients. I. Feasibility of LAK generation in adult patients with active disease and in Remission. *Blood*, 1988; 71:709.

152) Teichmann JV, Ludwing WD, Seibt-Jung H, Thiel E. Induction of lymphokine-activated killer cells against human leukemia cells in vitro. *Blut*, 1989; 59: 21.

153) Chopra R, Goldstone AH, McMillan AK, et al. Successful treatment of acute myeloid leukemia beyond first remission with autologous bone marrow transplantation using Busulfan / Cyclophosphamide and unpurged marrow: The British Autograft Group Experience. *J Clin Oncol*, 1991; 9: 1840.

154) Mayer RJ. Current chemotherapeutic treatment approaches to the management of previously untreated adults with de novo acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol*, 1987; 14: 384.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal Integrado por los señores presentes
en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de
D. MIGUEL A. ELORZA GUERRERO
titulada OBTENCIÓN DE CELULAS LAS AUTOLOGAS EN ENFERMOS
CON LEUCEMIA AGUDA

excedió exponiendo la siguiente calificación: apto "cum laude" por
unanimidad

Sevilla, 19 de Octubre de 1992

~~El Presidente~~

El Presidente

B. Cabeza

El Vocal

El Vocal

J. U. Vega

El Secretario

M. Argüez

El Vocal

J. J. Alfaro

El Doctorado

Miguel Elorza