



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica



# ROL DE LAS CÉLULAS NK EN EL DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA MEDIADA POR LT CD8 CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES

Tesis presentada para optar por el título de Doctor  
de la Universidad de Buenos Aires en el área Farmacia y Bioquímica

**Bioq. Ximena Lucía Raffo Iraolagoitia**

---

**Directora de tesis:** Dra. Mercedes Beatriz Fuertes

**Consejera de Estudio:** Dra. Silvia Hajos

**Lugar de trabajo:** Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata,  
Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET

**Año:** 2016

## RESUMEN

Si bien las células NK son tradicionalmente estudiadas por sus funciones anti-tumorales, recientes evidencias destacan su rol regulatorio en diferentes modelos. Sin embargo, este rol no fue aún explorado en el contexto de un tumor en crecimiento. En este trabajo de tesis demostramos que las células NK limitan la expansión y activación de LT CD8 anti-tumorales, conduciendo a respuestas de memoria menos eficientes. Luego del desafío con células MC57.SIY, los ratones depletados de células NK, en comparación con los ratones control, presentaron una mayor expansión de LT CD8 anti-SIY junto con un aumento en las funciones efectoras de los LT CD8 y un mayor porcentaje de LT CD8 de memoria efectora. Estos ratones, al ser re-desafiados con células B16.SIY, desarrollaron una respuesta inmune de memoria más eficiente acompañada de un retraso en el crecimiento del tumor secundario. Mecánicamente, encontramos que las células NK activadas en el microambiente tumoral expresan elevados niveles de PD-L1 y, a través de interacciones con PD-1 en las DCs, limitan su maduración, conduciendo a una menor activación de los LT CD8 anti-tumorales. Nuestros resultados sugieren que las células NK pueden tener una actividad regulatoria sobre la inmunidad anti-tumoral, constituyendo un aporte para el diseño de inmunoterapias.

## ABSTRACT

Despite the classical function of NK cells in the elimination of tumors, evidence for a regulatory role for NK cells has been emerging in different models. However, this role has not been fully explored in the context of a growing tumor. In this thesis work, we show that NK cells can limit spontaneous cross-priming of tumor antigen-specific CD8 T cells, leading to reduced memory responses. After challenge with MC57.SIY cells, NK cell-depleted mice exhibited a higher frequency of SIY-specific CD8 T cells, with enhanced effector functions. Depletion of NK cells resulted in a CD8 T cell population skewed towards an effector-memory T phenotype which was associated with enhanced recall responses and delayed tumor growth after a secondary tumor challenge with B16.SIY cells. Mechanistically, we found that tumor-primed NK cells displayed an up-regulated expression of the inhibitory molecule PD-L1 and, through interaction with PD-1 expressed on DC, limited DC activation, explaining their reduced ability to induce tumor-specific CD8 T cell priming. Our results suggest that NK cells can, in certain contexts, have an inhibitory effect on anti-tumor immunity, a finding with implications for immunotherapy in the clinic.

## AGRADECIMIENTOS

Utilizando el motor de búsqueda preferido por todos en internet encuentro que el “*agradecimiento*” es el “*sentimiento de gratitud que se experimenta normalmente como consecuencia de haber recibido de parte de alguien algo que se esperaba o que se necesitaba, de haber sido ayudado en alguna circunstancia difícil, entre otras situaciones*”. Y en todo este camino, pedí y recibí tanto (pero tanto), que ahora “sentimiento de gratitud” simplemente tiene gusto a poco. Suena como a un sentimiento de morondanga (con perdón de la expresión), cuando lo que experimento es realmente mucho más intenso. Con esta introducción, dadas las (o mis) limitaciones del lenguaje, no me queda más que confiar en que me conocen y que saben a qué me refiero cuando les digo gracias:

A Javier, por existir, ser y estar, en una tríada perfecta.

A Merlín, Morgan, Simón, Ryukyu, Toti, Leopoldo, Mishima y Lola, por haber sido o ser (aunque en distintas proporciones) una fuente ronroneante y estrujable de amor incondicional.

A Gabriela y Eugenio, por construir mis cimientos (y sostenerlos). Al Hada Bolita, por su sabiduría ancestral.

A Sarabuela y Pedro, por la incondicionalidad.

A Florencia, Mercedes, Ariana, Victoria y Agustina, a Sara, y a Florenza, por ser mi cable a tierra en las malas y a la estratósfera en las buenas.

A Na/ Lu/ Po/-cho., porque esta tesis tuvo una precuela y, sin ustedes, no la pasaba; o sí, pero qué aburrido hubiese sido.

Y a Florencia Martini, por la confianza, el empuje y la propulsión.

Ahora comienza lo que vendría a representar una suerte de *agradecimiento de platino*. A quienes fueron partícipes directos de este trabajo de tesis, me abrieron las puertas siendo un libro en blanco y, aguantando con una paciencia férrea mis numerosos berrinches, me instruyeron en todos los campos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

*(Suenan trompetas y tambores.)*

A Mercedes, por su optimismo a prueba de todo.

A Norberto, por formar un hermoso grupo de trabajo (y por no ser meteorólogo ni politólogo). A Germán, por ser el mejor hermano mayor laboratoril que me pudo tocar en suerte. A Gabrielle, porque estuvo ahí en el momento justo. A Carolina, por su contención infinita. A Nicolás, por saber qué decir (aunque sea mentira). A Lucas y a Andrea, porque intentaron enseñarme lo que más me cuesta aprender. A Sol, por sus ganas contagiosas. A Romina, por su pragmatismo correctivo. A Jessica, por continuar este legado. Y a Florencia Secchiari, porque llegó a tiempo para ayudarme a cerrar este ciclo.

A Gabriel por las palabras de aquel día y por todo su altruismo. A todo el grupo de trabajo de Inmunopatología, sin repetir y sin soplar: Diego, Marta, Mariana, Karina, Juan Pablo, Ada, Juan K, Nicolino, Rosa, Anabela, Luciano, Sebitas y Florencia, por todas las veces que me rescataron y por los valiosísimos aportes de ideas. En especial: A Tomás, por estar siempre dispuesto a salvar a alguien en apuros. A Santiago, por convertir el IByME en un hogar. A Sebastián, por los principios. Y, a Verónica, por su espontaneidad y por su ¡sí!

Además, no puedo dejar de mencionar a personas que, en distintos ámbitos y de formas impensadas, te facilitan la vida: Gonzalo, Corina, Natalia, Natalia, Bruno, Nicolás, María José, Romina Casco, Florencia Lecolant, Bernarda. En realidad, siendo justa, debería mencionar a todos, pero todos, sin casi excepción, mis compañeros del Complejo Obligado.

Y, finalmente, a todos los geniecillos informáticos que anónimamente democratizan el acceso a la ciencia.

En serio, GRACIAS<sup>∞</sup>.

## TRABAJOS PUBLICADOS

### ***PUBLICACIONES QUE SURGIERON COMO RESULTADO DE ESTE TRABAJO DE TESIS***

- “NK cells restrain spontaneous anti-tumor CD8 T cell priming through PD-1/PD-L1 interactions with dendritic cells”. Ximena L. Raffo Iraolagoitia, Raul G. Spallanzani, Nicolás I. Torres, Andrea Ziblat, Carolina I. Domaica, Jessica M. Sierra, Sol Y. Nuñez, Romina E. Araya, Thomas F. Gajewski, Norberto W. Zwirner and Mercedes B. Fuertes. En revisión, en Journal of Immunology, noviembre 2015.

### ***PUBLICACIONES EN LAS QUE PARTICIPÉ DURANTE EL TRANCURSO DE ESTA TESIS***

- “Expansion of CD11b<sup>(+)</sup>Ly6G<sup>(+)</sup>Ly6C<sup>(int)</sup> cells driven by medroxyprogesterone acetate in mice bearing breast tumors restrains NK cell effector functions”; Spallanzani R.G.; Dalotto-Moreno T.; Raffo Iraolagoitia X.L.; Ziblat A; Domaica C.I.; Avila D.E.; Rossi L.E.; Fuertes M.B.; Battistone M.A.; Rabinovich G.A.; Salatino M.; Zwirner N.W. Cancer Immunology, Immunotherapy 62 (2013) 1781-95.
- “IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness”; Ziblat A.; Domaica C.I.; Raffo Iraolagoitia X.L.; Spallanzani R.G.; Fuertes M.B.; Zwirner N.W. European Journal of Immunology 45 (2015) 192-202.
- “Regulatory Dendritic Cells restrain NK cell IFN- $\gamma$  production through mechanisms involving Nkp46, IL-10 and MHC class I-specific inhibitory receptors”; Raúl G. Spallanzani, Nicolás I. Torres, Damián E. Avila, Andrea Ziblat, Ximena L. Raffo Iraolagoitia, Lucas E. Rossi, Carolina I. Domaica, Mercedes B. Fuertes, Gabriel A. Rabinovich, and Norberto W. Zwirner. Journal of Immunology 195 (2015) 2141-8.

## ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ABREVIATURAS</b> .....   | <b>9</b>  |
| <b>ANTECEDENTES</b> .....   | <b>12</b> |
| ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS .....  | 13        |
| INMUNOLOGÍA TUMORAL: TEORÍA DE LAS 3 E .....  | 14        |
| <i>Eliminación</i> .....  | 16        |
| <i>Equilibrio y Escape</i> .....  | 17        |
| EL ÚLTIMO BASTIÓN .....   | 19        |
| <i>LT CD8</i> .....   | 20        |
| <i>DCs</i> .....  | 25        |
| <i>Células NK</i> .....   | 29        |
| <i>Diálogo recíproco entre DCs y células NK</i> .....   | 33        |
| MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL.....   | 35        |
| <i>Modificaciones en la expresión de proteínas de superficie en las células tumorales</i> ..... | 35        |
| <i>Expansión y reclutamiento de células inmunosupresoras</i> .....                              | 37        |
| <i>Secreción de factores supresores que inhiben la inmunidad anti-tumoral</i> .....             | 38        |
| INMUNOTERAPIAS .....  | 39        |
| <b>OBJETIVOS</b> .....  | <b>43</b> |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>45</b> |
| <i>Líneas celulares y condiciones de cultivo</i> .....  | 46        |
| <i>Ratones</i> .....  | 46        |
| Experimentos in vivo .....  | 47        |
| Desafío con líneas celulares tumorales: .....   | 47        |
| Depleción de LT CD8 .....   | 47        |
| Depleción de células NK.....  | 47        |
| Transferencia adoptiva intratumoral de células NK .....   | 47        |
| Experimentos de re-desafío: .....   | 47        |
| Procesamiento de órganos .....  | 48        |
| <i>Aislamiento de células</i> .....   | 49        |
| Método inmunomagnético.....   | 49        |

|   |           |
|---|-----------|
| Cell sorting .....  | 49        |
| Centrifugación en gradiente de densidad .....   | 49        |
| <i>Ensayo de citotoxicidad in vitro</i> .....   | 50        |
| <i>ELISA</i> .....  | 50        |
| <i>Ensayo de producción de IFN-<math>\gamma</math> ex vivo</i> .....                    | 51        |
| <i>Ensayo de degranulación ex vivo</i> .....  | 51        |
| <i>Obtención de células YAC-1.SIY</i> .....   | 51        |
| Amplificación y purificación del plásmido pL.SIY.EGFP .....                             | 51        |
| Transfección de la línea celular empaquetadora PT-67 con pL.SIY.EGFP .....              | 51        |
| Transducción de las células YAC-1 y aislamiento de células YAC-1.SIY .....              | 52        |
| <i>Ensayo de citotoxicidad frente a LTCD8</i> .....                                     | 52        |
| <i>Extracción de RNA y PCR cuantitativa (q-PCR)</i> .....                               | 52        |
| <i>Evaluación de la inducción de la expresión de PD-L1 in vitro</i> .....               | 53        |
| <i>Maduración de DCs in vitro</i> .....   | 53        |
| <i>Citometría de Flujo</i> .....  | 54        |
| Inmunomarcaciones directas de superficie: .....   | 54        |
| Cuantificación del número absoluto de células: .....                                    | 54        |
| Detección de células viables: .....   | 54        |
| Detección de LT CD8 antígeno-específicos: .....   | 54        |
| Determinación de IFN- .....   | 55        |
| Marcación de FoxP3: .....   | 55        |
| <i>Análisis estadístico</i> .....   | 56        |
| <i>Anticuerpos</i> .....  | 56        |
| <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>58</b> |
| RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL FRENTE AL FIBROSARCOMA MC57.SIY .....                      | 59        |
| <i>El fibrosarcoma MC57.SIY</i> .....   | 59        |
| <i>Células NK frente al fibrosarcoma MC57.SIY: funciones efectoras y fenotipo</i> ..... | 59        |
| <i>Activación espontánea de LT CD8 anti-SIY in vivo</i> .....                           | 63        |
| ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA ACTIVACIÓN ESPONTÁNEA DE LT CD8 ANTI-SIY .....              | 65        |
| <i>Depleción de células NK in vivo</i> .....  | 65        |
| <i>Rol de las células NK sobre la expansión de los LT CD8 anti-SIY</i> .....            | 66        |



|  |            |
|--|------------|
| <i>Rol de las células NK sobre las funciones efectoras de los LT CD8 contra antígenos tumorales</i> .....    | 68         |
| <i>Rol de las células NK sobre el compartimento de memoria de LT</i> .....                                   | 70         |
| <i>Rol de las células NK en la activación espontánea de LT CD8 anti-SIY en otros modelos tumorales</i> ..... | 72         |
| ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL SECUNDARIA.....                                    | 74         |
| MECANISMOS REGULATORIOS MEDIADOS POR CÉLULAS NK .....  | 78         |
| <i>Actividad citotóxica de las células NK sobre los LT CD8</i> .....   | 78         |
| <i>Secreción de factores inmunosupresores</i> .....  | 78         |
| <i>Reclutamiento de células supresoras</i> .....   | 79         |
| <i>Impacto de las células NK sobre las DCs</i> .....   | 80         |
| <i>Eje PD-1/PD-L1</i> .....  | 82         |
| <b>DISCUSIÓN</b> .....   | <b>88</b>  |
| <b>CONCLUSIÓN</b> .....  | <b>104</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....  | <b>107</b> |

## ABREVIATURAS

|  |  |
|--|--|
| Ac: Anticuerpo.  | EDTA: <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (ácido etildiaminotetraacético).  |
| ACK: Buffer Amonio-Cloruro-Potasio.  | ELISA: <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (ensayo inmunoenzimático de adsorción).  |
| ANOVA: <i>Analysis of variance</i> (análisis de la varianza).                                    | Fas: <i>First apoptosis signal</i> (Primera señal de apoptosis).   |
| CAR: <i>Chimeric antigen receptor</i> (receptor antigénico quimérico).                           | FasL: Ligando de Fas.  |
| CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.  | FDA: <i>Food and Drug Administration</i> (Agencia de Alimentos y Medicamentos).  |
| cDNA: <i>Complementary DNA</i> (DNA complementario).   | FGF: <i>Fibroblast growth factor</i> (factor de crecimiento de fibroblastos).  |
| CFSE: <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i> (carboxifluoresceína succinimidil ester).     | FOXP-3: Forkhead box P3.   |
| cGAS: <i>Cyclic GMP-AMP Synthase</i> (Sintasa de GMP-AMP cíclico).                               | Gal-1: Galectina-1.  |
| Cl: Control de isotipo.  | G-CSG: <i>Granulocyte colony-stimulating factor</i> (factor estimulante de colonias de granulocitos).                          |
| CMSPs: Células mononucleares de sangre periférica.   | GDT: Ganglio linfático drenante del tumor.   |
| CPA: Célula presentadora de antígeno.  | GFP: <i>Green fluorescent protein</i> (proteína fluorescente verde).   |
| CTLA-4: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> (Antígeno-4 asociado al Linfocito T Citotóxico). | GM-CSF: <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos). |
| DAMPs: <i>Damage-associated molecular patterns</i> (patrones moleculares asociados a daño).      | GN: Ganglio linfático <i>naive</i> .   |
| DC: <i>Dendritic cell</i> (célula dendrítica).   | GNDT: Ganglio linfático no drenante del tumor.   |
| DNA: <i>Deoxyribonucleic Acid</i> (ácido desoxirribonucleico).                                   | HBV: <i>Hepatitis B virus</i> (virus de la hepatitis B).   |
| dNTPs: Deoxirribonucleótidos.  |  |

HMGB1: *High-mobility group box 1* (proteínas de alta movilidad del grupo B1)

I: *Immunoscore*.

iDC: DC inmadura.

IDO: Indolamina 2,3-dioxigenasa.

IFN: Interferón.

IL: Interleuquina.

ILT-2: *Immunoglobulin-like transcript 2* (transcripto 2 tipo inmunoglobulina).

IT: intratumoral.

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (inmunoreceptores basados en motivos de inhibición ricos en tirosina).

KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* (receptores tipo inmunoglobulina de células NK).

KLRG1: *killer-cell lectin like receptor G1* (receptor de tipo lectina G1 de células citotóxicas).

LB: Linfocitos B.

LCMV: *Lymphocytic choriomeningitis virus* (virus de la coriomeningitis linfocítica).

LPS: Lipopolisacárido.

LT: Linfocitos T.

LY6C: *lymphocyte antigen 6C* (antígeno linfocitario 6C).

M6PR: *Mannose-6-phosphate receptor* (receptor de manosa-6-fosfato).

MC: Memoria central.

MCMV: *Murine cytomegalovirus* (citomegalovirus murino).

M-CSF: *Macrophage colony-stimulating factor* (factor estimulante de colonias de macrófagos).

mDC: DC madura.

MDSC: *Myeloid-derived Suppressor Cell* (célula mielóide supresora).

ME: Memoria efectora.

MFI: *Mean fluorescence intensity* (intensidad de fluorescencia media).

MHC: *Major histocompatibility complex* (Complejo mayor de histocompatibilidad).

NCR: *Natural cytotoxicity receptors* (receptor de citotoxicidad natural).

NK: *Natural Killer* (citotóxicas Naturales).

NKG2D: Natural-killer group 2, member D.

NKG2DL: Ligando de NKG2D.

NLR: *NOD like receptor* (receptores tipo NOD).

OVA: péptido de ovoalbúmina (SIINFEKL).

PAMP: *Pathogen associated molecular pattern* (patrones moleculares asociados a patógenos).

PBS: Phosphate buffered saline (buffer fosfato salino).

PCR: *Polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

PD-1: *Programmed cell death protein 1* (proteína de muerte celular programada 1).

PD-L1: Ligando de PD-1.

PFA: Paraformaldehído.

PGE2: Prostaglandina E-2.

PI: *Phosphoinositide* (fosfoinositol).

P-JAM: *Post-just another method* (post-sólo otro método).

PLGF: *Placental growth factor* (factor de crecimiento placentario).

PRR: *Patern recognition receptor* (receptor de reconocimiento de patrones).

q-PCR: PCR cuantitativa.

RAGE: *Receptor for advanced glycation end products* (receptor de los productos finales de glicación avanzada).

regDC: DC regulatoria.

RLR: *RIG-I like receptor* (receptores de tipo RIG-I).

RNA: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico).

SF: Solución fisiológica.

SFB: Suero fetal bovino.

SIY: Péptido SIYRYYGL.

STING: *Stimulator of interferon genes* (estimulador de genes del IFN).

STO: *Staurosporine* (estaurosporina).

TIGIT: *T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains* (inmunoreceptor de célula T con dominios Ig e ITIM).

TAE: Tris-Acetato-EDTA.

TCR: *T cell receptor* (receptor de célula T).

TGF: *Transforming growth factor* (factor de crecimiento transformante).

Th: *T helper* (colaborador T).

TIM-3: *T-cell immunoglobulin domain and mucin domain 3* (dominio de inmunoglobulina de célula T y dominio de mucina 3).

TLR: *Toll-like receptor* (receptor de tipo Toll)

TMB: Tetra-metil bencidina.

TNF: *Tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral).

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF).

Treg: T regulatoria

VEGFA: *Vascular endothelial growth factor* (factor de crecimiento endotelial vascular).

# ANTECEDENTES

“Si te he mencionado esta cuestión, era para mostrarte que la búsqueda de leyes explicativas, en los hechos naturales, procede por vías tortuosas. (...) Pero hasta el final no podrás saber qué predicados debes introducir en tus razonamientos, y qué otros debes descartar.”

Umberto Eco, *El nombre de la rosa*

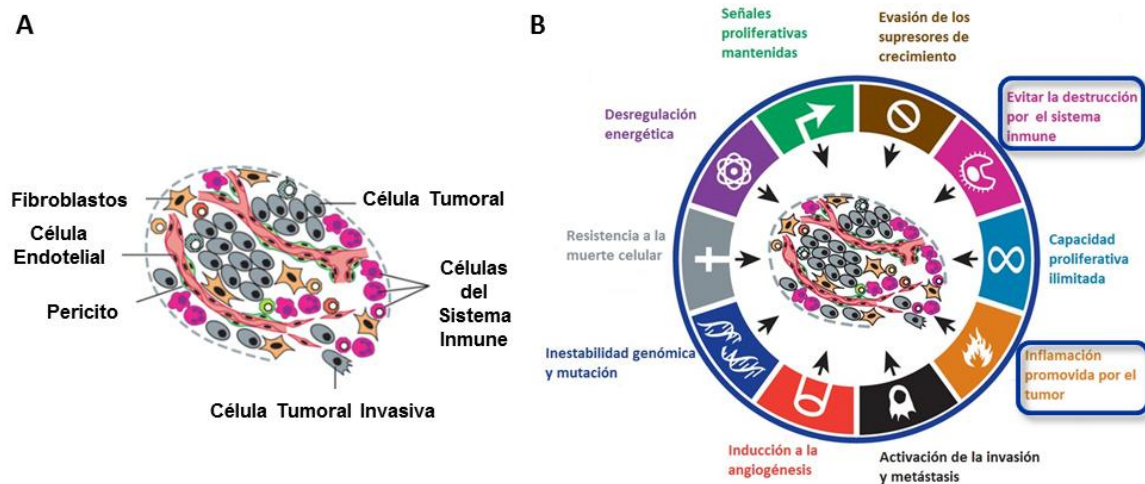
## ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

El cáncer constituye actualmente la segunda causa de muerte a nivel mundial y, además, se estima que en el futuro su incidencia aumentará debido al envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de ciertos factores de riesgo (1). Si bien se denomina *cáncer* a un grupo de más de doscientas enfermedades neoplásicas que son muy heterogéneas, éstas tienen un origen común: la desregulación del ciclo celular.

Existen distintas líneas de evidencia que indican que la tumorigénesis es un proceso conformado por múltiples pasos, cada uno de los cuales genera alteraciones genéticas que conducen a la transformación progresiva de una célula normal en una célula neoplásica. A comienzos de este siglo, D. Hanahan y R. Weinberg, propusieron la existencia de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, presentes en todas las enfermedades neoplásicas: la capacidad proliferativa ilimitada de las células tumorales, facilitada por la presencia de señales proliferativas sostenidas y la evasión de mecanismos supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la capacidad de inducir angiogénesis y, finalmente, la invasión de tejidos distantes creando focos metastásicos (2). En esta revisión no se tuvo en cuenta el sistema inmune y su rol dual en la progresión tumoral como tampoco el rol del estroma tumoral (3,4). Sin embargo, la utilización de nuevas herramientas permitió enriquecer el conocimiento acerca de las propiedades de las enfermedades neoplásicas. Por lo tanto la visión reduccionista del cáncer compuesto únicamente por células tumorales, prevaleciente durante los últimos 50 años, fue abandonada, y ahora éste se concibe como un tejido complejo compuesto por múltiples tipos celulares que conforman el microambiente tumoral (**Figura 1 A**). En este contexto, en la actualización del trabajo de D. Hanahan y R. Weinberg del año 2011, el sistema inmune adquiere protagonismo (**Figura 1 B**) (5).

La respuesta inmune anti-tumoral es el resultado de un complejo proceso dinámico que se establece entre las células tumorales, las células del sistema inmune y las células del estroma que conforman el microambiente tumoral. Los mecanismos a través de los cuales las células de la inmunidad innata detectan la presencia de un tumor no están aún completamente caracterizados, pero sabemos que el sistema inmune es capaz de montar respuestas anti-tumorales y que todas las lesiones neoplásicas presentan en menor o mayor medida un infiltrado inflamatorio compuesto por células

tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (6). El crecimiento de tumores en pacientes inmunocompetentes, por lo tanto, evidencia la existencia de mecanismos tumorales de evasión de la respuesta inmune. Además, la inflamación crónica promovida por el tumor ya establecido puede estimular la angiogénesis, la producción de factores de crecimiento y especies reactivas del oxígeno que favorecen la progresión de la enfermedad (4).



**Figura 1: El cáncer, mucho más que un conjunto de células tumorales.** A) Además de células tumorales, en los tumores hay células endoteliales y pericitos que conforman la vasculatura, fibroblastos y células del sistema inmune. En el microambiente tumoral estas células adquieren características diferentes a las que están presentes en el estroma normal y pueden contribuir a la progresión tumoral. B) Alteraciones de la fisiología celular características del cáncer donde se destaca el rol dual del sistema inmune. Modificado de (5).

Por lo tanto, la profundización del estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune anti-tumoral es de suma importancia ya que representa la base del desarrollo de nuevas inmunoterapias y del estudio de nuevos biomarcadores con utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer (7,8).

### INMUNOLOGÍA TUMORAL: TEORÍA DE LAS 3 E

El sistema inmune cumple diversos roles tanto en la progresión como en la prevención del cáncer. Por un lado, la inflamación crónica generada por el sistema inmune debido a la persistencia de un foco infeccioso puede favorecer la tumorigénesis (9). Por ejemplo, la infección con *Helicobacter pylori* favorece el reclutamiento de células derivadas de la médula ósea que contribuyen a la progresión del cáncer de estómago (10). También se observó que la inflamación crónica asociada a patologías de etiología

autoinmune, como en la enfermedad de Crohn, se asocia con un mayor riesgo de desarrollar carcinoma de colon (11).

Por otro lado, el sistema inmune es capaz de proteger de la aparición de tumores inducidos por virus ya que puede detectar la presencia de infecciones virales y eliminar aquellas células infectadas. Entre estos se encuentran el cáncer de hígado, inducido por el virus de la hepatitis B (HBV) (12); el cáncer cervical, inducido por papilomavirus (13); el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo, inducidos por el virus de Epstein-Barr (14); el sarcoma de Kaposi, inducido por el herpesvirus (15) y la leucemia T en adultos, inducida por el virus linfotrópico humano de células T (16).

Además, la tumorigénesis es generalmente acompañada por la expresión aberrante de proteínas fetales (17) o la expresión de proteínas mutadas, debido a la propia inestabilidad genética que caracteriza a las células tumorales (18,19), lo que resulta en la generación de “antígenos tumorales” que son expuestos al sistema inmune y contra los cuales no existe tolerancia. Esto hace a las células tumorales susceptibles al reconocimiento y eliminación por el sistema inmune, en un proceso conocido como *inmunovigilancia*.

De esta manera, en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune se produce una suerte de selección darwiniana, donde muchas de las células tumorales son destruidas, pero sobreviven preferencialmente aquellas variantes que llevan mutaciones que les proporcionan una ventaja adaptativa, es decir, un aumento en la resistencia al sistema inmune (20).

Teniendo en cuenta tanto la acción protectora sobre el hospedador como la acción modeladora del sistema inmune sobre el tumor en desarrollo, R. Schreiber postuló la hipótesis de *inmunoedición* del cáncer, un refinamiento del concepto de *inmunovigilancia* que tiene una visión más amplia de las interacciones entre el sistema inmune y el tumor. De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de *inmunoedición* del cáncer puede dividirse en tres etapas denominadas: eliminación, equilibrio y escape (3). Cabe destacar que esta división no es fenoménica, y estas etapas no transcurren necesariamente de forma lineal ni unidireccionalmente, más bien se trata de un complejo proceso dinámico donde los distintos mecanismos que se desarrollan a continuación pueden ocurrir en forma simultánea.

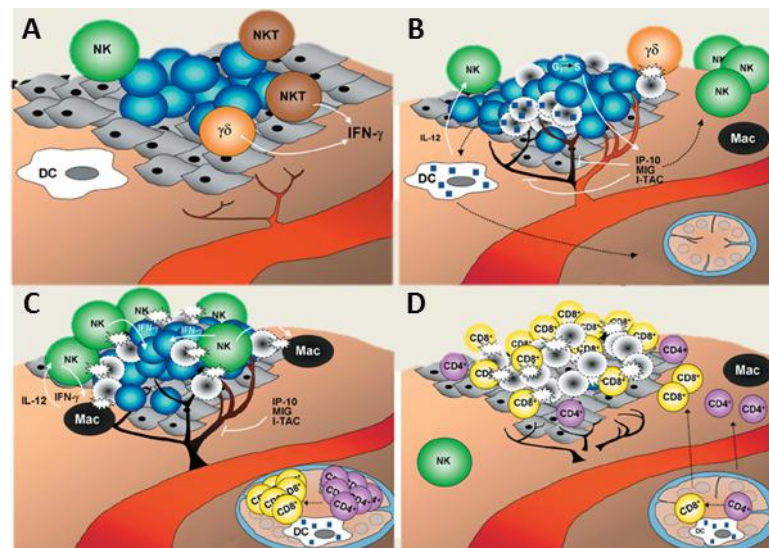


## ELIMINACIÓN

Durante esta primera fase del proceso de inmunoedición, las células del sistema inmune localizan, reconocen y destruyen células neotransformadas, intentando prevenir el desarrollo de un tumor maligno. A pesar de que este proceso nunca ha sido visualizado *in vivo*, existen numerosas evidencias clínicas que indican que la formación de tumores está restringida por la acción conjunta de componentes tanto celulares como humorales de la respuesta inmune innata y adaptativa. Así, se observa un aumento en la incidencia de tumores en pacientes transplantados inmunosuprimidos (21), en pacientes con inmunodeficiencias primarias (22) y en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (23). La utilización de modelos tumorales en ratones *knock out* generados en los últimos años permitió, además, identificar algunas de las moléculas claves de la inmunovigilancia tumoral (24,25). Entre éstas se encuentran los interferones (IFN) de tipo I (26), el IFN- $\gamma$  (27), la perforina (28) y TRAIL (29), subrayando la relevancia de la respuesta citotóxica durante la inmunovigilancia (30).

En primera instancia, las células neotransformadas y del estroma circundante pueden producir señales inflamatorias y expresar moléculas que inducen el reclutamiento y activación de diversas células de la inmunidad innata como macrófagos, células dendríticas (DCs), células *Natural Killer* (NK), células NKT y linfocitos T (LT) con TCR  $\gamma\delta$ , (**Figura 2 A y B**). Los macrófagos poseen gran capacidad fagocítica y, en esta etapa, pueden contribuir a la depuración del incipiente tumor por mecanismos que involucran especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (31). Las células NK, las células NKT y los LT  $\gamma\delta$  reconocen distintas moléculas expresadas por las células neotransformadas y producen diversos mediadores solubles (32-34). Entre éstos se destaca el IFN- $\gamma$  que induce la producción de quemoquinas, como CXCL9, CXCL10 y CXCL11, que reclutan más células del sistema inmune (35). Como consecuencia de la acción del IFN- $\gamma$ , también se produce la muerte de células tumorales y los restos generados pueden ser fagocitados por DCs residentes. Para dar comienzo a la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral, las DCs que fagocitaron restos de células tumorales deben recibir señales de activación en el microambiente tumoral para iniciar su maduración y migrar al ganglio linfático donde presentarán los antígenos derivados de los tumores a LT *naive*.

Aquellos LT que reconozcan esos antígenos se activarán y, según la presencia de distintos factores solubles en el entorno, los LT CD4 se polarizarán dando origen a distintos tipos de perfiles de respuesta inmune. Así, la interleuquina (IL)-12, secretada por las DCs maduras, contribuye a la polarización de los LT CD4 hacia un perfil Th1. Estos LT CD4 se caracterizan por expresar el factor de transcripción T-Bet y secretar IFN- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  (36,37) que, a su vez, facilitan la activación y diferenciación de los LT CD8. Luego, migran al foco tumoral guiados principalmente por CXCL9 y CXCL10 (**Figura 2 C y D**) (38), donde los LT CD8 destruyen a las células tumorales que expresan el antígeno tumoral reconocido por su TCR y secretan IFN- $\gamma$  (junto con las células NK y los LT CD4), lo que contribuye a la eliminación de las células tumorales (39).



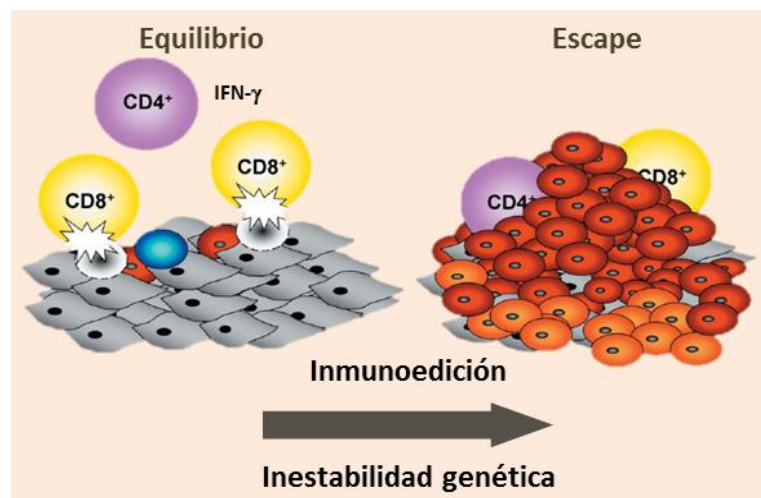
**Figura 2: Fases del proceso de eliminación.** A) Activación de las células de la inmunidad innata residentes al reconocer células tumorales. B) Reclutamiento de células NK y DCs. C) Presentación de antígenos tumorales en el ganglio linfático drenante del tumor. D) Reclutamiento de LT al foco tumoral. Modificado de (24).

Si este proceso de eliminación resulta exitoso, el tumor es erradicado sin progresar a las fases siguientes. Sin embargo, mientras persistan células tumorales, puede iniciarse la fase de equilibrio.

### **EQUILIBRIO Y ESCAPE**

Los tumores que no son eliminados en su totalidad pueden ser mantenidos en un estado latente durante prolongados períodos de tiempo, en un equilibrio dinámico generado como resultado de la proliferación sostenida de las células tumorales,

contrarrestada por la actividad citotóxica y citostática del sistema inmune. En modelos murinos se observó que, en esta etapa, la restricción del crecimiento tumoral es dependiente de IL-12, de IFN- $\gamma$  y de los LT, pero no de las células NK (40). Las células tumorales en esta fase aún son inmunogénicas pero, dada la inestabilidad genética que caracteriza a los tumores, incorporan progresivamente mutaciones y cambios epigenéticos aleatorios que, eventualmente, conducen al surgimiento de clones menos inmunogénicos. Al no ser reconocidos por el sistema inmune, estos clones son seleccionados; ahora pueden proliferar sin las restricciones de las primeras etapas, estableciendo un microambiente con las características propias de un sitio inmunoprivilegiado y, finalmente, pueden entrar en la fase de escape, donde suelen comenzar los signos clínicos de la enfermedad (**Figura 3**) (3,41). En la fase de escape, el sistema inmune es finalmente “dominado” por el tumor y las células que en las etapas previas colaboraban con la erradicación de las células tumorales, pueden adquirir incluso propiedades regulatorias que contribuyen a crear un microambiente inmunosupresor(42).



**Figura 3: Las fases de equilibrio y escape en la *inmunooedición* del cáncer.** Durante la fase de equilibrio la inestabilidad genética que caracteriza a las células tumorales permite la aparición de clones con capacidad de evadir la respuesta inmune, por lo que son seleccionados en un proceso que se denomina *inmunooedición*. Dichos clones, resistentes al sistema inmune, son los que alcanzarán la fase de escape. Modificado de (24).

El tumor podrá crecer exponencialmente en tanto los requerimientos de nutrientes y oxígeno no superen la capacidad de la vasculatura existente. Cuando esto ocurre, se genera una condición de isquemia en el tejido que induce la expresión de factores activadores de la angiogénesis como FGF, VEGFA, VEGFC, VEGFD, PLGF, entre los

cuales VEGFA es el más ubicuo entre los tumores. A medida que aumenta la hipoxia en el tejido, aumenta la secreción de VEGFA generando un desbalance entre los factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos que determina el *switch* de la célula endotelial de un estado quiescente a uno angiogénico. El *switch* angiogénico permite que la formación de vasos sanguíneos acompañe el crecimiento del tumor promoviendo su desarrollo (43). Los pericitos, que en la vasculatura normal se encuentran en estrecho contacto con el endotelio, son menos abundantes en la vasculatura tumoral y pueden ser reemplazados por células tumorales (44). De esta manera, se facilita el acceso de las células tumorales a la vasculatura, a través de la cual son capaces de colonizar nichos distantes dando origen a focos metastásicos donde el sistema inmune ejerce escaso control sobre el crecimiento tumoral.

#### EL ÚLTIMO BASTIÓN

A pesar de que los tumores que se detectan en la clínica están fuertemente inmunoevitados y en la fase de escape, es importante destacar que el infiltrado de LT CD8 tiene un valor pronóstico positivo. Se ha demostrado que la evaluación de la presencia de LT CD8 y, particularmente, de LT CD8 de memoria en el tumor provee un método para estimar el riesgo de recidiva y de muerte (8). En un estudio realizado en una cohorte de más de 600 pacientes con cáncer colorectal en estadios tempranos, se evaluó la densidad de LT CD8 y de LT CD8 de memoria en el centro y en el margen del tumor por inmunohistoquímica. Utilizando estos parámetros se calculó un *immunoscore* (I) y se estratificó a los pacientes en un *immunoscore* entre 0 y 4, donde un I=0 corresponde a muestras con baja densidad de LT CD8 y LT CD8 de memoria y un I=4, a muestras con alta densidad de LT CD8 y LT CD8 de memoria tanto en centro como en el margen del tumor. Se observó que la incidencia de recidiva a 5 años sólo fue del 4,8% de los pacientes con I=4, pero fue del 72% en los pacientes de I=0-1 (45). Se encontraron resultados similares en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (46,47) y con hepatocarcinoma (48). Esta evidencia clínica sugiere que incluso en tumores clínicamente detectables, y por lo tanto en la fase de escape, aún existen células que conservan cierta actividad anti-tumoral y, además, le otorga a los LT CD8 un rol primordial en la respuesta inmune anti-tumoral.

Por lo tanto, a continuación, profundizaremos en el marco teórico que sustenta nuestro conocimiento sobre la biología de los LT CD8; de las DCs, cruciales para iniciar la respuesta de los LT CD8, y también de las células NK, que comparten funciones efectoras con los LT CD8 y, además, modulan la actividad de las DCs.

### **LT CD8**

Los LT CD8 son células de la inmunidad adaptativa y, como tales, reconocen antígenos específicos. Una vez activados, mediarán la destrucción de células *target* gracias a su capacidad citotóxica y de secretar IFN- $\gamma$ . La capacidad del sistema inmune adaptativo de ignorar los antígenos propios y generar una respuesta específica frente a antígenos extraños, como los antígenos tumorales, radica fundamentalmente en la ontogenia de los LT. Gracias al proceso de recombinación somática al que están sometidos los genes que codifican para el TCR, los LT son capaces de reconocer una amplísima variedad de antígenos peptídicos presentados en el contexto de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Durante su desarrollo, los LT inmaduros son seleccionadas en base a su capacidad de interactuar débilmente con antígenos propios expresados en el timo, dando lugar a un repertorio estimado de 100 millones de LT CD8 *naive* diferentes, cada uno con una especificidad propia. El corolario evidente que se desprende del inmenso número de clones posibles es que cada clon está representado en una bajísima frecuencia; matemáticamente, se calcula que no superan, en total, las 200 células (49,50). Este pequeñísimo número de células está distribuido en todo el organismo y circula diariamente atravesando los distintos órganos linfoides secundarios, recibiendo señales de supervivencia mediante las interacciones débiles que establece a través de su TCR.

Los LT CD8 *naive* expresan elevados niveles de CD62L (L-selectina) y de CCR7 lo que facilita la entrada a los órganos linfoides secundarios guiados por las quemoquinas CCL19 y CCL21. Cuando eventualmente, a través de su TCR, detectan a su antígeno específico en el contexto de moléculas del MHC de clase I en una célula presentadora de antígeno (CPA), se genera la 1ª señal de activación; si esta se produce en ausencia de una 2ª señal dada por el reconocimiento de moléculas coestimuladoras a través de CD28, la célula entra en un estado de anergia. Si el LT CD8 *naive*, en cambio, recibe las dos

señales, se activará y atravesará un proceso de expansión clonal aumentando su número inicial hasta 100000 veces (49), diferenciándose tanto en células efectoras como de memoria. Recientemente se ha demostrado que la progenie de un único LT CD8 *naive* puede, independientemente de su avidéz y del sitio de activación, dar origen tanto a células efectoras como a células de memoria que se distribuirán por todos los órganos linfoides secundarios (51). Para lograr su máxima expansión *in vivo*, los LT CD8, además de recibir las dos señales mencionadas, necesitan ser estimulados por citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- $\alpha/\beta$  (52). Mientras que, para diferenciarse en células efectoras funcionales y células de memoria capaces de generar una respuesta secundaria efectiva, la señal clave es provista por IL-2 (53).

En los LT CD8 activados, se produce una disminución en la expresión de CD62L y de CCR7 junto con un aumento en la expresión CXCR3, lo que les permite entrar a los tejidos periféricos inflamados y “comprometerse” como células efectoras (54). Estos LT CD8 efectores adquieren capacidad citotóxica, lo que les permite eliminar aquellas células que presenten el antígeno específico en sus moléculas del MHC de clase I (55). Si bien en este punto ya no requieren una 2<sup>a</sup> señal provista por moléculas coestimuladoras, para que se produzca la sinapsis inmunológica es necesaria la interacción entre distintas moléculas de adhesión, como CD103 o LFA-1, con la célula *target* (56).

La citotoxicidad puede ser llevada a cabo a través de dos mecanismos diferentes: la vía secretoria y la vía de receptores de muerte celular. La vía secretoria involucra el establecimiento de una sinapsis inmunológica con la célula *target*, la polarización de los gránulos citotóxicos hacia el sitio de contacto entre ambas células y la liberación del contenido de los gránulos en la sinapsis inmunológica. Los gránulos citotóxicos contienen diferentes componentes que inducen la muerte de las células *target*. Entre ellos, los más relevantes son la perforina (proteína desestabilizante de membrana) y las granzimas (serinproteasas capaces de activar caspasas) (57). La internalización de estos componentes conduce a la formación de una vacuola de pH ácido, induciendo la activación de las perforinas que ejercen efectos desestabilizantes sobre la membrana de la vacuola endocítica y permitiendo que la granzima B acceda al citosol de la célula *target* y active el sistema de caspasas que inducen la muerte por apoptosis (58). En la membrana de los gránulos se encuentra la proteína LAMP-1 (CD107a) que, una vez que

ocurrió la degranulación, pasa a formar parte de la membrana celular, convirtiéndose en un marcador muy útil de la actividad citotóxica (59).

En el segundo mecanismo de citotoxicidad, la vía de receptores de muerte celular, participan miembros de la familia del TNF tales como el ligando de Fas (FasL) (60) y TRAIL(61).

Los LT CD8 activados no solo son capaces de ejercer citotoxicidad, sino que también pueden producir citoquinas tales como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . El IFN- $\gamma$  es fundamental en la defensa contra patógenos intracelulares y en la inmunidad anti-tumoral, ya que favorece el procesamiento y presentación de antígenos en moléculas del MHC de clase I. Además, favorece la generación de respuestas pro-inflamatorias ya que, por un lado, promueve la diferenciación de macrófagos hacia un perfil M1 y, por otro, induce un aumento en la producción de IL-12 por las DCs perfilando la respuesta de los LT CD4 *naive* hacia un perfil de tipo Th1 (62). En el contexto de un tumor, el IFN- $\gamma$  es capaz de actuar directamente sobre las células tumorales, provocando la muerte por arresto del ciclo celular (63) y por apoptosis (64) y, adicionalmente, aumentando su inmunogenicidad, debido a la inducción de la expresión de moléculas del MHC de clase I (65). Además, fue observado que la sensibilidad al IFN- $\gamma$  por parte de las células tumorales es un requisito para el desarrollo de una respuesta antitumoral eficiente y que dicha respuesta depende de la presencia de LT (27).

Si bien el TNF- $\alpha$  también es una potente citoquina pro-inflamatoria, durante procesos de inflamación crónica su secreción está frecuentemente desregulada contribuyendo a la patogenia, por lo que en cáncer se le atribuye un rol dual (66).

Además de las funciones clásicas descritas, recientemente se ha reportado un rol regulatorio de los LT CD8 efectores previniendo la injuria tisular a través de la secreción de la citoquina inmunosupresora IL-10, utilizando modelos de infecciones virales que afectan el tracto respiratorio (67) y el sistema nervioso central (68). Es importante destacar que, aunque la producción de IL-10 por parte de los LT CD8 efectores en los tejidos inflamados tiene un efecto supresor, ya que inhibe la proliferación de los LT, ésta representa un estado transiente y reversible, que evita el daño tisular colateral sin afectar la capacidad citotóxica ni la producción de citoquinas inflamatorias de los LT CD8 (68). Por otro lado, estudios *in vitro* demostraron que los LT CD8 aislados de tumores de ratones

son capaces de secretar IL-10 al ser estimulados en condiciones de hipoxia (69) y, en pacientes con cáncer nasofaríngeo, se detectaron LT CD8 FoxP3<sup>+</sup> productores de IL-10 con capacidad inmunosupresora *in vitro*; sin embargo, aún no se conoce su significado clínico (70).

Luego de la fase de activación de los LT, se produce una fase de contracción. Entre el 90 y el 95% de las células que fueron expandidas entrará en apoptosis, mientras que entre el 5 y el 10% perdurará como células de memoria y serán capaces de responder rápidamente frente a un segundo encuentro con el antígeno. Sorprendentemente, el comienzo y la duración de esta fase son independientes de la magnitud de la expansión, de la naturaleza del antígeno o su cantidad, y del tiempo de exposición, indicando que son eventos tempranos los que determinan la fase de contracción (71). Sin embargo, si el estímulo antigénico perdura, las células de memoria generadas adquieren características de células exhaustas y no son capaces de responder al antígeno persistente. Los LT CD8 exhaustos fueron inicialmente identificados durante infecciones crónicas de ratón y luego también fueron observados en pacientes humanos con cáncer. Particularmente, en cáncer existen muchos factores extrínsecos potencialmente involucrados en el agotamiento de los LT CD8 como citoquinas inmunosupresoras, células infiltrantes con propiedades regulatorias y las propias células tumorales (72). Los LT CD8 exhaustos se caracterizan por expresar elevados niveles de receptores inhibitorios, como PD-1, TIM-3 y CTLA-4, y por presentar una capacidad disminuida de secretar citoquinas y de eliminar células *target*. Además, presentan una disminución en la expresión de los receptores de IL-15 y de IL-7 afectando su capacidad de recibir señales de supervivencia (73). Este proceso conduce a la alteración del patrón de inmunodominancia que se había generado durante la fase de activación, pudiéndose incluso perder la capacidad de responder frente a alguno de los epitopes si se delecta un clon que recibió un estímulo crónico (74,75).

Los factores que regulan la fase de contracción no están totalmente caracterizados. Sin embargo, se postuló que la deprivación de citoquinas generada debido a la competencia por estos recursos limitados entre las células expandidas podría ser la causa primaria de la muerte de los LT CD8 durante esta fase (76). Otra hipótesis se basa en la observación de que las células precursoras de memoria (caracterizadas con el fenotipo CD127<sup>+</sup>KLRG1<sup>-</sup>) son detectables ya en el pico de la expansión implicando que el



“destino” de la célula ya está determinado antes de la fase de contracción (77). Otros estudios mostraron que la muerte de los LT CD8 es independiente de caspasas (78) y que tampoco puede ser evitada mediante la sobre-expresión de las proteínas anti-apoptóticas bcl-2 ni bcl-xl (79), pero sí depende de expresión de la proteína pro-apoptótica bim (80). Un trabajo reciente muestra que la contracción de la población de LT CD8 efectores se debe a que los LT regulatorios (células T<sub>reg</sub>) eliminan selectivamente a los LT CD8 que expresan el receptor de manosa-6-fosfato (M6P) pero no así a los LT CD8 M6P<sup>-</sup>, y que esta última subpoblación corresponde a la de memoria (81). Sin embargo, este trabajo no explora cuáles son los factores que determinan que un determinado LT CD8 exprese o no dicho receptor.

Los LT CD8 de memoria expresan el marcador CD44 y se subdividen en dos poblaciones: memoria efectora (LT CD8<sub>ME</sub>, CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) y memoria central (LT CD8<sub>MC</sub>, CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>). Los LT CD8<sub>ME</sub> debido a la ausencia de expresión de CD62L y CCR7 se distribuyen preferencialmente en los tejidos no linfoides y tienen un alto potencial citotóxico ante un segundo encuentro con su antígeno, actuando como centinelas al brindar protección inmediata frente a un nuevo desafío en la periferia. Los LT CD8<sub>MC</sub>, en cambio, se concentran en los tejidos linfoides secundarios y tienen gran capacidad proliferativa, pudiendo generar nuevos LT CD8 efectores si existiera un desafío sistémico (82,83). El aporte relativo de estas dos poblaciones celulares en la respuesta inmune secundaria es un tema de extenso debate y muchos reportes jerarquizan la respuesta de los LT CD8<sub>MC</sub> en base a su mayor potencial proliferativo (75,84,85). En cáncer, hay evidencias que demuestran el rol protector de ambas poblaciones (86). Sin embargo, se basan en experimentos de transferencia adoptiva que no permiten estudiar el desarrollo de la respuesta inmune secundaria espontánea. Un estudio clínico sobre 959 resecciones de tumores de colon, mediante la determinación de la presencia de diferentes células del infiltrado, reveló que el infiltrado de LT CD8<sub>ME</sub> correlaciona con una mayor supervivencia y un menor grado histológico del tumor y riesgo de metástasis (87)

De esta manera, considerando la capacidad de reconocer específicamente células tumorales, sus funciones efectoras y la posibilidad de diferenciarse en células de memoria, los LT CD8 se presentan como las células protagónicas de la inmunidad anti-

tumoral. Sin embargo, todas estas propiedades están supeditadas a su activación por las CPA, en particular las DCs.

### **DCs**

Las DCs son un grupo especializado de CPA, fundamentales para la activación de los LT *naïve*. Poseen gran plasticidad funcional y juegan un papel crucial como “intérpretes” de las señales del entorno, lo que les permite definir el perfil de la respuesta inmune adaptativa, siendo capaces tanto de promoverla como de inhibirla (88). Las DCs presentan funciones específicas muy diferentes según su estado de maduración. Las DCs inmaduras (iDCs) tienen alto potencial endocítico e incorporan, procesan y presentan diversos antígenos, incluyendo antígenos tumorales (89). La endocitosis de antígenos solubles puede ser inespecífica, a través del mecanismo de macropinocitosis, pero también puede ser específica, ya que estas células cuentan con un repertorio de receptores endocíticos. Entre estos receptores se destacan CD16, que detecta inmunocomplejos; receptores de lectinas de tipo C, que permiten reconocer antígenos glicosilados, y CD36 que, mediante el reconocimiento de fosfolípidos oxidados, participa en la internalización de células apoptóticas promoviendo la inflamación estéril (90,91).

Las DCs son capaces de detectar la presencia de infecciones y procesos inflamatorios en los tejidos debido a que expresan receptores de reconocimiento de patrones (PRR, *Pattern Recognition Receptor*) que permiten detectar patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Pattern*) y patrones moleculares asociados a daño (DAMPs, *Damage-Associated Molecular Pattern*). Entre los PRR se destacan los receptores de tipo *toll* (TLR), compuestos por una familia de proteínas transmembrana localizadas en la superficie celular o en endosomas; los receptores tipo NOD (NLRs) de localización citoplasmática; los receptores de tipo RIG-I (RLRs), que reconocen RNA viral, y los ya mencionados receptores de lectinas de tipo C, entre otros. El reconocimiento a través de cualquier PRR induce la maduración y la activación de las DCs; sin embargo, cada PRR desencadena la activación de distintas vías de señalización específicas en las DCs, induciendo la producción de distintos patrones de mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas), lo que permite el perfilado diferencial de la respuesta inmune adaptativa.

Los PAMPs son estructuras moleculares conservadas en distintos grupos de patógenos (como LPS, DNA bacteriano, RNA de doble cadena, flagelina, etc) y sus receptores están bien caracterizados. Por otro lado, los DAMPs son moléculas que normalmente tienen localización intracelular y, por lo tanto, están “ocultas” para las DCs pero, cuando la célula muere, pueden ser liberadas al medio extracelular actuando como adyuvantes endógenos de la respuesta inmune (92). Si bien fueron descritas numerosas moléculas que actúan como DAMPs, entre las que se encuentran HMGB1, proteínas de shock térmico, ácido úrico, ATP, DNA de doble cadena, proteínas glicadas, heparán sulfato y péptidos formilados, sus receptores no están completamente caracterizados. Algunas de estas moléculas activan TLRs y NLRs, compartiendo las vías de señalización con PAMPs, y otras son reconocidas por receptores específicos de DAMPs, como RAGE (receptor de productos finales de glicosilación avanzada) y cGAS, que activa la vía de STING al reconocer DNA citoplasmático (93-96).

Una vez que las DCs reconocen estructuras a través de sus PRR, comienza su maduración con un cambio en el patrón de expresión de sus receptores de quemoquinas, disminuyendo la expresión de los que las atrajeron a los tejidos, como CCR1, CCR5 y CCR6, así como de la molécula de adhesión E-cadherina que las mantiene ancladas a la epidermis. Asimismo, comienzan a expresar CCR7, lo que las hace sensibles a las quemoquinas CCL21 y CCL19 que las guían, primero, hacia los vasos linfáticos aferentes y, luego, a través de los órganos linfáticos secundarios donde se producirá el encuentro con los LT *naive* que también expresan CCR7. Durante esta migración se completa la maduración de las DCs, que disminuyen su capacidad fagocítica e incrementan los niveles de expresión de moléculas relacionadas con la presentación antigénica, como las moléculas del MHC de clase I y de clase II y moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, lo que les permitirá activar a los LT *naive* en el ganglio.

Además de las vías clásicas de presentación de antígeno, la vía exógena o endocítica y la vía endógena o biosintética, existen mecanismos adicionales que permiten que estas vías se crucen. Mediante el fenómeno de *presentación cruzada*, los antígenos exógenos endocitados son transportados al citosol, procesados en el proteasoma y presentados en moléculas del MHC de clase I. De esta forma, la presentación cruzada

representa un mecanismo fundamental para la activación de LT CD8 específicos contra antígenos virales y tumorales (97).

Se han descrito diversos factores que modulan la capacidad de las DCs de realizar presentación cruzada: la naturaleza del antígeno, la presencia de factores estimulatorios y, también, la fase de la respuesta inmune (90). Frente a infecciones virales, las DCs cuentan con un vasto repertorio de receptores que les permite endocitar partículas virales y otros tantos receptores de PAMPs, que facilitan su activación. Además, los IFN- $\alpha/\beta$  producidos por las células infectadas por virus estimulan toda la maquinaria responsable de la presentación cruzada de antígenos (98). Entre las distintas subpoblaciones de DCs conocidas, las DCs CD8 $\alpha^+$  constituyen la subpoblación especializada en la presentación cruzada de antígenos necesaria para la activación de LT CD8 en el contexto de una infección viral (99).

El microambiente tumoral, por otro lado, representa una matriz muy compleja y aún no se comprende del todo cómo, ante la ausencia de estímulos inflamógenos exógenos, las iDCs pueden activarse y orquestar una respuesta inmune anti-tumoral espontánea. En este contexto, toma particular importancia el reconocimiento de los DAMPs, entre los cuales el DNA derivado del tumor parece ser el más relevante. Aunque aún no se conoce cómo el DNA endocitado alcanza el citosol de las DCs, recientemente se demostró en modelos murinos que las DCs, son capaces de detectar DNA derivado del tumor a través de cGAS, lo que activa la vía de STING e induce la producción de IFN- $\beta$  (100). Luego, el IFN- $\beta$  actúa sobre las DC CD8 $\alpha^+$  facilitando la presentación cruzada y la activación de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales (26,101). Adicionalmente, diversas terapias antitumorales convencionales son capaces de potenciar la respuesta inmune anti-tumoral. De hecho, la activación de la vía de STING y la producción subsecuente de IFN- $\beta$  contribuye a la eliminación de los tumores inducida por radiación (102). Por otra parte, se encontró que las células tumorales necróticas que se generan como resultado de la quimioterapia liberan HMGB1, que es capaz de activar DCs a través de TLR4 (103).

Sin embargo, los tumores no solo inducen la activación y la maduración de las DCs, sino que también pueden inhibir su funcionalidad a través de distintos mecanismos. Diversos factores presentes en los tumores, como óxido nítrico, gangliósidos e IL-10,

conducen a la apoptosis de las DCs (104,105). Recientemente se ha demostrado que la expresión de PD-1 juega un rol importante en la apoptosis de DCs maduras (mDCs) (106) y, teniendo en cuenta que diversos tumores expresan PD-L1, este mecanismo podría ser relevante en el microambiente tumoral. De esta forma, la inducción de la muerte en las mDCs limitaría su capacidad de orquestar una respuesta inmune anti-tumoral efectiva.

Adicionalmente, la maduración de las DCs puede estar inhibida en el microambiente tumoral, favoreciendo la acumulación de iDCs. En las últimas décadas, numerosos grupos describieron en distintos estudios los alcances de este fenómeno. En pacientes con cáncer de colon (107), cuello de útero (108), pulmón (109), hígado (110) y mama (111), se ha encontrado que las DCs expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras. En algunos casos no sólo presentan un fenotipo alterado, sino también pueden estar afectadas la producción de IL-12, la capacidad endocítica y la maquinaria de presentación antigénica (89).

La apoptosis y la inhibición de la maduración de las DCs intratumorales no son suficientes para justificar la capacidad inmunosupresora que pueden presentar activamente en algunos modelos tumorales. Muchos factores presentes en el microambiente tumoral pueden promover la activación de STAT3 en las DCs como IL-10, IL-6, TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 (PGE2) y Galectina-1 (Gal-1) induciendo su diferenciación a DCs regulatorias (regDCs) (112-115). Las regDCs, a través de la secreción de IL-10, TGF- $\beta$ , indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y arginasa, no sólo suprimen las funciones efectoras de los LT, sino que inducen el reclutamiento y la expansión de células T<sub>reg</sub>, contribuyendo al escape tumoral (112).

Así vemos que las DCs, gracias su gran plasticidad funcional, adquieren un rol central en la inmunología tumoral. Por un lado, son esenciales para la puesta en marcha de la respuesta adaptativa anti-tumoral, pero también pueden ser responsables de generar tolerancia frente al tumor en crecimiento.

Finalmente, no se puede terminar de comprender la fisiología de las DCs sin aludir a las células NK. En los últimos años se descubrió que las células NK juegan un rol crucial en la “edición de las DCs”, que consiste tanto en la inducción de la muerte de las iDCs como la inducción de su activación y la modulación de su maduración (116).

## CÉLULAS NK

Las células NK son células linfoides de la inmunidad innata que constituyen la primera línea de defensa contra células tumorales y células infectadas con patógenos intracelulares. En ratones, las células NK pueden ser identificadas como células CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> y, en humanos, se definen como células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> y se subclasifican en dos grupos según la expresión de CD56. La mayoría de las células NK circulantes presentan baja expresión de este marcador (CD56<sup>dim</sup>), mientras que la subpoblación minoritaria de células NK de sangre periférica expresa altos niveles de CD56 (CD56<sup>bright</sup>) y reside predominantemente en los órganos linfoides secundarios.

Entre las funciones efectoras de las células NK, al igual que los LT CD8, se destacan su actividad citotóxica y su capacidad de producir citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , entre otras (117). Pero las células NK, a diferencia de los LT, no requieren ser previamente activadas por una CPA para adquirir sus funciones efectoras, por lo que se sitúan en la “primera línea de defensa” frente a los patógenos intracelulares y células tumorales, siendo la principal fuente de IFN- $\gamma$  durante las primeras fases de la respuesta inmune(118).

Los mecanismos de citotoxicidad también involucran a la vía secretoria y a la vía de receptores de muerte celular. Las células NK en reposo almacenan FasL en sus endosomas, que se transloca a la superficie celular cuando son activadas (119). La expresión de TRAIL también es inducible y, mediante experimentos *in vivo*, se demostró que su inducción, mediada por IFN- $\gamma$  en las células NK, contribuye a la prevención del crecimiento de tumores primarios y de la diseminación de metástasis experimentales (120). Respecto a la vía secretoria, a diferencia de lo que sucede en los LT CD8, las células NK expresan constitutivamente granzimas y perforinas (121); sin embargo, gracias a que la exocitosis de sus lisosomas es un proceso finamente regulado y altamente ordenado, no eliminan células de manera “indiscriminada” (122).

El estado de activación de las células NK depende del balance de la actividad de quinasas y fosfatasa que resulta de la integración de las señales recibidas a través de sus múltiples receptores, tanto activadores como inhibitorios. La actividad de las células NK se encuentra normalmente restringida por receptores que median señales inhibitorias y reclutan y activan a la tirosina-fosfatasa SHP-1 a través de sus dominios citosólicos ITIM.

Los receptores inhibitorios más estudiados son los KIR en humanos, ILT-2 y la familia Ly49 en ratones, y los heterodímeros CD94/NKG2A en ambas especies (123-126). Estos receptores reconocen generalmente moléculas del MHC de clase I que están presentes constitutivamente en la mayoría de las células normales, pero su expresión puede disminuir en condiciones de estrés celular.

Sin embargo, las células NK pueden activarse rápidamente, tanto por la acción de citoquinas inflamatorias como por el contacto con células *target* que hayan perdido la expresión de moléculas de MHC de clase I o que expresen ligandos reconocidos por sus receptores activadores (127). Entre los receptores estimuladores, el mejor caracterizado es NKG2D, que se expresa constitutivamente en las células NK. NKG2D reconoce a las proteínas MICA/B y ULBPs en humanos y RAE-1, H60 y MULT-1 en células murinas, que son inducidas por estrés en las células tumorales (128) y en células infectadas con virus u otros patógenos intracelulares (129). La interacción entre NKG2D y sus ligandos induce la fosforilación de la proteína adaptadora DAP10 y la consecuente activación de los circuitos de señalización de la PI3-quinasa que llevan a la activación de las células NK y la degranulación (130). Otros receptores activadores relevantes para el reconocimiento de células tumorales son los NCRs (34) como NKp30 (131) y NKp46 (132), de expresión constitutiva, y NKp44 (133), que únicamente se expresa en las células NK activadas. Además, las células NK expresan CD16, el cual reconoce la región Fc de la IgG y les permite mediar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). De esta manera, a través de la sumatoria de los múltiples estímulos que recibe del entorno, las células NK pueden tener actividad citotóxica frente a sus *targets* evitando al mismo tiempo afectar las células normales.

Las células NK de ratón atraviesan un programa de maduración en cuatro etapas, que se diferencian según los niveles de expresión de CD11b y CD27. En la primera etapa, expresan bajos niveles de ambos marcadores (CD11b<sup>low</sup>CD27<sup>low</sup>); luego, se produce un aumento en la expresión de CD27 (CD11b<sup>low</sup>CD27<sup>high</sup>), seguido por un aumento de CD11b (CD11b<sup>high</sup>CD27<sup>high</sup>) y, en el estadio terminal, disminuye la expresión de CD27 (CD11b<sup>high</sup>CD27<sup>low</sup>). En su estadio inicial, las células NK presentan gran potencial proliferativo y mínimas funciones efectoras que comienzan a adquirir a medida que maduran y, paralelamente, disminuyen la capacidad de proliferar. En su estadio terminal,

las células NK tienen características de células exhaustas, pierden sus funciones efectoras y son muy susceptibles a la apoptosis espontánea (134). A su vez, las células NK CD11b<sup>+</sup> pueden dividirse en dos subpoblaciones de acuerdo a la expresión de Ly6C: las células Ly6C<sup>low</sup> son activas, mientras que las Ly6C<sup>high</sup> se encuentran en estado de reposo (135). Recientes estudios identificaron al receptor inhibitorio KLRG1 como un marcador de maduración de las células NK que se expresa sólo en las células NK CD11b<sup>high</sup>CD27<sup>low</sup>. Las células NK KLRG1<sup>+</sup> se acumulan en ratones que atravesaron una expansión numérica de células NK, como por ejemplo durante la infección con el citomegalovirus murino (MCMV) (136), debido a la proliferación homeostática (137) o por estimulación crónica con IL-15 (138). KLRG1 reconoce distintas cadherinas y a través de su interacción con estos ligandos inhibe la actividad citotóxica de las células NK (139). De esta manera, la expresión de KLRG1 en las células NK terminalmente diferenciadas cumpliría un importante rol homeostático y explicaría, en parte, por qué estas células presentan una disminución en sus funciones efectoras.

Existen múltiples reportes que muestran el rol crucial de las células NK en la eliminación de células tumorales (140-142). La evidencia más importante de este rol en humanos es un estudio a largo plazo, donde se demostró que individuos con baja actividad citotóxica en sus células NK presentan un riesgo significativamente mayor de padecer cáncer en comparación con aquellos individuos con mediana o alta actividad (143). Sin embargo, una vez que el tumor entra en la fase de equilibrio y escape, el rol de las células NK no está totalmente elucidado. Recientemente el laboratorio de R. Schreiber desarrolló un modelo murino que permite el estudio de tumores en la fase de equilibrio, posibilitando la investigación del rol de los distintos componentes del sistema inmune durante esta fase. Utilizando este modelo, luego de una única dosis con el carcinógeno metilcolantreno, se observó que ratones que no habían desarrollado tumores luego de 300 días, tampoco lo hacían al depletarlos de células NK pero sí desarrollaban tumores cuando los trataban con una combinación de anticuerpos (Acs) depletantes  $\alpha$ -CD4,  $\alpha$ -CD8 y  $\alpha$ -IFN- $\gamma$ . De esta forma, se infirió que las células NK no tienen actividad anti-tumoral en la fase de equilibrio (40). Por otro lado, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, se encontró que las células NK infiltrantes de los tumores son mayoritariamente inmaduras y muestran un defecto en la producción de IFN- $\gamma$  y en la



capacidad citotóxica (144). Además, una vez que el tumor está establecido, se han reportado numerosos mecanismos que explican cómo el microambiente tumoral puede comprometer la funcionalidad de las células NK. Éstos involucran tanto a otras células del infiltrado, como las células T<sub>reg</sub> y las células mieloides supresoras (MDSCs), como a los factores solubles TGF- $\beta$ , PGE2 o adenosina (145).

Recientemente, se empezó a considerar la posibilidad de que las células NK en el microambiente tumoral no sólo presenten funciones efectoras comprometidas, sino que además ejerzan funciones protumorales (146). Fisiológicamente, cuando participan en la “construcción” de un tejido, como en el caso de la reparación de heridas o en la decidua durante el embarazo, las células NK tienen actividad proangiogénica (147,148). De forma análoga, se ha reportado que las células NK intratumorales en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas producen grandes cantidades de VEGF, posiblemente inducido por TGF- $\beta$  y, de esta forma, podrían contribuir al escape tumoral (149). Además de las funciones proangiogénicas reportadas, las células NK serían capaces promover el escape tumoral mediante la regulación de distintas células del sistema inmune. Por ejemplo, se ha descrito que, a través de la secreción de la quemoquina CCL22, las células NK pueden reclutar células T<sub>reg</sub> al microambiente tumoral (150) y que las células NK C11b<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>, en presencia de GM-CSF, pueden desdiferenciarse y convertirse en MDSCs (151).

Por otro lado, se ha descrito que las células NK pueden ejercer un rol regulatorio sobre LT CD8 (152-157), LT CD4 (152,153,158,159) y DCs (160-162) en diversos modelos de infecciones virales (155,156,160,163), trasplante (164) y autoinmunidad (165). Sin embargo, aún no se conoce si estos mecanismos pueden tener relevancia en la respuesta inmune anti-tumoral.

Respecto a los LT, se demostró que las células NK activadas con IL-2 pueden eliminar LT CD8 y LT CD4 activados, tanto en ratones (152) como en humanos (153), reconociéndolos a través de NKG2D. También, mediante la vía de TRAIL las células NK activadas son capaces de eliminar LT CD8 en el contexto de la infección por HBV (157) y LT CD4 durante la infección con MCMV (163). En otro reporte, se observó que durante una infección con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), las células NK pueden eliminar LT CD4, lo que repercute indirectamente sobre la respuesta de los LT CD8 (159).

Adicionalmente, se demostró que la depleción de células NK favorece la resolución de la infección con LCMV, debido a que estas células limitan la respuesta anti-viral de los LT CD8 utilizando un mecanismo que involucra NKG2D y es mediado por perforina (156). La actividad citotóxica de las células NK sobre LT CD8, dependiente de NKG2D y perforina, afecta la generación de LT CD8 de memoria en ratones inmunizados con el péptido de ovoalbúmina (OVA) (154). Adicionalmente, las células NK también pueden regular a los LT a través de la secreción de citoquinas inmunosupresoras. Se observó que el TGF- $\beta$  producido por células NK humana gatilla funciones regulatorias en los LT CD8 *in vitro* (166) y que la IL-10 producida por células NK restringe las funciones efectoras de los LT CD8 en un modelo murino de infección con MCMV (167) y la proliferación antígeno-específica de LT CD4 humanos (168).

Es interesante destacar que los LT activados también presentan mecanismos que les permiten “defenderse” de la actividad citotóxica de las células NK, contrarrestando esta actividad regulatoria. Por ejemplo, los LT CD8 CD48<sup>+</sup> pueden eludir la actividad citotóxica de las células NK a través del receptor inhibitorio 2B4 (155), mientras que la interacción entre Qa-1 y NKG2A protege a los LT CD4 activados de la acción citotóxica de las células NK NKG2A<sup>+</sup>(158).

Las células NK también pueden regular la respuesta de los LT, indirectamente, actuando sobre las DCs. Utilizando un modelo de infección con LCMV, se observó que, en los ratones depletados de células NK, las DCs tienen mayor capacidad de estimular la proliferación de los LT CD8 (160). Resultados similares fueron hallados utilizando el modelo de infección con MCMV, donde se observó que las células NK limitan la frecuencia de DCs que presentan antígenos virales y, en consecuencia, regulan la activación de los LT (161).

La relación entre las células NK y las DCs es muy compleja y, así como en algunos casos puede tener consecuencias inmunosupresoras, en otros contextos, puede favorecer la inflamación.

#### **DIÁLOGO RECÍPROCO ENTRE DCs Y CÉLULAS NK**

Los mecanismos de interacción entre las DCs y las células NK suelen ser descritos bajo el concepto de “diálogo recíproco” debido a que son bidireccionales, teniendo consecuencias en ambos tipos celulares que pueden ser muy diferentes según el estado

de activación que tengan en el momento del encuentro. Si bien hay numerosos trabajos que destacan la importancia del “diálogo recíproco” entre estas células, representa un gran desafío, considerando la escasa frecuencia relativa de ambos tipos celulares, encontrar el lugar físico de interacción *in vivo*. Sin embargo, existe consenso en suponer que puede ocurrir tanto en los sitios de inflamación como en los ganglios linfáticos (169).

Se ha descrito que las mDCs son capaces de activar a las células NK en reposo induciendo su proliferación, la secreción de IFN- $\gamma$  y su capacidad citotóxica (117). La intensidad y la calidad de la respuesta de las células NK van a depender tanto del contacto con las mDCs, mediante CD40/CD40L, CD28/CD80 y CD86, ICAM3/DCSIGN (170,171), como de las citoquinas que éstas secretan, como IFN- $\alpha/\beta$ , IL-12, IL-18 e IL-15 (172-175). La IL-15 constituye un caso particular; a diferencia de lo que ocurre con otras citoquinas, ésta no actúa como un factor soluble sino que requiere del contacto celular, ya que es trans-presentada por las DCs unida a la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-15 (176).

Por otra parte, cuando el encuentro se produce entre células NK activadas e iDCs, el resultado va a depender de la relación numérica entre ambas partes. Una baja proporción de células NK activadas respecto a las iDCs promueve la maduración de las DCs. Este efecto depende tanto del contacto directo entre las células como de las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  secretadas por las células NK activadas, provocando un aumento de la expresión de las moléculas del MHC de clase I y de moléculas co-estimuladoras en las DCs (177-179). De esta forma, las células NK pueden contribuir en el perfilado de la respuesta inmune adaptativa. En este sentido se observó que el IFN- $\gamma$  secretado por las células NK estimula la producción de IL-12 por las DCs, lo que induce la diferenciación de los LT CD4 *naive* hacia un perfil Th1 (180) y potencia la liberación de IFN- $\gamma$  en las células NK, contribuyendo aún más al perfil Th1 (181). Sin embargo, si la relación numérica favorece a las células NK, éstas inducirán la muerte de las iDCs a través de un mecanismo que involucra a TRAIL (162).

El conjunto de los trabajos mencionados demuestra que las interacciones entre las células NK y las DCs cumplen un rol fundamental en la orquestación de la respuesta inmune adaptativa. Considerando la multiplicidad de escenarios posibles que pueden derivar de la interacción entre estas células, es interesante conocer el efecto de las

células NK activadas en el microambiente tumoral sobre las DCs, sin embargo, aún no hay reportes concluyentes al respecto.

### **MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL**

A pesar de que el sistema inmune cuenta con poderosas herramientas para evitar el desarrollo de tumores, las enfermedades neoplásicas se manifiestan incluso en pacientes inmunocompetentes. Esto se debe a que la presión selectiva que ejerce el sistema inmune sobre las células neotransformadas favorece el crecimiento sólo de aquellas variantes que lograron desarrollar estrategias que les permitieran evadir la respuesta inmune. Asimismo, las células tumorales pueden cooptar circuitos tolerogénicos del sistema inmune que fisiológicamente previenen la autoinmunidad. Los mecanismos de escape conocidos incluyen: modificaciones en la expresión de proteínas de superficie en las células tumorales, expansión y reclutamiento de células inmunosupresoras, y secreción de factores inmunosupresores (42).

#### ***MODIFICACIONES EN LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE EN LAS CÉLULAS TUMORALES***

Uno de los mecanismos a través de los cuales las células tumorales evitan el reconocimiento de los LT CD8 es mediante la expresión alterada de moléculas del MHC de clase I. Se han descrito alteraciones en los distintos componentes del sistema de procesamiento y presentación antigénica, incluyendo defectos en la expresión de LMP2 y LMP7 (182) involucrados en la generación de los epitopes; alteraciones en la expresión de las proteínas TAP-1 y TAP-2, necesarias para la entrada de los epitopes en el retículo endoplásmico; e incluso, la propia disminución en la expresión de las moléculas del MHC de clase I (183,184). Aunque este mecanismo evita el reconocimiento por parte de los LT CD8, hace a las células susceptibles de ser eliminadas por las células NK. Sin embargo, también se han descrito diversos mecanismos de evasión de la respuesta mediada por células NK. Por ejemplo, existen diversos mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL (ligandos de NKG2D). Entre ellos, se destaca la retención de NKG2DLs en el retículo endoplásmico evitando su expresión en superficie (185), el desprendimiento a través de la secreción de exosomas (186), la secreción de formas solubles por *splicing* alternativo (187) y el clivaje del ectodominio de NKG2DLs por acción

de metaloproteasas (188). El clivaje y la secreción no sólo generan variantes tumorales con menor expresión de NKG2DLs, afectando su reconocimiento por las células citotóxicas, sino que esas formas solubles actúan como antagonistas del receptor NKG2D inhibiendo la funcionalidad de las células NK y de los LT CD8 (189).

Por otra parte, uno de los primeros mecanismos de escape tumoral descritos involucra la vía de Fas/FasL. A través de este mecanismo, se produce lo que se conoce como el contra-ataque del tumor. FasL es expresado por diversas células tumorales y les permite interactuar con Fas en los LT que infiltran el tumor. La interacción con FasL induce la trimerización de Fas en los LT promoviendo la activación de una cascada de caspasas que conduce a la apoptosis (190). Si bien es controversial el inmunoprivilegio conferido por la expresión de FasL, ya que su expresión ectópica promueve el rechazo de trasplantes en ratones (191), se observó que el silenciamiento de la expresión de FasL en una línea celular de carcinoma de colon de ratón produce una disminución del tamaño tumoral (192). En concordancia, la transducción de FasL en diversas líneas tumorales que naturalmente no expresan dicha molécula inducen la apoptosis de LT CD8 activados *in vivo* (193).

Además, en tumores de diversos orígenes (melanoma, cáncer de pulmón y de ovario, entre otros) se observó un aumento en la expresión de ligandos de PD-1. Se han descrito dos ligandos de PD-1: PD-L1, que se expresa en elevados niveles en la mayoría de los tumores sólidos (194), y PD-L2, cuya expresión se encuentra restringida a ciertos linfomas de células B (195). La expresión de PD-L1 puede verse incrementada en las células tumorales como un mecanismo de resistencia “natural”, asociado a la activación de distintas vías de señalización oncogénicas (196,197), pero también puede ser inducido por citoquinas inflamatorias como mecanismo de resistencia “adaptativo” (198); recientemente, se demostró que el IFN- $\gamma$  derivado de células NK activadas aumenta la expresión de PD-L1 en células tumorales (199). La unión de PD-1 a su ligando induce el reclutamiento y activación de la fosfatasa Shp-2 que desfosforila moléculas clave de la transducción de señales de los receptores de antígeno, tanto en LB como en LT, actuando como un “reóstato” del umbral de activación de los linfocitos en la periferia (200). Fisiológicamente, PD-1 es expresado en linfocitos activados y en células mieloides, proporcionando una señal inhibitoria en estas células que contribuye a mantener la

homeostasis regulando la duración y la amplitud de la respuesta, lo que minimiza el daño tisular circundante a un foco inflamatorio y evita la auto-inmunidad (201). Por estos motivos, se considera al eje PD-1/PD-L1 uno de los *immune checkpoints* o “puntos de control inmunológico” más relevantes de la respuesta inmune adaptativa (195) y, de este modo, cobra especial relevancia en la inmunología anti-tumoral ya que, a través de este eje, las células tumorales pueden generar tolerancia periférica al inducir anergia e inhibir la proliferación y las funciones efectoras de los LT (202).

#### **EXPANSIÓN Y RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS INMUNOSUPRESORAS**

Las células  $T_{reg}$  son una subpoblación de LT CD4 que se caracteriza fenotípicamente por la expresión de CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de IL-2) y del factor de transcripción FoxP3. Estas células son capaces de suprimir la proliferación de LT *naive* y su diferenciación a LT efectores. Además, pueden inhibir las funciones efectoras de LT CD4 (203), LT CD8 (204), células NK (205), LB (206), macrófagos (207) y DCs (208). Fisiológicamente, son indispensables para el mantenimiento de la tolerancia y para evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, también juegan un rol central en la inhibición de la respuesta inmune anti-tumoral. Se observó que los tumores son capaces de promover su reclutamiento a través de la secreción de la quemoquina CCL22 (209), su expansión a través de la producción de TGF- $\beta$  y de IL-10 (210), y su activación (211). Las células  $T_{reg}$  son capaces, según el entorno inflamatorio al que están expuestas, de expresar diversas moléculas de superficie como CTLA-4, TIGIT, CD39 y CD73, y de secretar citoquinas inmunosupresoras como TGF- $\beta$  e IL-10, responsables de inhibir la respuesta inmune a través de diversos mecanismos (212). En individuos portadores de tumor, se demostró que las células  $T_{reg}$  regulan la respuesta inmune principalmente a través de CTLA-4 (211). CTLA-4 es un receptor inhibitorio que, al igual que CD28, reconoce a CD80 y CD86. Sin embargo, CTLA-4 reconoce a ambas moléculas co-estimuladoras con mayor afinidad que CD28, desplazando su unión e inhibiendo de esta manera la activación de los LT. Adicionalmente, CTLA-4 es capaz de inducir la trans- endocitosis de CD80 y CD86, afectando la capacidad estimuladora de las DCs (213-215).

Las MDSCs se caracterizan fenotípicamente por la co-expresión de CD11b y Gr-1 y conforman otra población regulatoria que se expande debido a la presencia del tumor. En condiciones fisiológicas, continuamente se generan en la médula ósea células mieloides

inmaduras con el mismo fenotipo que las MDSCs que se diferencian finalmente en células mieloides maduras (como macrófagos, DCs y neutrófilos). Sin embargo, diversos factores solubles como GM-CSF, G-CSG y M-CSF, que son liberados por el tumor y por células estromales asociadas al tumor, desregulan la maduración de las células mieloides y dan origen a las MDSCs (216). Las MDSCs inducidas por el tumor, que se acumulan en médula ósea, sangre y bazo, generan estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno (216) e inducen la privación de aminoácidos esenciales como arginina y cisteína (217). De esta manera, suprimen la proliferación de los LT y favorecen la progresión tumoral (218).

#### **SECRECIÓN DE FACTORES SUPRESORES QUE INHIBEN LA INMUNIDAD ANTI-TUMORAL**

Las células tumorales son capaces de secretar múltiples factores solubles con funciones inmunosupresoras. Entre ellos se encuentra Gal-1, una lectina que contribuye a crear un ambiente tolerogénico y a favorecer el escape tumoral a través de numerosos mecanismos; por ejemplo: induce la apoptosis en LT efectoras (219), favorece la expansión y el aumento de la capacidad supresora de las células T<sub>reg</sub> (220) y promueve la neoangiogénesis (221).

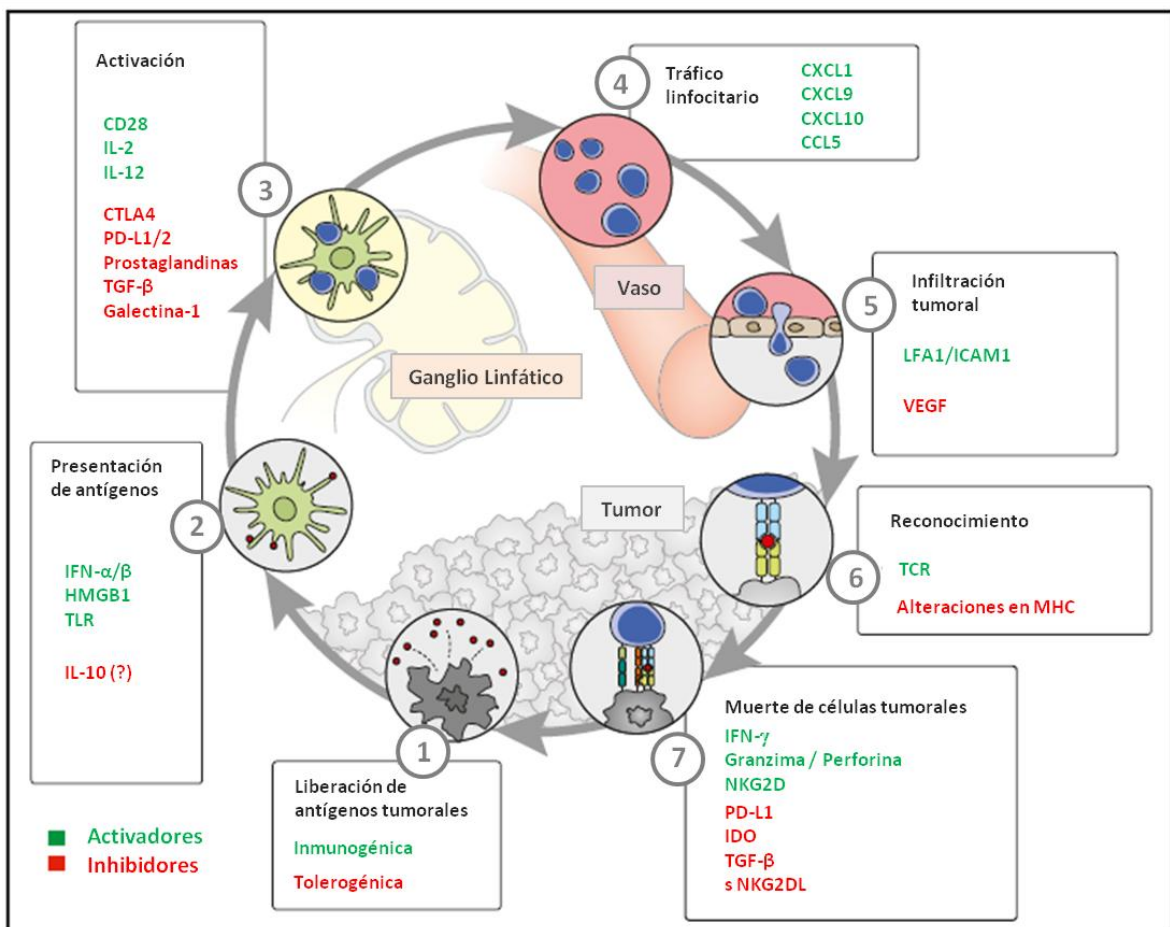
Por otra parte, las células tumorales pueden secretar enzimas que catabolizan aminoácidos en el microambiente tumoral. Específicamente, la expresión deIDO promueve el catabolismo del triptófano para generar kinurenina, lo que inhibe la proliferación de LT CD8 y promueve apoptosis de LT CD4 (222).

Recientemente se ha demostrado que las células tumorales, a través de la producción de PGE<sub>2</sub>, estimulan la producción de citoquinas inmunosupresoras en el microambiente tumoral e inhiben la maduración de las DCs (223).

Las células tumorales también son capaces de secretar directamente diversas citoquinas inmunosupresoras inhibiendo la respuesta inmune anti-tumoral. Por ejemplo, la secreción de TGF- $\beta$  conduce a la inhibición de la maduración de las DCs y también a la inhibición de las funciones efectoras de las células NK y de los LT (224). De modo similar, la secreción de IL-10 puede suprimir la función de las DCs y perfilar la respuesta de LT hacia una respuesta de tipo Th<sub>2</sub>, la cual es menos efectiva para la eliminación de células tumorales (225-227).

## INMUNOTERAPIAS

La plétora de mecanismos de escape, que les permite a las células tumorales evadir la respuesta inmune anti-tumoral, provee al mismo tiempo blancos terapéuticos farmacológicos que procuran restaurar la capacidad del sistema inmune de eliminar eficazmente los tumores. La **Figura 4** resume, en verde, los blancos terapéuticos que se busca estimular y, en rojo, aquellos que se desea inhibir durante las distintas etapas del orquestado de la respuesta inmune anti-tumoral.



**Figura 4: Blancos terapéuticos para modular la inmunidad anti-tumoral.** Cada etapa del circuito de la inmunidad anti-tumoral requiere de la coordinación de numerosos factores tanto activadores (en verde) como inhibidores (en rojo). Todos estos factores representan potenciales blancos terapéuticos, muchos de los cuales ya están siendo estudiados en ensayos clínicos. Modificado de (228).

En primer lugar, es necesario que las células tumorales aporten material antigénico para que pueda ser fagocitado por las DCs en condiciones que desfavorezcan la inducción de tolerancia. Así, se observó que la liberación de antígenos tumorales promovida por radioterapia resulta más inmunogénica cuando se administran



oligodeoxinucleótidos CpG que actúan como adyuvantes promoviendo la activación de DCs a través de TLR9 (229). Por otra parte, la presentación cruzada de antígenos puede ser estimulada por IFN de tipo I y se demostró que su administración aumenta la retención de antígenos tumorales y la sobrevivencia de las DCs CD8 $\alpha^+$ , favoreciendo así la respuesta de LT CD8 (230). De esta forma, el PEG-Intron, un derivado del IFN- $\alpha$  ampliamente utilizado para el tratamiento de hepatitis C, produce un aumento significativo en el índice de sobrevivencia libre de recidiva en pacientes de melanoma en estadio III (231). También hay terapias orientadas a activar directamente la respuesta de los LT, como la administración de aldesleukina (IL-2) aprobada por la FDA en 1992 para tratar el carcinoma avanzado de células renales y el melanoma metastásico (232).

El siguiente desafío es conseguir que los LT infiltren el tumor. Existen agentes quimioterapéuticos, como la decarbazina, que además de actuar como citostáticos sobre las células tumorales, producen un aumento en la expresión de las quemoquinas CCL5, CXCL9 y CXCL10 que facilitan el reclutamiento de LT, lo que se asoció con mejor control del crecimiento tumoral y mayor sobrevivencia en pacientes con melanoma (233).

La capacidad de una inmunoterapia de generar remisión a largo plazo está supeditada a la eliminación de todas las variantes celulares que componen el tumor. Como las células tumorales dentro de un mismo tumor pueden ser muy heterogéneas en cuanto a la expresión de antígenos en superficie e, incluso, tener alteraciones en las moléculas del MHC de clase I, se están estudiando métodos para re-dirigir la especificidad del TCR mediante la transducción *ex vivo* con un receptor antigénico quimérico (CAR). Mientras que la porción intracitoplasmática del CAR proviene del dominio del TCR, y conserva su capacidad de transducir la señal de activación, el dominio extracelular que va a permitir el reconocimiento de la célula tumoral puede provenir de diferentes estructuras, sorteando de esta manera la restricción del MHC. Así, Sentman y colaboradores, utilizando el dominio extracelular de NKG2D, demostraron que la transferencia adoptiva de LT NKG2D-CAR tiene efectos terapéuticos en diferentes modelos murinos (234). Sin embargo, el éxito de las inmunoterapias en pacientes humanos muchas veces resultó menor al esperado, debido a los efectos adversos observados y a la complejidad de la interacción entre los distintos actores del sistema inmune, entre sí y con las células tumorales.

No obstante, las inmunoterapias adquirieron especial protagonismo gracias a los “inhibidores de puntos de control”, que fueron reconocidos por la revista *Science* como la *Revelación del Año 2013*. Recientemente aprobados por la FDA, se destacan los inhibidores de las vías de CTLA-4, ipilimumab, y de PD-1, nivolumab. Estas vías funcionan en diferentes fases de la respuesta inmune para regular la duración y nivel de respuesta de los LT. CTLA-4 actúa principalmente en la fase inicial de la activación de los LT en los ganglios linfáticos y cumple una función primordial limitando la autoinmunidad, mientras que la vía de PD-1/PD-L1 actúa fundamentalmente en la fase efectora de la respuesta inmunológica, evitando el daño tisular colateral durante la respuesta inmune (195). El hecho de que estas moléculas actúen en distintas fases de la respuesta de los LT explica la diferencia en la magnitud de los efectos adversos que causa la administración de los Acs bloqueantes de estas vías. El uso de ipilimumab en melanoma produce efectos adversos de grado 3 y 4 en el 15% de los pacientes debido a la sobre-estimulación del sistema inmune en piel, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, riñones y sistema endócrino, que llegan a ser fatales en el 2% de los casos (235). El nivolumab tendría beneficios clínicos similares al ipilimumab pero con menor toxicidad, produciendo efectos adversos de grado 3 y 4 en el 5% de los pacientes, sin casos fatales reportados (236,237).

Actualmente, la utilización de Acs bloqueantes de PD-1 y PD-L1 representa un gran éxito en el tratamiento de pacientes con tumores de distintos orígenes. En un ensayo clínico, que involucró a cientos de pacientes terminales refractarios a cualquier otro tratamiento, encontraron que el 18% de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, el 28% de los pacientes con melanoma y el 27 % de los pacientes con cáncer renal vieron prolongada su sobrevida gracias a esta terapia (238). Si bien estos resultados son muy prometedores, muchos pacientes no fueron beneficiados. Por lo tanto, cobra gran importancia el estudio de biomarcadores que permitan seleccionar a los pacientes respondedores.

Llamativamente, aunque el principio subyacente a la administración de estos Acs surge de contrarrestar el mecanismo de escape tumoral basado en el aumento de expresión de PD-L1 en el tumor, se observó que la expresión de PD-L1 en las células tumorales no representa un biomarcador adecuado como predictor de la eficacia del tratamiento con el Ac bloqueante. De hecho, hay reportes que muestran que pacientes

con tumores PD-L1<sup>-</sup> también responden a la terapia con Acs bloqueantes de este punto de control; por lo tanto, excluirlos del tratamiento implicaría perder potenciales respondedores (239). En un ensayo clínico reciente, fue demostrado que aquellos pacientes con tumores metastásicos de vejiga que presentan infiltrado de células inmunes con alta expresión de PD-L1 tienen particularmente una alta tasa de respuesta al tratamiento con un Ac bloqueante de PD-L1 (240) y resultados similares fueron descritos también en pacientes con cáncer de pulmón (241). Sin embargo, se desconoce de qué manera las células del sistema inmune que expresan PD-L1 en el microambiente tumoral pueden contribuir a la progresión del tumor.

En definitiva, para el diseño de inmunoterapias contra el cáncer, cualquiera sea el mecanismo del circuito esquematizado en la **Figura 4** que se procure fortalecer, el objetivo último es siempre el mismo: establecer una población de LT CD8 específicos anti-tumorales, altamente activa y capaz de eliminar todas las células tumorales (242).

# OBJETIVOS

“El tigre tiene que cazar,  
el ave tiene que volar,  
el hombre tiene que preguntar  
por qué, por qué, por qué.”  
Kurt Vonnegut, *Cuna de gato*

Los antecedentes descriptos ponen en evidencia cómo el estudio de la respuesta inmune anti-tumoral permitió el desarrollo de nuevas terapias que en la actualidad muestran resultados prometedores en la clínica. Sin embargo, éstas no resultan efectivas para todos los pacientes debido a la existencia de circuitos regulatorios compensatorios, a los efectos adversos producidos por la activación inespecífica de la respuesta inmune y a que, frecuentemente, el diagnóstico se produce cuando el tumor se encuentra ya inmunoeeditado en la fase de escape. En este contexto, cobra especial importancia comprender los mecanismos responsables de la activación y regulación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales ya que representan la mejor “arma” de la inmunidad anti-tumoral.

Si bien está ampliamente reportada la capacidad de las células NK de ser citotóxicas frente a células tumorales y producir citoquinas inflamatorias como parte de la respuesta innata anti-tumoral, no se conoce la función de las células NK en las siguientes fases de la inmunidad anti-tumoral. Considerando que las células NK establecen además un diálogo recíproco con las DCs, células clave en la activación de los LT CD8 y que, recientemente, se encontraron evidencias de que las células NK cumplen importantes funciones regulatorias en diversos modelos de infecciones virales, trasplante y de enfermedades autoinmunes, planteamos como hipótesis de trabajo que las células NK pueden regular la activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales.

Entonces, el **objetivo general** de esta tesis es elucidar el rol de las células NK en el orquestado de la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. En particular, estudiaremos:

- La respuesta inmune anti-tumoral frente al fibrosarcoma MC57.SIY.
- El rol de las células NK en la activación de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales *in vivo*.
- El impacto de la activación de las células NK frente a un tumor primario en la respuesta inmune anti-tumoral secundaria.
- Los mecanismos regulatorios mediados por células NK en la respuesta inmune anti-tumoral.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

“Sin embargo –replicó Syme pacientemente-, note usted que, gracias a la luz del farol, puede usted ver ahora mismo el árbol. No estoy seguro de que pudiera usted ver el farol a la luz del árbol.”

Gilbert Keith Chesterton, *El hombre que fue Jueves*

### **LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO**

Las líneas celulares murinas de fibrosarcoma MC57 y de melanoma B16F10 (B16) de la cepa C56BL/6, transducidas para expresar el antígeno modelo SIYRYYGL (SIY) acoplado a GFP (243), fueron gentilmente cedidas por el Dr. Thomas Gajewski de la Universidad de Chicago, Illinois, EEUU. Las líneas celulares humanas ECC-1 (adenocarcinoma de endometrio), MDA-MB-453 (cáncer de mama), PC3 (adenocarcinoma de próstata), Caco2 (adenocarcinoma de colon) y HeLa (cáncer de cuello de útero) fueron provistas por la Dra. Analía Ricci, la Dra. Patricia Elizalde, la Dra. Adriana De Siervi y el Dr. Mario Galigniana, respectivamente. El hibridoma 2.4G2 (HB-197) productor del Ac anti-CD16/32 murino, la línea celular PT-67 empaquetadora de vectores retrovirales, la línea celular YAC-1 (linfoma de ratón) y la línea celular K562 (leucemia mielocítica crónica humana) fueron adquiridas en ATCC.

A excepción de las líneas celulares 2.4G2, YAC-1 y K562, las células fueron mantenidas en medio de cultivo de Eagle con modificación de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, (ambos de Invitrogen) y 40 µg/ml de gentamicina (Bagó) como antibiótico. Los cultivos primarios y las líneas celulares 2.4G2, YAC-1 y K562 fueron mantenidos en medio RPMI 1640 (Gibco) con los mismos suplementos mencionados anteriormente. Los medios de cultivo utilizados para células de origen murino fueron suplementados, además, con 55 µM de β-mercaptoetanol.

En todos los casos las células fueron cultivadas en una estufa a 37°C con atmósfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **RATONES**

Se utilizaron animales de la cepa C57BL/6 de 7 a 12 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata que fueron alojados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) de acuerdo a las pautas establecidas por el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH). Los estudios realizados con animales de laboratorio contaron con la aprobación del comité de ética pertinente (IBYME-CONICET).

**Experimentos in vivo**

**Desafío con líneas celulares tumorales:** Grupos de 4-6 ratones fueron inyectados por vía subcutánea en cada flanco con  $2 \times 10^6$  de células tumorales o PBS (ratones *naive*). A distintos tiempos se obtuvieron muestras de sangre para realizar distintas determinaciones. Según el experimento, los animales fueron sacrificados 2, 4, 6 u 11 días luego del desafío tumoral y los tumores, bazo, ganglios linfáticos drenantes y no drenantes del tumor fueron extirpados para su posterior procesamiento y análisis. Alternativamente, cada 2-3 días se midió el tamaño del tumor con un calibre digital y se calculó el volumen con la fórmula  $(d^2 \times D)/2$ , donde d y D son los diámetros menor y mayor del tumor, respectivamente. Los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen de  $1000 \text{ mm}^3$ .

**Depleción de LT CD8:** Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 200  $\mu\text{g}$  del Ac anti-CD8 (clon YTS 169.4, obtenido en el laboratorio del Dr. Osvaldo Podhajcer) o CI (clon C1.18.4, BioXcell) el día anterior y posterior al desafío tumoral y, luego, cada 7 días. La depleción de LT CD8 fue confirmada en muestras de sangre por citometría de flujo.

**Depleción de células NK:** Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con 100  $\mu\text{g}$  del Ac anti-NK1.1 (clon PK136, BioXcell) o control de isotipo (CI, clon C1.18.4, BioXcell) el día anterior y posterior al desafío tumoral y, luego, cada 3 días. La depleción de células NK fue confirmada en muestras de sangre, en ganglios y en tumores por citometría de flujo.

**Transferencia adoptiva intratumoral de células NK:** Dos grupos de ratones fueron inoculados con  $2 \times 10^6$  de células del fibrosarcoma MC57.SIY; tres días más tarde, uno de los grupos fue inyectado en el mismo sitio con PBS y el otro grupo con  $7,5 \times 10^4$  células NK (células  $\text{CD49b}^+\text{CD3}^-$  aisladas mediante *cell sorting* a partir de células de bazo de ratones *naive*). Tres días más tarde, los animales fueron sacrificados y los bazos fueron extraídos para su análisis.

**Experimentos de re-desafío:** Se desafiaron dos grupos de ratones con el tumor MC57.SIY (1<sup>er</sup> desafío), uno depletado de células NK y otro tratado con CI. El tratamiento con Acs se discontinuó al séptimo día luego del 1<sup>er</sup> desafío. Tres meses más tarde, se obtuvieron



muestras de sangre de ambos grupos de ratones y de un grupo control *naive* de la misma edad para la realización de diversas determinaciones por citometría de flujo. Al día siguiente, se inocularon los tres grupos de ratones por vía subcutánea con  $4 \times 10^6$  de células B16.SIY en cada flanco (2° desafío) y, cuatro días más tarde, se obtuvieron muestras de sangre para su análisis por citometría de flujo. Adicionalmente, se midió el tamaño tumoral cada 2-3 días utilizando un calibre digital.

### ***Procesamiento de órganos***

Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos eppendorf heparinizados y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos. Posteriormente, los glóbulos rojos fueron lisados en 400  $\mu$ L de Buffer Amonio-Cloruro-Potasio (ACK, 154,95 mM de cloruro de amonio y 9,99 mM de bicarbonato de potasio) durante 7 minutos, luego de lo cual se agregó 1 mL de solución fisiológica (SF, NaCl 0,9%), se centrifugó a 600 g durante 5 minutos y se repitió la incubación con el buffer ACK. Finalmente, las células se resuspendieron en medio de cultivo y se cuantificaron las células linfoides mediante un contador hematológico (Coulter).

Los tumores y los bazos fueron disgregados mecánicamente en SF con 5% de SFB con émbolos de jeringa sobre filtros de nylon con poros de 70  $\mu$ m en placas de Petri de 60 mm. Las suspensiones celulares fueron transvasadas a tubos de polipropileno de 15 mL y centrifugadas a 600 g durante 5 minutos. Los tumores se lavaron al menos dos veces más con SF y se filtraron nuevamente antes de ser resuspendidos en medio de cultivo.

Los ganglios linfáticos se disgregaron mecánicamente en SF con 5% SFB con pisones plásticos en tubos eppendorf. Luego de descartar las cápsulas, se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos y las células se resuspendieron en medio de cultivo.

Posteriormente se realizó el recuento de las células de ganglios linfáticos y de los esplenocitos con azul de Tripán en cámara de Neubauer.

En algunos experimentos los tumores y los ganglios linfáticos fueron conservados en RNAlater (Ambion) para posteriormente realizar la extracción de RNA.

## **AISLAMIENTO DE CÉLULAS**

### **Método inmunomagnético**

Para realizar un enriquecimiento de células NK, las células obtenidas a partir de un bazo fueron tratadas durante 5 minutos con 1 mL de buffer ACK, lavadas con SF e incubadas en 900 µL de buffer Miltenyi con 100 µL de microesferas-CD49b (Miltenyi) durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron con SF, se resuspendieron en 1 mL de buffer Miltenyi y se sembraron en la columna MS (Miltenyi) previamente equilibrada y colocada en el magneto. Se realizaron 6 lavados con 500 µL del buffer, luego se retiró la columna del magneto y las células CD49b<sup>+</sup> se eluyeron primero por gravedad con 1 mL del buffer y posteriormente agregando 1 mL adicional del buffer y utilizando un émbolo. Las células así obtenidas fueron inmunomarcadas y analizadas por citometría de flujo encontrándose siempre al menos 60% de células NK.

### **Cell sorting**

Las inmunomarcaciones para *cell sorting* se realizaron en condiciones asépticas en buffer Miltenyi (PBS, pH=7,2 con 0,5% de albúmina sérica bovina y 2 mM de EDTA). Luego, se utilizó el equipo FACSAria II-plus (BD Bioscience), previamente decontaminado, configurado con el *nozzle* de 70 µm y la cámara de toma de muestra a 4°C. Las células aisladas fueron recolectadas en tubos estériles conteniendo medio de cultivo suplementado con 20 % de SFB. La pureza de las células obtenidas fue siempre mayor al 90%.

### **Centrifugación en gradiente de densidad**

Se realizaron gradientes de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) con sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos diluida al medio con SF. Las células mononucleares de sangre periférica (CMSPs) obtenidas fueron lavadas con SF y resuspendidas en medio de cultivo. Posteriormente, se realizó el recuento de células con azul de Tripán en una cámara de Neubauer. Los estudios realizados con muestras de sangre de donantes voluntarios sanos contaron con la aprobación del comité de ética pertinente (IBYME-CONICET).

**ENSAYO DE CITOTOXICIDAD IN VITRO**

Se realizó un método conocido como “P-JAM” (*post-just another method*) basado en la determinación de la incorporación de timidina-<sup>3</sup>H (New England Nuclear Life Science) por parte de células tumorales (células *target*) luego del co-cultivo con células NK aisladas por el método inmunomagnético (células efectoras) (244). Brevemente, se sembraron  $5 \times 10^3$  células MC57.SIY y se cultivaron con diferentes cantidades de células NK durante 6 horas. Como control de muerte basal y máxima, las células tumorales se cultivaron en ausencia (B) o presencia de estaurosporina (STO, Sigma) 1  $\mu$ M, respectivamente. A continuación, se añadió en cada pocillo timidina-<sup>3</sup>H en una concentración final de 5  $\mu$ Ci/mL y, luego de 3 horas de cultivo, las células fueron cosechadas en filtros de fibra de vidrio (Whatmann) con un cosechador de células (Packard Filtermate, Packard Instruments). La radioactividad incorporada fue medida en un contador de centello (Becton Dickinson). El porcentaje de citotoxicidad se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{B \text{ [cpm]} - \text{Co-cultivo [cpm]}}{B \text{ [cpm]} - \text{STO [cpm]}} \times 100$$

**ELISA**

Se realizaron ensayos de ELISA con el objetivo de cuantificar IFN- $\gamma$  de ratón empleando un kit comercial de R&D de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Las muestras analizadas consistieron en sobrenadantes provenientes del cultivo de  $1 \times 10^5$  células NK aisladas por el método inmunomagnético en presencia o ausencia de  $3 \times 10^5$  células MC57.SIY durante 24 horas en placas de cultivo de 96 pocillos en fondo en “U”. En algunos ensayos, se utilizó el Ac bloqueante  $\alpha$ -NKG2D (2,5  $\mu$ g/mL). Se utilizaron placas de 96 fosas de fondo plano Maxisorp (NUNC, Rochester, NY, USA) y el revelado se realizó con una dilución de tetra-metil bencidina (TMB) en buffer citrato fosfato (pH=5) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo luego de 20-30 minutos por el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se determinó la absorbancia a 450 nm y a 550 nm en un lector de ELISA (Thermo Scientific).

### ***ENSAYO DE PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ EX VIVO***

En placas de cultivo de 96 pocillos de fondo en “U” se sembraron  $2 \times 10^5$  células obtenidas a partir de muestras de sangre de ratón, se cultivaron durante 18 horas en presencia o ausencia del péptido SIY (SIGMA, 10  $\mu$ M) y, durante las últimas 6 horas de cultivo, se agregó brefeldina A (Biolegend o Golgi Plug, BD) y monensina (Golgi Stop, BD) como inhibidores del transporte de proteínas. Luego se realizó el protocolo de determinación de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo.

### ***ENSAYO DE DEGRANULACIÓN EX VIVO***

En placas de cultivo de 96 pocillos de fondo en “U” se sembraron  $1 \times 10^5$  células obtenidas a partir de muestras de sangre de ratón, se cultivaron durante 6 horas en presencia o ausencia del  $1 \times 10^5$  células MC57.SIY con brefeldina A, monensina y Ac  $\alpha$ -CD107aFITC. Luego se continuó con el protocolo de inmunomarcación para citometría de flujo.

### ***OBTENCIÓN DE CÉLULAS YAC-1.SIY***

#### ***Amplificación y purificación del plásmido pL.SIY.EGFP***

Se transformaron bacterias competentes JM109 con el plásmido pL.SIY.EGFP (cedido por el Dr. Thomas Gajewski) por el método de  $\text{CaCl}_2$ , utilizando ampicilina (Sigma) como antibiótico de selección. Al tratarse de un plásmido de bajo número de copias, las bacterias transformadas se cultivaron un tiempo adicional en presencia de cloranfenicol (Sigma), un antibiótico bacteriostático, antes de purificar el plásmido utilizando una midiprep (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

#### ***Transfección de la línea celular empaquetadora PT-67 con pL.SIY.EGFP***

Las células PT-67 fueron transfectadas con el plásmido pL.SIY.EGFP utilizando XtremeGENE (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. Dos días más tarde se agregó el antibiótico de selección geneticina (Gibco) y se realizó un seguimiento de la transfección utilizando un microscopio de fluorescencia invertido (Olympus IX70). Cuando todas las células fueron GFP<sup>+</sup> comenzó a recolectarse el sobrenadante de cultivo, que fue filtrado utilizando membranas con poros de 0,22  $\mu$ m (Microclar) y conservado a -70°C.

### **Transducción de las células YAC-1 y aislamiento de células YAC-1.SIY**

Las células YAC-1 fueron transducidas utilizando polybrene (Sigma, 8 µg/mL) con el retrovirus pL.SIY.GFP (presente en el sobrenadante de cultivo de la línea celular PT-67) en presencia del antibiótico de selección geneticina durante dos semanas. La expresión de SIY (GFP<sup>+</sup>) fue evaluada por citometría de flujo y las células YAC-1.SIY fueron aisladas mediante *cell sorting*.

### **ENSAYO DE CITOTOXICIDAD FRENTE A LTCD8**

Mediante *cell sorting* se aislaron LT CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) y células NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) provenientes de bazos de ratones *naive* y LT CD8 (CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>SIY) y células NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>SIY) infiltrantes de tumores MC57.SIY, 6 días luego de la inoculación. Se sembraron 5x10<sup>4</sup> LT CD8 *naive* o intratumorales por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en "U" y se cultivaron en presencia o ausencia de 5x10<sup>4</sup> células NK en reposo (*resting*) o intratumorales durante 18 horas. Finalmente, se agregaron microesferas con fines cuantitativos, se cosecharon y se marcaron con ZombieGreen (con el fin de determinar la muerte celular) y los Acs α-CD8 y α-NKp46 para ser analizadas por citometría de flujo. El porcentaje de citotoxicidad se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\# \text{ LT CD8 ZG}^+_{\text{Co-cultivo}} - \# \text{ LT CD8 ZG}^+_{\text{Medio}}}{\# \text{ LT CD8}_{\text{Co-cultivo}}} \times 100$$

### **EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVA (q-PCR)**

Se extrajo el RNA total de tumores y de ganglios linfáticos utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante, y se cuantificó en un espectrofotómetro (NanoDrop). A continuación, la integridad del RNA purificado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa 1% (Sigma) en buffer TAE (40mM Tris acetato, 1mM EDTA) en una cuba electroforética (Thermo Scientific), y el gel se fotografió utilizando un equipo GBOX (Syngene). A partir de 2 µg del RNA obtenido, tratado con DNasa (Promega), se procedió a la síntesis de cDNA utilizando *random primers* (Biodynamics), dNTPs (Promega), RNasaOut (Invitrogen) y transcriptasa reversa M-MLV (Promega) empleando un termociclador (Eppendorf). El RNA remanente se conservó a -70°C y el cDNA a -20°C.

Los cDNA obtenidos se utilizaron como templado en reacciones de *q-PCR* junto con los *primers* específicos mencionados en la **Tabla 1**, empleando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y el equipo CFX96 Real-Time PCR System (Bio-Rad). En el caso de IFN- $\beta$ , se utilizaron los *primers* y sondas comerciales TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems). Los resultados se analizaron con el programa CFX Manager (Versión 2.1, Bio-Rad) y se expresaron como  $2^{-\Delta Ct}$  (245) utilizando GAPDH o 18S como control endógeno.

**Tabla 1: Secuencias de los *primers* utilizados para *q-PCR***

| Gen          |   | Secuencia (5' → 3')        |
|--------------|---|----------------------------|
| IL-10        | F | TGCTAACCGACTCCTTAATGCAGGAC |
|              | R | CCTTGATTTCTGGGCCATGCTTCTC  |
| TGF- $\beta$ | F | AATTCCTGGCGTTACCTTGG       |
|              | R | ATCGAAAGCCCTGTATTCCG       |
| GAPDH        | F | CAGAACATCATCCCTGCAT        |
|              | R | GTTTCAGCTCTGGGATGACCTT     |

#### **EVALUACIÓN DE LA INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 IN VITRO**

Se sembraron  $1 \times 10^6$  de células de bazo de ratón en placas de cultivo de 96 pocillos en fondo en "U" en presencia o ausencia de IL-12 (10 ng/mL, Peprotech), IL-15 (1 ng/mL, Peprotech) e IL-18 (10 ng/mL, MBL) ó  $1 \times 10^5$  células MC57.SIY. Las células fueron cosechadas a distintos tiempos, marcadas con Acs  $\alpha$ -NKp46,  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -PD-L1 o CI y analizadas por citometría de flujo. En algunos co-cultivos de células de bazo con células MC57.SIY se utilizaron Acs bloqueantes  $\alpha$ -NKG2D (2,5  $\mu$ g/mL) o  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/mL), o CI.

Alternativamente, se cultivaron  $5 \times 10^5$  CMSPs humanas en presencia o ausencia de  $2 \times 10^5$  células de diferentes líneas tumorales humanas durante 48 horas. Luego las células fueron cosechadas, marcadas con Acs  $\alpha$ -CD56,  $\alpha$ -CD3 y  $\alpha$ -PD-L1 o CI y analizadas por citometría de flujo.

#### **MADURACIÓN DE DCs IN VITRO**

Mediante *cell sorting* se aislaron DCs (CD11c<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>-</sup>B220<sup>-</sup>) y células NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) de bazos de ratones sanos y células NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>SIY<sup>-</sup>) infiltrantes de tumores MC57.SIY, 6 días luego de la inoculación. Se sembraron  $5 \times 10^4$  DCs por pocillo en placas de 96 pocillos de fondo en "U" y se estimularon con LPS (Invivogen, 25 ng/mL) y

R848 (Invivogen, 10  $\mu$ M) en presencia o ausencia de  $5 \times 10^4$  células NK en reposo o de  $5 \times 10^4$  células NK intratumorales durante 18 horas. En algunos co-cultivos de DCs con células NK intratumorales se utilizó el Ac bloqueante  $\alpha$ -PD-L1 (10  $\mu$ g/mL). Finalmente, se agregaron microesferas con fines cuantitativos, se cosecharon y se marcaron con ZombieGreen (con el fin de determinar la muerte celular) y los Acs  $\alpha$ -CD11c,  $\alpha$ -CD86 y  $\alpha$ -NKp46 para ser analizadas por citometría de flujo. El índice de maduración se calculó como el cociente entre el número total de mDCs ( $CD11c^+CD86^+NKp46^-ZombieGreen^-$ ) en cada condición y en la condición control, que no recibió ningún estímulo.

### **CITOMETRÍA DE FLUJO**

Todas las inmunomarcaciones se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en "V", utilizando entre  $1 \times 10^5$  y  $1 \times 10^6$  células/pocillo según el experimento. Con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, las muestras fueron preincubadas durante 15 minutos con 20  $\mu$ L de sobrenadante de cultivo del hibridoma 2.4G2.

**Inmunomarcaciones directas de superficie:** las suspensiones celulares fueron incubadas con 20  $\mu$ L de diferentes combinaciones de diluciones de Acs conjugados con fluorocromos durante 30 minutos a 4°C. A continuación, las células se lavaron por agregado de 1% de SFB en PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron en 120  $\mu$ L de PBS y fueron mantenidas refrigeradas hasta ser adquiridas en el citómetro el mismo día de la marcación.

**Cuantificación del número absoluto de células:** se agregaron 5000 microesferas (Spherotech, Inc.) por pocillo en el momento previo a transferir las suspensiones celulares de la placa de cultivo a la placa con fondo en "V". El número de células adquiridas se relativizó al número de microesferas adquiridas en el mismo tiempo.

**Detección de células viables:** las muestras fueron incubadas con Zombie Green (Biolegend) durante 15 minutos a temperatura de ambiente. A continuación, las células se lavaron por agregado de 1% de SFB en PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Luego se prosiguió con el protocolo de marcación.

**Detección de LT CD8 antígeno-específicos:**  $1 \times 10^5$  células obtenidas a partir de muestras de sangre ó  $1 \times 10^6$  de células de bazo fueron incubadas durante 10 minutos a

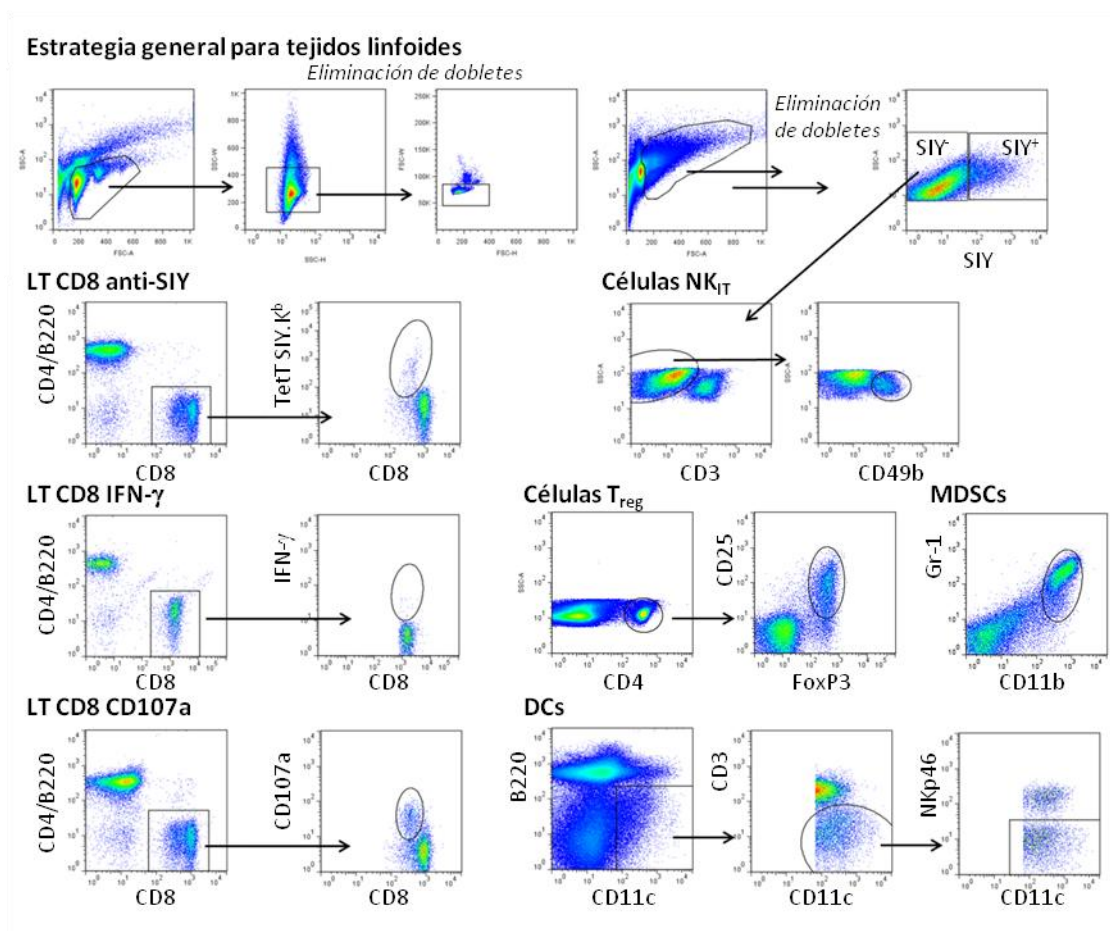
temperatura de ambiente y oscuridad con tetrámeros de moléculas del MHC de clase I H-2K<sup>b</sup> acoplados al péptido SIY o al péptido SIINFEKL (OVA) marcados con el fluorocromo PE (Immudex). Posteriormente las células se lavaron por agregado de 1% de SFB en PBS, se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos y se prosiguió con el protocolo de marcación con Acs  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -B220. Los Ac  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -B220 se incorporan a esta marcación, debido a la baja frecuencia de LT CD8 antígeno-específicos, ya que permiten excluir del análisis células que pueden contribuir a la marca inespecífica.

**Determinación de IFN- $\gamma$  intracitoplasmático:** las células fueron marcadas con Acs  $\alpha$ -CD8,  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -B220, fijadas con paraformaldehído (PFA) 1% en PBS y permeabilizadas con Perm Buffer II (BD) durante 10 minutos. A continuación se incubaron durante 30 minutos con el Ac  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  a 4°C, se lavaron por agregado de 1% de SFB en PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron en 120  $\mu$ L de PFA 1% en PBS. Nuevamente, los Ac  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -B220 se incorporaron a esta marcación, debido a la baja frecuencia de LT CD8 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, ya que permiten excluir del análisis células que pueden contribuir a la marca inespecífica.

**Marcación de FoxP3:** las células fueron marcadas con Acs  $\alpha$ -CD4 y  $\alpha$ -CD25, fijadas y permeabilizadas con el reactivo Fix&Perm (BD). Después, se incubaron 30 minutos con el Ac  $\alpha$ -FoxP3 a 4°C, se lavaron por agregado de 1% de SFB en PBS y se centrifugaron a 600 g durante 5 minutos. Luego de descartar el sobrenadante, se resuspendieron en 120  $\mu$ L de PFA 1% en PBS.

En todos los casos las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (versión 7.6, Tree Star). En la **Figura 5** se observan *dot plots* representativos que muestran las estrategias empleadas para analizar las poblaciones celulares señaladas.





**Figura 5: Estrategias empleadas para analizar las diferentes poblaciones celulares.**

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para analizar la significancia de las diferencias observadas entre los diferentes grupos experimentales se utilizó el programa Prism 6 (versión 6.01, GraphPad); se aplicó un test t de Student no pareado cuando se compararon dos grupos experimentales, un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con el test posthoc de Tukey para la comparación entre dos o más grupos experimentales respecto a un grupo considerado control, mientras que para estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación se empleó un ANOVA de dos vías con el test posthoc de Sidak.

### ANTICUERPOS

Los Ac monoclonales utilizados se encuentran enlistados en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Acs monoclonales utilizados para citometría de flujo (FC) y ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo*.**

| Reactividad   |        | Clon      | Fluorocromo | Marca            | Uso             |
|---------------|--------|-----------|-------------|------------------|-----------------|
| B220          | ratón  | RA3-6B2   | FITC        | BD Biosciences   | FC              |
|               |        |           | PerCP-Cy5.5 | BD Biosciences   | FC              |
| CD107a        | ratón  | ID4B      | FITC        | Biolegend        | FC              |
| CD11b         | ratón  | M1/70     | APC.Cy7     | eBioscience      | FC              |
| CD11c         | ratón  | N418      | PE.Cy7      | eBioscience      | FC              |
| CD25          | ratón  | PC61      | PE          | BD Biosciences   | FC              |
| CD27          | ratón  | LG.3A10   | FITC        | Biolegend        | FC              |
| CD3           | humano | UCHT1     | FITC        | eBioscience      | FC              |
|               | ratón  | 17A.2     | FITC        | Biolegend        | FC              |
|               |        |           | PE.Cy7      | Biolegend        | FC              |
| CD4           | ratón  | RM4-5     | FITC        | Biolegend        | FC              |
|               |        |           | PerCP-Cy5.5 | Biolegend        | FC              |
| CD44          | ratón  | IM7       | PE.Cy7      | Tonbo bioscience | FC              |
| CD49b         | ratón  | DX5       | PE          | Biolegend        | FC              |
|               |        |           | PE.Cy7      | eBioscience      | FC              |
| CD56          | humano | N901      | APC         | Beckman Coulter  | FC              |
| CD62L         | ratón  | MEL-14    | PE          | Tonbo bioscience | FC              |
| CD8           | ratón  | YTS 169.4 | -           | No comercial     | <i>in vivo</i>  |
|               |        | 53-6.7    | APC         | eBioscience      | FC              |
|               |        |           | PE          | BD Biosciences   | FC              |
|               |        |           | PerCP-Cy5.5 | BD Biosciences   | FC              |
| CD86          | ratón  | GL-1      | PE          | Tonbo bioscience | FC              |
| CI            |        | C1.18.4   | -           | BioXCell         | <i>in vivo</i>  |
|               |        | LTF-2     | -           | Tonbo bioscience | <i>in vitro</i> |
|               |        | RTK2758   | APC         | Biolegend        | FC              |
|               |        | RTK4530   | PE          | Biolegend        | FC              |
| FoxP3         | ratón  | FJK-16s   | APC         | eBioscience      | FC              |
| Gr-1          | ratón  | RB6.8C5   | PE.Cy7      | Biolegend        | FC              |
| IFN- $\gamma$ | ratón  | XMG1.2    | -           | Tonbo bioscience | <i>in vitro</i> |
|               |        |           | A.647       | Biolegend        | FC              |
| KLRG1         | ratón  | 2F1       | FITC        | Tonbo bioscience | FC              |
| Ly6C          | ratón  | HK1.4     | PerCP       | Biolegend        | FC              |
| NK1.1         | ratón  | PK136     | -           | BioXCell         | <i>in vivo</i>  |
| NKG2D         | ratón  | 191004    | -           | R&D Systems      | <i>in vitro</i> |
| NKp46         | ratón  | 29A1.4    | A.647       | eBioscience      | FC              |
| PD-1          | ratón  | 29F.1A12  | APC         | eBioscience      | FC              |
| PD-L1         | humano | 29E.2A3   | PE.Cy7      | Biolegend        | FC              |
|               | ratón  | 10F.9G2   | -           | No comercial     | <i>in vitro</i> |
|               |        |           | PE          | Tonbo bioscience | FC              |
| Rae-1         | ratón  | 186107    | APC         | R&D Systems      | FC              |

# RESULTADOS

“-Piensa que la vida es como una caja de galletas. (...).

En una caja de galletas hay muchas clases distintas de galletas. Algunas te gustan y otras no. (...).

-Eso es filosofía.

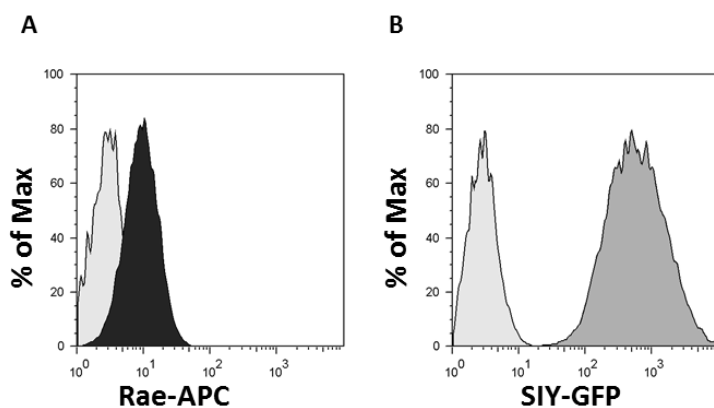
-Pero es cierto. Yo lo he aprendido de manera empírica.”

Haruki Murakami, *Tokio blues (Norwegian Wood)*

## RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL FRENTE AL FIBROSARCOMA MC57.SIY

### EL FIBROSARCOMA MC57.SIY

Con el objetivo de estudiar el rol de las células NK en la activación espontánea de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, empleamos la línea celular MC57 establecida a partir de un fibrosarcoma generado en un ratón de la cepa C57BL/6 por tratamiento con metilcolantreno. Estas células expresan naturalmente moléculas de la familia de Rae-1 (**Figura 6 A**), lo que las hace susceptibles al reconocimiento por células NK a través del receptor NKG2D. A su vez, las células MC57 fueron transducidas para expresar el antígeno modelo SIY acoplado a GFP, dando lugar a la línea celular MC57.SIY (246). De esta forma, la expresión de GFP no sólo permite monitorear la expresión del antígeno (**Figura 6 B**), sino que también facilita la identificación de células tumorales en muestras complejas. El antígeno modelo SIY es un péptido de 8 aminoácidos que puede ser presentado en el contexto de la molécula de MHC de clase I H-2K<sup>b</sup> expresada en las células de ratón de la cepa C57BL/6 y puede activar LT CD8 específicos por presentación cruzada (246).

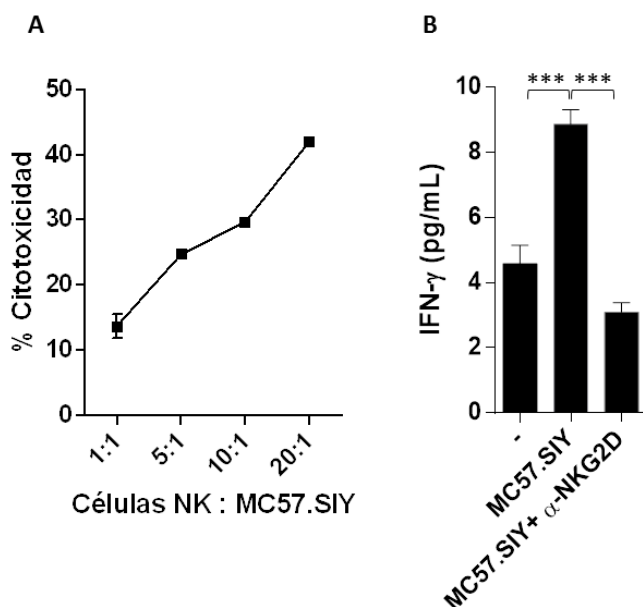


**Figura 6: El fibrosarcoma MC57.SIY.** Citometría de flujo de la línea celular MC57.SIY *in vitro*. Histogramas representativos para Rae-1 (A) y SIY (B).

### CÉLULAS NK FRENTE AL FIBROSARCOMA MC57.SIY: FUNCIONES EFECTORAS Y FENOTIPO

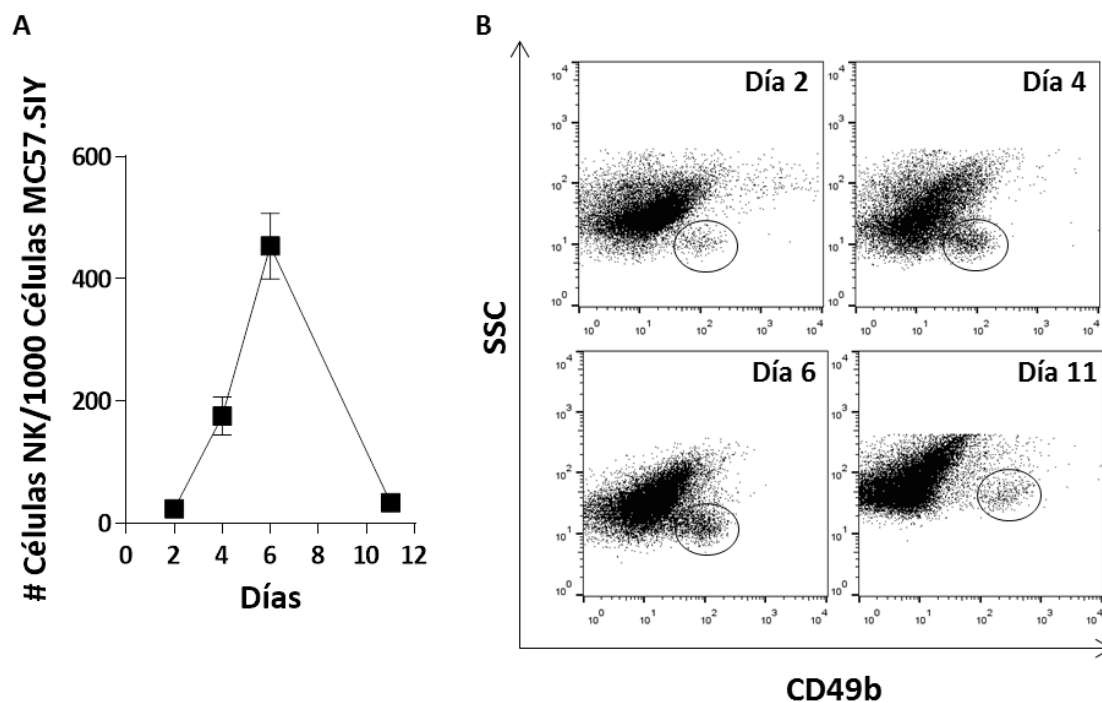
A continuación, evaluamos la respuesta funcional de las células NK frente a células MC57.SIY. Ensayos de citotoxicidad *in vitro* mostraron que las células NK aisladas de bazo de ratones sanos fueron capaces de lisar células de la línea MC57.SIY (**Figura 7 A**). Estas células también promovieron la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK y pudimos comprobar que dicha secreción fue dependiente de NKG2D, ya que al bloquear este receptor utilizando un Ac específico durante el co-cultivo se inhibió la producción de

IFN- $\gamma$  (**Figura 7 B**). De esta manera, confirmamos que las células NK son capaces de reconocer a las células de la línea MC57.SIY y ejercer sus funciones efectoras.



**Figura 7: Funciones efectoras de las células NK en respuesta a las células MC57.SIY *in vitro*.** Células NK aisladas a partir de bazos de ratones *naive* fueron cultivadas junto con células MC57.SIY. A) Ensayo de citotoxicidad por P-JAM luego de 6 h de co-cultivo en diferentes relaciones de células efectoras y células *target* (E:T), n=2. B) Secreción de IFN- $\gamma$  determinado por ELISA en sobrenadantes luego de 24 h de co-cultivo en una relación E:T de 1:3. Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de 5 experimentos independientes; \*\*\*, p<0,001 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

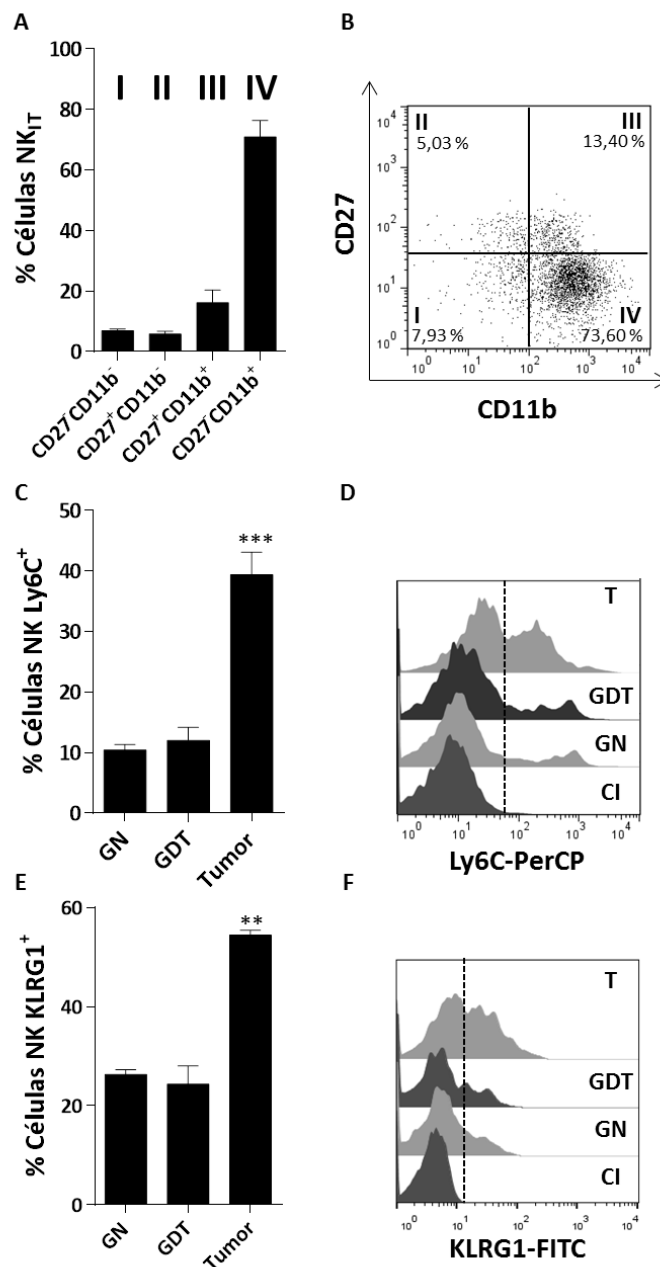
Con el objeto de evaluar si las células NK son capaces de infiltrar los tumores *in vivo*, inyectamos ratones por vía subcutánea con una suspensión de células MC57.SIY. A distintos tiempos post-desafío, extrajimos los tumores y cuantificamos las células NK (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) por citometría de flujo, relativizándolas al número de células tumorales (GFP<sup>+</sup>). Observamos que las células NK intratumorales (NK<sub>IT</sub>) fueron detectables a partir del segundo día y la mayor proporción de células NK se observó seis días luego del desafío, para desaparecer casi completamente en el día 10 (**Figura 8 A y B**).



**Figura 8: Células NK *in vivo*.** Ratones desafiados con el tumor MC57.SIY fueron sacrificados en los días señalados y se determinó la presencia de células NK ( $CD49b^+$ , en la población  $CD3^+SIY^-$ ) en las muestras de tumor por citometría de flujo. A) *Dot plots* representativos de las células  $CD3^+$ . B) Número de células NK cada 1000 células MC57.SIY ( $GFP^+$ ).

Considerando que en otros modelos el microambiente tumoral puede favorecer la acumulación de células NK inmaduras (144), decidimos estudiar el estado de maduración de las células NK que infiltran los tumores MC57.SIY, definido de acuerdo a la expresión diferencial de los marcadores CD27 y CD11b (134). Observamos que las células  $NK_{IT}$  corresponden en su mayoría a la subpoblación terminalmente diferenciada  $CD11b^+CD27^-$  (Figura 9 A y B) que, según se ha reportado, pueden perder capacidad proliferativa y presentar funciones efectoras disminuidas. Recientemente, se ha descrito una subpoblación de células NK maduras que expresan altos niveles de Ly6C; éstas se encuentran en estado quiescente y muestran una baja capacidad de producir  $IFN-\gamma$  y granzima B (135). Es por esto que evaluamos la expresión de Ly6C en las células NK en nuestro modelo y encontramos un aumento significativo en la proporción de células NK  $Ly6C^+$  en el tumor respecto a los ganglios linfáticos (Figura 9 C y D). Se ha reportado también que ante la estimulación sostenida, las células NK resultan maduras pero hiporrespondedoras y se caracterizan por expresar KLRG1 (138). Por lo tanto determinamos la expresión de esta molécula y observamos un aumento estadísticamente significativo de la subpoblación de células NK  $KLRG1^+$  en el tumor respecto de los ganglios linfáticos

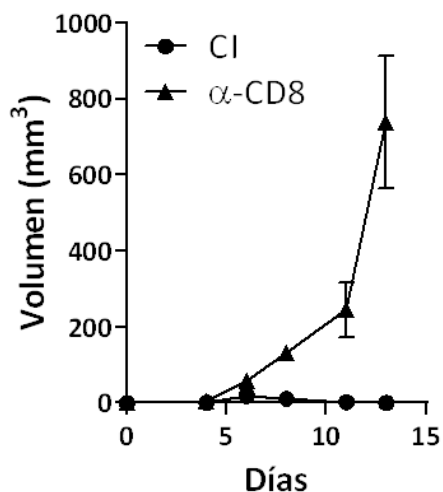
(Figura 9 E y F). Estos resultados muestran que las células NK<sub>IT</sub> presentan un fenotipo alterado, compatible con células terminalmente diferenciadas, de baja capacidad proliferativa y una respuesta efectora deficiente.



**Figura 9: Fenotipo de las células NK en el microambiente tumoral.** Grupos de ratones fueron inyectados con PBS (naive) o desafiados con el tumor MC57.SIY y 6 días más tarde se obtuvieron los ganglios linfáticos de los ratones naive (GN), y los ganglios linfáticos drenantes del tumor (GDT) y los tumores de los ratones portadores para analizar por citometría de flujo. A) Porcentaje de las subpoblaciones definidas por la expresión de CD11b y de CD27 (estadios I a IV) dentro de las células NK<sub>IT</sub> (CD49b<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>), (B) *dot plot* representativo. Porcentaje de células NK Ly6C<sup>+</sup> (C y D) y KLRG1<sup>+</sup> (E y F), (D) y (F) son histogramas representativos. n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

### ACTIVACIÓN ESPONTÁNEA DE LT CD8 ANTI-SIY *IN VIVO*

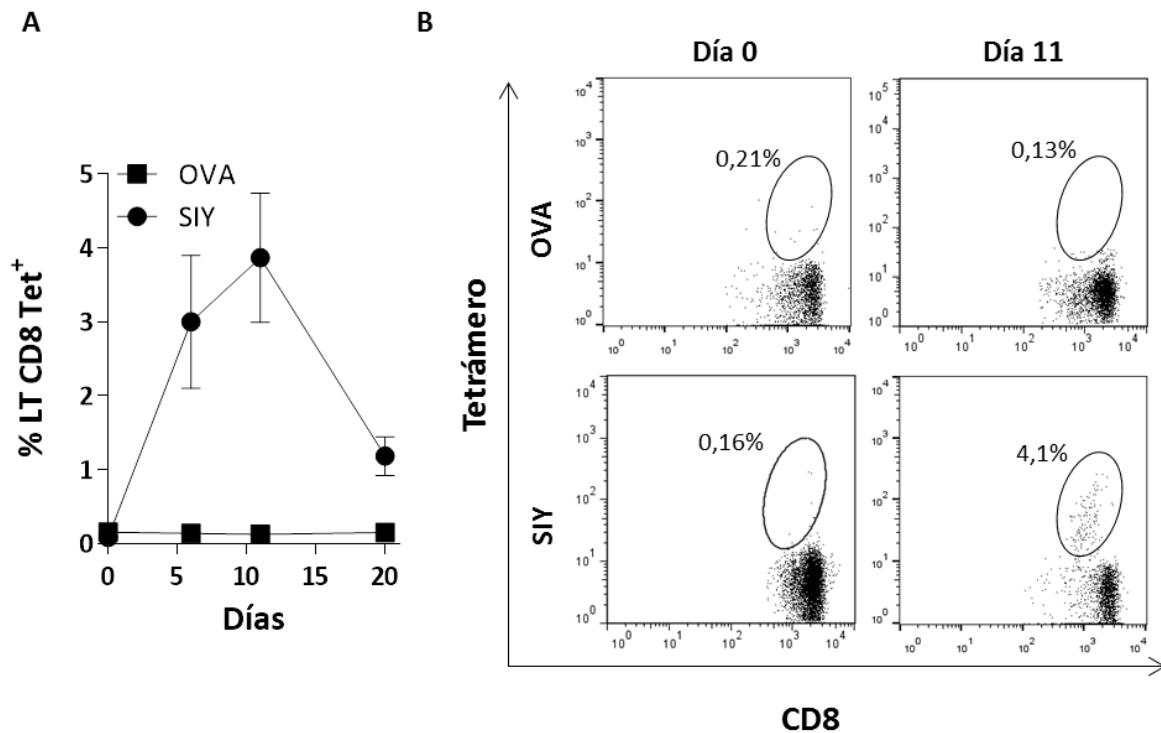
Con el fin de caracterizar el rol de los LT CD8 frente al tumor MC57.SIY *in vivo*, realizamos una cinética de crecimiento del tumor MC57.SIY en ratones inmunocompetentes o depletados de LT CD8 y pudimos corroborar que el rechazo de este tumor depende de la respuesta mediada por LT CD8 (247) (**Figura 10**).



**Figura 10: Rol de los LT CD8 en el crecimiento del tumor MC57.SIY.** Volumen tumoral en ratones desafiados con el tumor MC57.SIY tratados con CI (●) o depletados de LT CD8 (▲). n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Teniendo en cuenta estos resultados, estudiamos la cinética de la expansión *in vivo* de los LT CD8 específicos durante el desarrollo y rechazo del tumor MC57.SIY. Es posible detectar y cuantificar LT CD8 antígeno-específicos por citometría de flujo mediante la utilización de tetrámeros de moléculas H-2K<sup>b</sup>, acopladas al péptido SIY (antígeno expresado por las células tumorales) o al péptido SINFEKEL de OVA (como control de activación inespecífica), marcados con un fluorocromo. Utilizando esta estrategia, pudimos detectar LT CD8 anti-SIY en muestras de sangre de ratones a partir del sexto día luego de la inoculación del tumor MC57.SIY, alcanzándose el porcentaje máximo hacia el día 11, coincidente con el rechazo tumoral, para luego descender. Cabe destacar que la activación de los LT CD8 anti-tumorales es específica, puesto que no se detectó expansión frente a antígenos no relacionados como OVA (**Figura 11 A y B**). Teniendo en cuenta que los ratones no recibieron ningún tratamiento adicional, podemos observar que la activación de los LT CD8 anti-tumorales comienza espontáneamente.





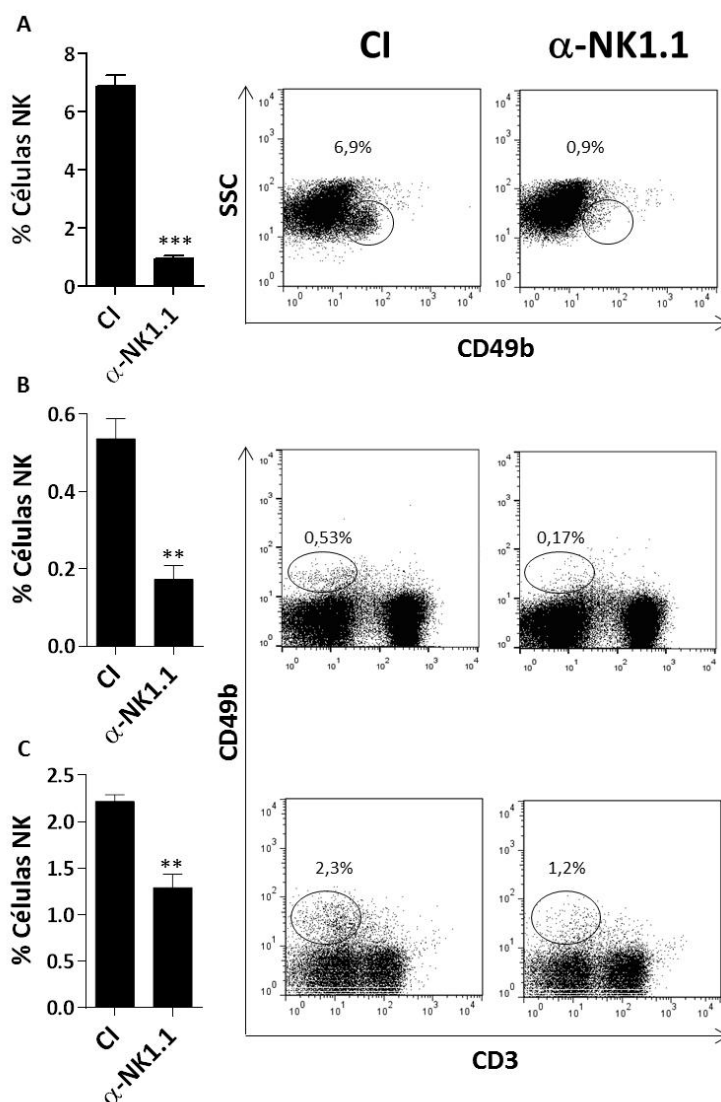
**Figura 11: Cinética de la expansión de LT CD8 anti-SIY.** Se obtuvieron muestras de sangre de ratones desafiados con el tumor MC57.SIY en los días señalados y se determinó el porcentaje de LT CD8 Tet<sup>+</sup> anti-OVA (■) y anti-SIY (●) en la población B220<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo. A) n=4, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes. B) Dot plots representativos antes del desafío (día 0) y al día 11 post-desafío con el tumor.

- Las células NK reconocen a las células MC57.SIY y se activan *in vitro*; sin embargo, aunque *in vivo* infiltran el tumor, presentan un fenotipo exhausto.
- Los LT CD8 anti-SIY se activan espontáneamente y alcanzan su máxima frecuencia hacia el día 11 post-desafío tumoral.

## ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA ACTIVACIÓN ESPONTÁNEA DE LT CD8 ANTI-SIY

### DEPLECIÓN DE CÉLULAS NK IN VIVO

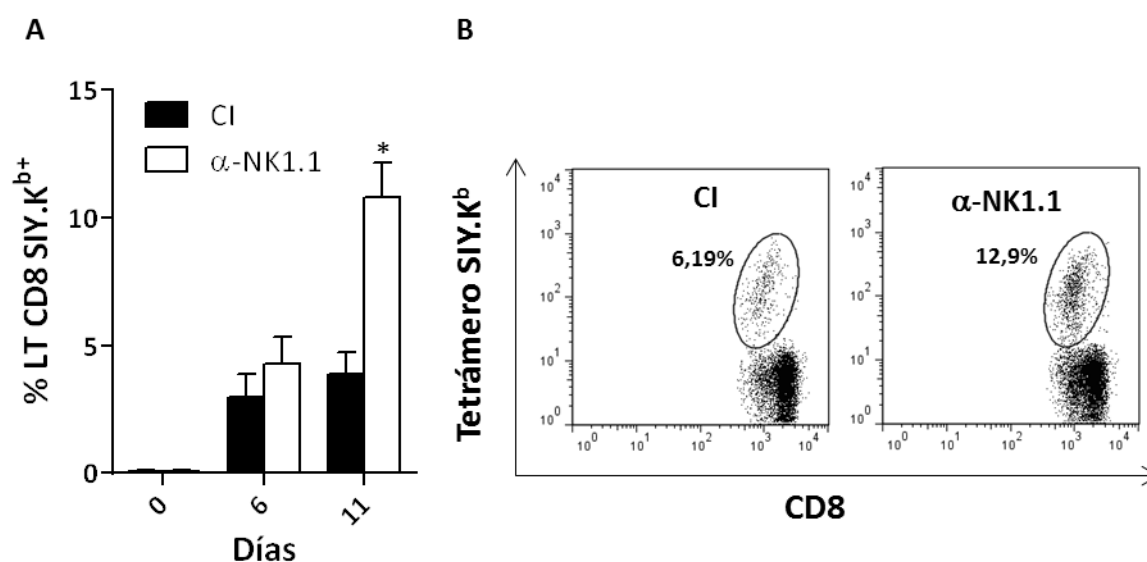
A los fines de evaluar el rol de las células NK en la activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, uno de los abordajes posibles requiere comparar un grupo control con un grupo de ratones depletado de células NK desde el momento inicial del desafío tumoral hasta el día del análisis. Luego de optimizar la dosis y la frecuencia de administración del Ac depletante  $\alpha$ -NK1.1, elegimos el tratamiento adecuado (datos no mostrados). Si bien el tratamiento no eliminó completamente a las células NK, notamos que la proporción de estas células disminuyó significativamente en los ratones tratados con  $\alpha$ -NK1.1 en comparación con aquellos que recibieron el CI; esto se observó tanto en el tumor, como en el bazo y los GDT (**Figura 12 A-C**).



**Figura 12: Depleción de células NK.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1, fueron desafiados con el tumor MC57.SIY y 6 días más tarde se determinó el porcentaje de células NK por citometría de flujo en (A) tumor ( $CD49b^+$ , en la población  $CD3^+SIY^-$ ), (B) GDT y (C) bazo ( $CD49b^+CD3^-$ ).  $n=4$ , los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 5 experimentos independientes; \*\*,  $p<0,01$ , \*\*\*,  $p<0,001$  (t de Student). A la derecha, dot plots representativos.

### ROL DE LAS CÉLULAS NK SOBRE LA EXPANSIÓN DE LOS LT CD8 ANTI-SIY

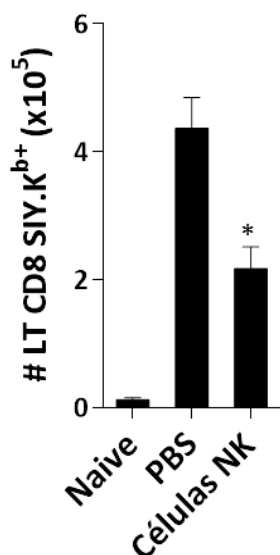
Con el objetivo de estudiar el rol de las células NK sobre los LT CD8, desafiamos ratones depletados o no de células NK con el tumor MC57.SIY y a distintos tiempos luego del desafío, determinamos el porcentaje de LT CD8 específicos anti-SIY en sangre periférica. Si bien la expansión inicial de los LT CD8 específicos no se ve modificada por la depleción de células NK, llamativamente, 11 días luego del desafío observamos un aumento significativo en el porcentaje de LT CD8 específicos anti-SIY en los ratones depletados de células NK comparado con los ratones control (**Figura 13 A y B**). Esta diferencia en la expansión es antígeno-específica ya que no se observaron cambios en el porcentaje de LT CD8 específicos anti-OVA (datos no mostrados).



**Figura 13: Efecto de la depleción de células NK en la expansión de LT CD8 específicos anti-SIY.** Se obtuvieron muestras de sangre de ratones desafiados con el tumor MC57.SIY, tratados con CI (■) o con el Ac α-NK1.1 (□), en los días señalados y se determinó el porcentaje de LT CD8 SIY.K<sup>b</sup>+ en la población B220<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo. A) n=4, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 3 experimentos independientes; \*, p<0,05 (ANOVA de 2 vías con test post-hoc de Sidak). B) Dot plots representativos al día 11 post-desafío con el tumor.

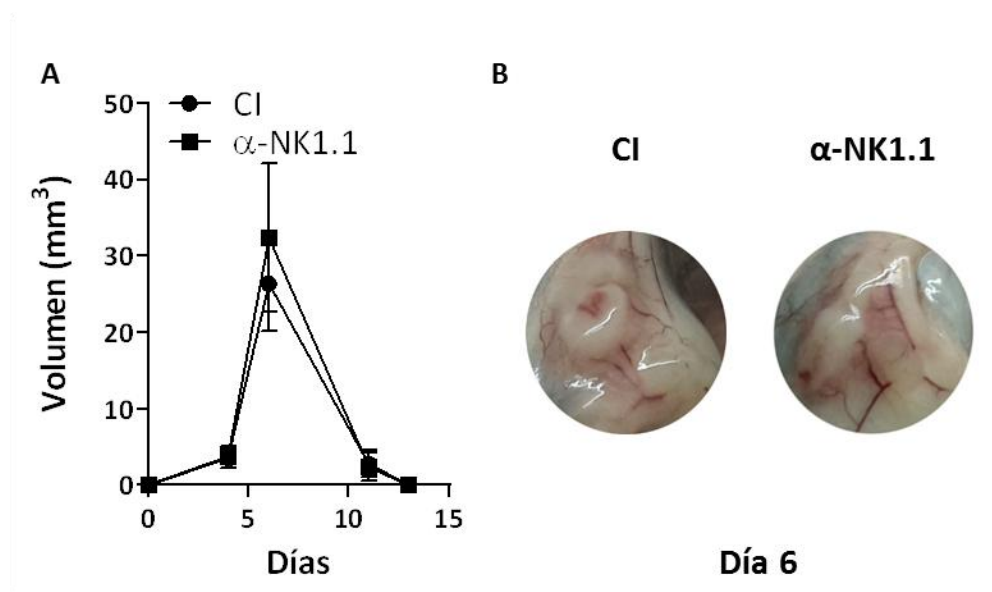
El Ac α-NK1.1 además de inducir la depleción de células NK, puede depletar de células NKT, por lo tanto, para corroborar que el efecto observado es debido a la acción de células NK decidimos utilizar un abordaje diferente y transferimos, directamente en el microambiente tumoral, células NK (aisladas por *cell sorting* a partir de bazo de ratones *naive*). En este caso, observamos que aquellos ratones que recibieron una inyección intratumoral de células NK presentaron una menor expansión de LT CD8 anti-SIY que

aquellos que recibieron PBS (**Figura 14**). En conjunto estos resultados demuestran que las células NK restringen la expansión de los LT CD8 específicos anti-SIY durante la respuesta inmune anti-tumoral.



**Figura 14: Efecto de la transferencia de células NK en la expansión de LT CD8 específicos anti-SIY.** Dos grupos de ratones fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, luego de 3 días recibieron una inyección intratumoral de PBS o de 75000 células NK, 3 días más tarde fueron sacrificados y se determinó el número total de LT CD8 SIY.Kb<sup>+</sup> en bazo por citometría de flujo. n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*, p<0,05 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

Si las células NK contribuyen a la eliminación de este tumor, la diferencia observada en la expansión de LT CD8 podría deberse simplemente a una menor cantidad de masa antigénica causada por las funciones anti-tumorales clásicas descritas en las células NK. Para explorar esta hipótesis determinamos el volumen del tumor MC57.SIY en grupos de ratones depletados o no de células NK. En concordancia con lo reportado previamente (248), encontramos que si bien los tumores crecieron alcanzando un volumen máximo de 30 mm<sup>2</sup> 6 días después del desafío, 13 días más tarde fueron rechazados tanto en el grupo tratado con CI como en el grupo depletado de células NK (**Figura 15 A y B**). De esta forma, comprobamos que las células NK no participan del rechazo del tumor en este modelo y, el hecho de que en ambos grupos de ratones los tumores alcancen el mismo volumen, sugiere que el defecto en la expansión de los LT CD8 anti-SIY no se debe a que existe una diferencia en la masa antigénica.

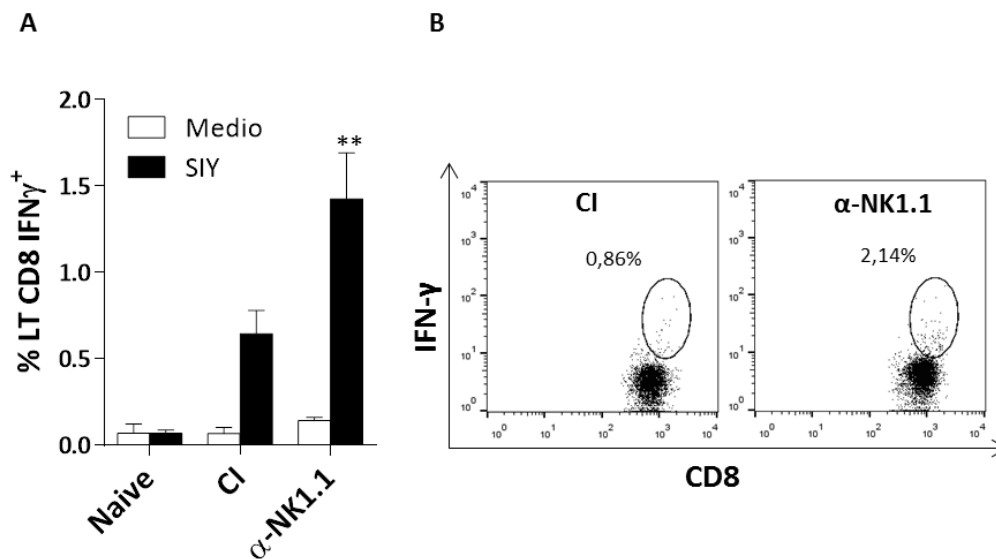


**Figura 15: Rol de las células NK en el crecimiento del tumor MC57.SIY.** A) Volumen tumoral en ratones desafiados con el tumor MC57.SIY tratados con CI (●) o depletados de células NK (■). n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de al menos 2 experimentos independientes. B) Fotografía representativa de los tumores de ambos grupos de ratones al día 6.

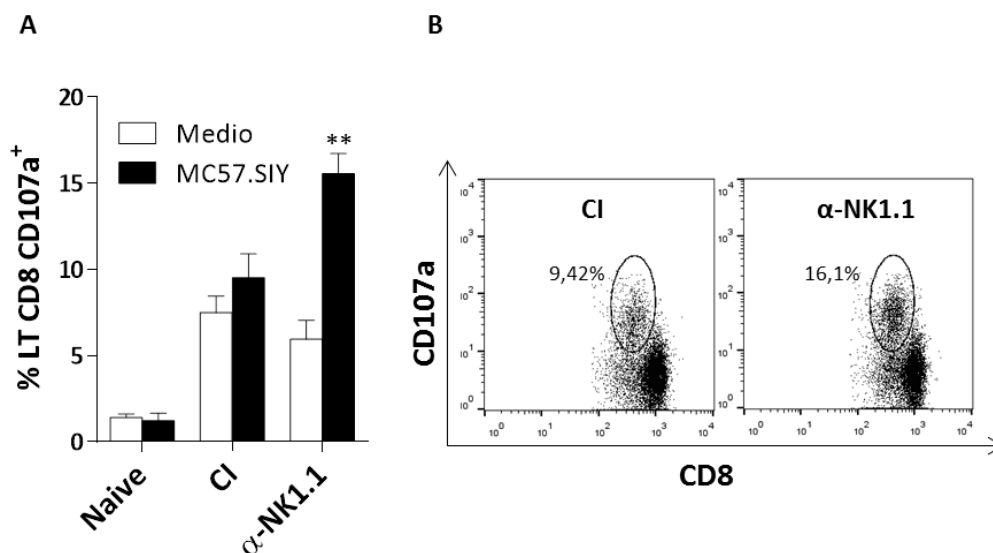
#### **ROL DE LAS CÉLULAS NK SOBRE LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LOS LT CD8 CONTRA ANTÍGENOS TUMORALES**

A continuación, nos propusimos determinar si los LT CD8 anti-SIY expandidos en ausencia de células NK son funcionalmente activos. Para esto, nuevamente desafiábamos ratones depletados o no de células NK con el tumor MC57.SIY y evaluamos la capacidad de los LT CD8 anti-SIY de producir IFN- $\gamma$  y de degranular. En primer lugar, obtuvimos células a partir de muestras de sangre de los ratones, las re-estimulamos con el péptido SIY *in vitro* y evaluamos la producción de IFN- $\gamma$  por citometría de flujo. Llamativamente, encontramos un mayor porcentaje de LT CD8 productores de IFN- $\gamma$  en los ratones depletados de células NK, comparado con el grupo control (**Figura 16**).

La degranulación en los LT CD8, reflejada por la detección de CD107a en superficie, se asocia a su capacidad citotóxica. En concordancia con los resultados previos, encontramos una mayor proporción de LT CD8 CD107a<sup>+</sup> luego del co-cultivo con las células MC57.SIY en los ratones depletados de células NK, comparado con el grupo control (**Figura 17**). Por lo tanto, nuestros resultados indican que la depleción de las células NK induce un aumento en las principales funciones efectoras de los LT CD8.



**Figura 16: Producción de IFN- $\gamma$  en los LT CD8 por re-estímulo con el péptido SIY.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, 6 días más tarde se obtuvieron muestras de sangre y se determinó el porcentaje de LT CD8 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población B220<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> luego del re-estímulo con el péptido SIY (■) o medio (□) por citometría de flujo. A) n=12, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de 3 experimentos independientes combinados; \*\*, p<0,01 (ANOVA de 2 vías con test post-hoc de Sidak). B) *Dot plots* representativos.

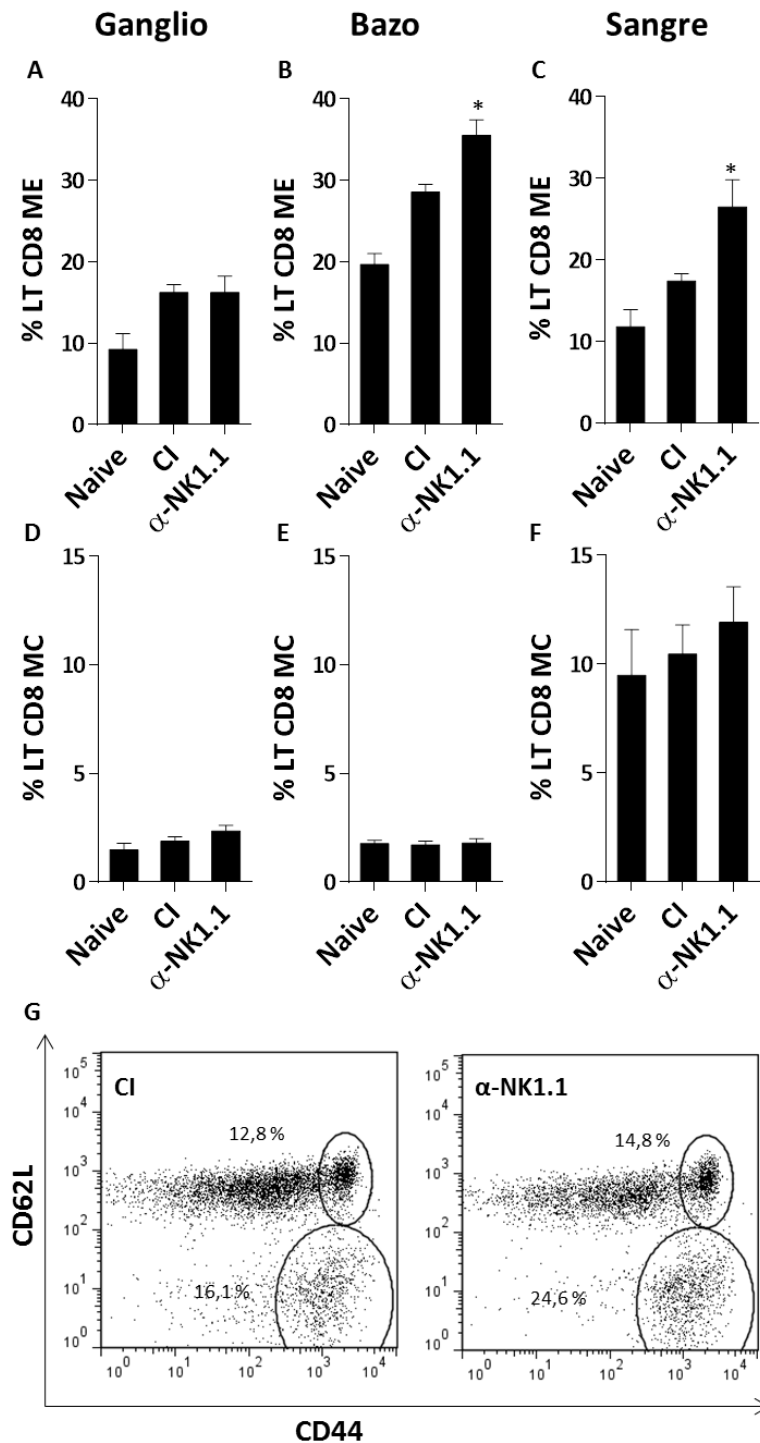


**Figura 17: Degranulación en los LT CD8 por co-cultivo con las células MC57.SIY.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, 11 días más tarde se obtuvieron muestras de sangre y se determinó el porcentaje de LT CD8 CD107a<sup>+</sup> en la población B220<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> luego del re-estímulo con células MC57.SIY (■) o medio (□) por citometría de flujo. A) n=12, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de 3 experimentos independientes combinados; \*\*, p<0,01 (ANOVA de 2 vías con test post-hoc de Sidak). B) *Dot plots* representativos.

**ROL DE LAS CÉLULAS NK SOBRE EL COMPARTIMENTO DE MEMORIA DE LT**

Puesto que la diferenciación de LT *naïve* en células de memoria ocurre temprano durante la fase de activación y expansión (249), y nuestros resultados indican que las células NK limitan la expansión de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, evaluamos el rol de las células NK en la generación de las subpoblaciones de memoria central (MC) y memoria efectora (ME) de LT CD8 luego del desafío con el tumor MC57.SIY. Para lo cual, analizamos el porcentaje de LT CD8<sub>ME</sub> (CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) (**Figura 18 A-C**) y de LT CD8<sub>MC</sub> (CD62L<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>) (**Figura 18 D-F**) en los GDT, bazo y sangre de ratones desafiados con el tumor MC57.SIY tratados con CI o depletados de células NK. Luego de 11 días del desafío con el tumor, no encontramos diferencias en los porcentajes de LT CD8<sub>MC</sub> en los ratones depletados de células NK en comparación con los ratones control. Sin embargo, la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub> resultó mayor en bazo y sangre de los ratones depletados de células NK. Realizamos el mismo análisis sobre los LT CD4, pero no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de ratones (datos no mostrados).

Nuestros resultados demuestran que las células NK limitan la expansión de la población de LT CD8<sub>ME</sub>. Esta población se distribuye ampliamente por los tejidos y puede activarse directamente frente al encuentro con una célula que exprese su antígeno específico, lo que le confiere especial relevancia en la inmunidad anti-tumoral (82).



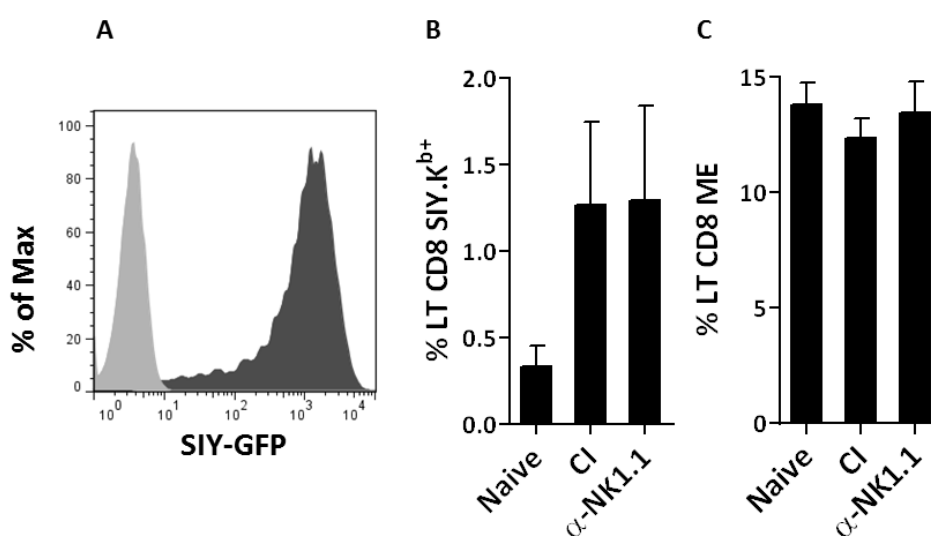
**Figura 18: Análisis de las subpoblaciones de memoria en los LT CD8.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, 11 días más tarde se determinó en los LT CD8 el porcentaje de células  $CD62L^-CD44^+$  (ME, A-C) y de células  $CD62L^+CD44^+$  (MC, D-F) en los GDT (A, D), en bazo (B, E) y en sangre (C, F) por citometría de flujo.  $n=4$ , los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*,  $p<0,05$  (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey). G) *Dot plots* representativos en sangre.



### ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA ACTIVACIÓN ESPONTÁNEA DE LT CD8 ANTI-SIY EN OTROS MODELOS TUMORALES

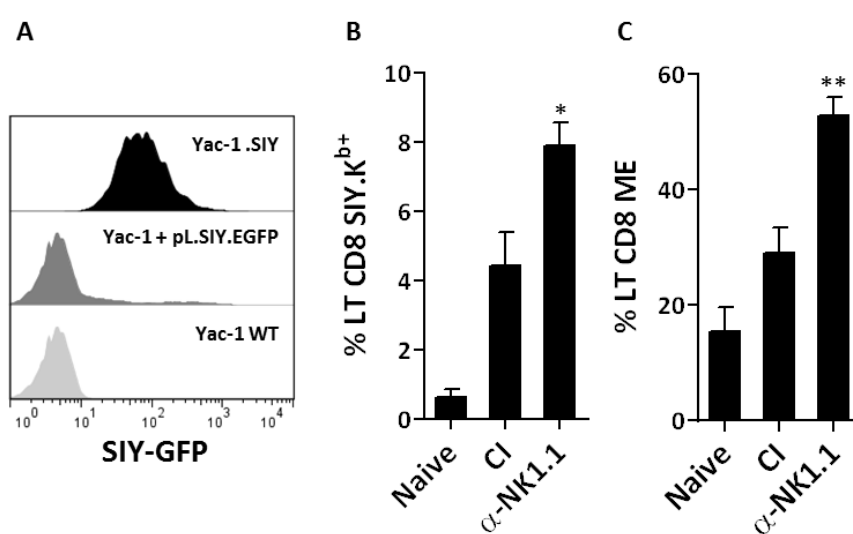
A continuación, con el fin de evaluar si los fenómenos descritos hasta el momento están restringidos al fibrosarcoma estudiado o si podrían ser extrapolados a tumores de otros orígenes, evaluamos la respuesta de los LT CD8 anti-SIY frente al melanoma B16.SIY y al linfoma Yac-1.SIY en ratones depletados o no de células NK.

La línea de melanoma B16 es muy poco inmunogénica, no expresa ningún ligando de NKG2D (250) y crece en ratones inmunocompetentes. Si bien las células B16.SIY expresan elevados niveles del péptido SIY (**Figura 19 A**), la expansión de LT CD8 específicos anti-SIY es mínima y no se observaron diferencias en su porcentaje entre los animales tratados con CI o depletados de células NK (**Figura 19 B**). En concordancia, tampoco se observó la diferenciación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub> en ninguno de los dos grupos de ratones desafiados con el melanoma (**Figura 19 C**), ya que se observaron porcentajes similares a los presentes en ratones *naive*.



**Figura 19: Rol de las células NK en la respuesta de los LT CD8 frente al melanoma B16.SIY.** A) Histograma que muestra la expresión de SIY (GFP) en la línea B16.SIY (histograma oscuro) y en la línea B16 WT (histograma claro). B y C) Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor B16.SIY y, 11 días más tarde, se obtuvieron muestras de sangre y se determinó (B) el porcentaje de LT CD8 SIY.K<sup>b+</sup> en la población B220<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> y (C) el porcentaje de LT CD8<sub>ME</sub> (células CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) en los LT CD8 por citometría de flujo. n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

Por otra parte, el linfoma Yac-1 expresa elevados niveles de ligandos de NKG2D (250) y tiene un defecto en la expresión de moléculas MHC de clase I, por lo que se la utiliza como línea celular *target* universal de las células NK de ratón. Esta línea celular fue transducida para expresar el péptido SIY y luego, por *cell sorting*, se obtuvo la línea celular Yac-1.SIY (**Figura 20 A**). En los ratones desafiados con las células Yac-1.SIY se produjo una expansión de los LT CD8 específicos anti-SIY, siendo mayor en el grupo de ratones depletado de células NK (**Figura 20 B**). Este resultado también se vio reflejado en la generación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub> (**Figura 20 C**).



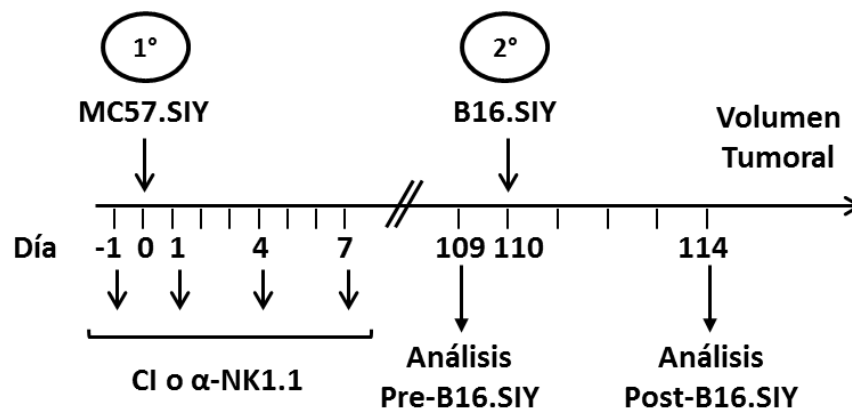
**Figura 20: Rol de las células NK en la respuesta de los LT CD8 frente al linfoma Yac-1.SIY.** A) Histograma que muestra la expresión de SIY en la línea Yac-1 WT, en la línea transducida con el virus pL.SIY.EGFP y en ésta luego del aislamiento de las células SIY<sup>+</sup>. B y C) Ratones tratados con CI o con el Ac α-NK1.1 fueron desafiados con el tumor Yac-1.SIY y, 11 días más tarde, se obtuvieron muestras de sangre y se determinó (B) el porcentaje de LT CD8 SIY.K<sup>b+</sup> en la población B220<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> y (C) el porcentaje de LT CD8<sub>ME</sub> (células CD62L<sup>-</sup>CD44<sup>+</sup>) en los LT CD8 por citometría de flujo. n=4, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*, p<0,05, \*\*, p<0,01 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

El conjunto de estos resultados demuestra que la capacidad de las células NK de inhibir la respuesta mediada por LT CD8 anti-tumorales no es exclusiva de un modelo. Sin embargo, el hecho de que las células NK no ejerzan una función regulatoria frente al melanoma B16.SIY sugiere que, para que se gatille este rol supresor, las células NK deben activarse frente al tumor.

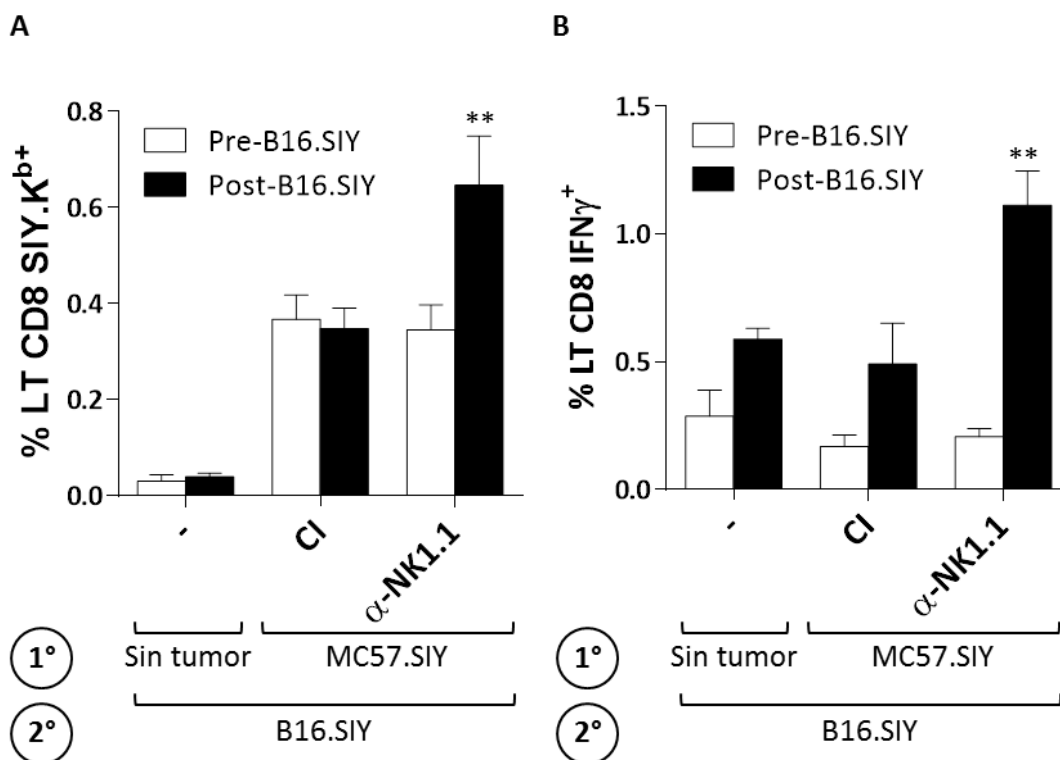
- Las células NK regulan la expansión de los LT CD8 anti-SIY frente al tumor MC57.SIY, comprometiendo además sus funciones efectoras y la generación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub>, sin modificar la cinética del rechazo tumoral.
- La inhibición de la expansión de los LT CD8 anti-SIY y de la generación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub> dependiente de células NK también se produce frente al desafío con las células *target* prototípicas Yac-1.SIY pero no frente al melanoma B16.SIY, modelo de tumor poco inmunogénico.

#### ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA RESPUESTA INMUNE ANTI-TUMORAL SECUNDARIA

Anteriormente, mostramos que si bien el efecto regulatorio de las células NK observado en la fase de activación de la respuesta inmune anti-tumoral no afecta el rechazo de un tumor inmunogénico, como MC57.SIY, limita la expansión de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub>. Esta población de memoria podría ser importante durante la respuesta inmune contra un tumor secundario que comparta antígenos con el primer tumor. Con el fin de evaluar la relevancia fisiopatológica de este fenómeno, estudiamos si los LT CD8 expandidos en ausencia de células NK pueden generar una respuesta efectiva contra un tumor secundario no inmunogénico. Para lo cual, desafiamos con el tumor MC57.SIY dos grupos de ratones, uno depletado de células NK y el otro tratado con CI (manteniendo el tratamiento con Acs sólo durante la fase de eliminación del tumor) y luego de 110 días, cuando el número de células NK volvió a los niveles normales, re-desafiamos ambos grupos de ratones con el tumor B16.SIY. Como control también se desafió con B16.SIY un grupo de ratones que no fue previamente inoculado con MC57.SIY, con el fin de evaluar en paralelo la respuesta primaria. Ambos tumores son de distinto origen, pero comparten el antígeno SIY, por lo tanto la respuesta secundaria se debe exclusivamente a los LT CD8 anti-SIY. Un día antes y cuatro días después del re-desafío, monitoreamos la respuesta específica anti-SIY en LT CD8 provenientes de muestras de sangre en todos los ratones (**Figura 21**).



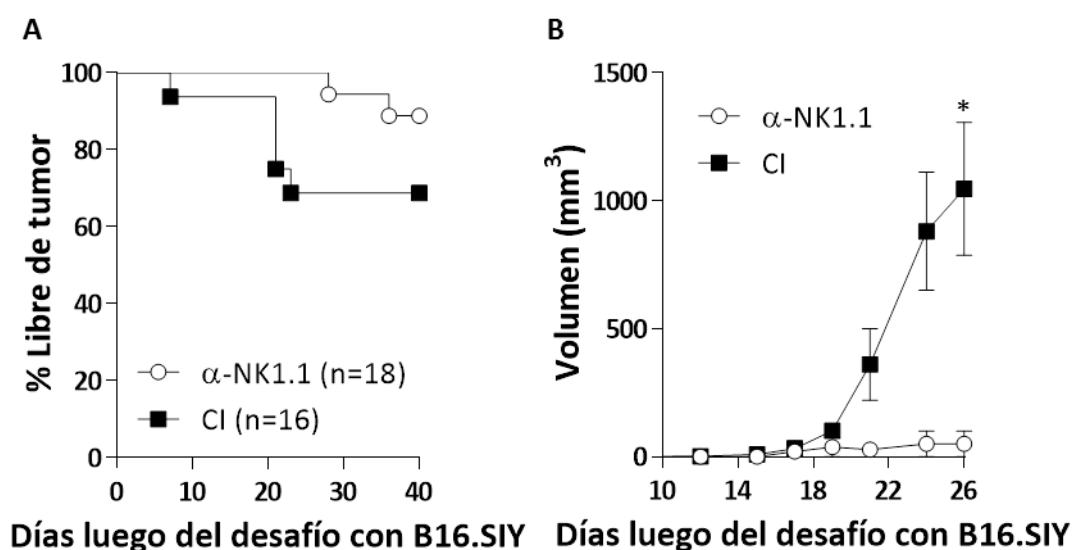
**Figura 21: Esquema que representa el diseño experimental empleado.** Dos grupos de ratones fueron desafiados con el tumor MC57.SIY y tratados con CI o  $\alpha$ -NK1.1 sólo durante la fase de activación. Luego de 110 días, estos mismos ratones fueron re-desafiados con el tumor B16.SIY. El día previo y 4 días después del re-desafío se tomaron muestras de sangre para analizar por citometría de flujo. Posteriormente, se realizó un seguimiento del volumen tumoral.



**Figura 22: Rol de las células NK en la respuesta inmune secundaria anti-tumoral.** Siguiendo el diseño experimental esquematizado en la figura 21, se obtuvieron muestras de sangre de los ratones control (-) y de los ratones que habían sido desafiados con el tumor MC57.SIY (tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1) el día previo ( $\square$ ) y 4 días después ( $\blacksquare$ ) del re-desafío con B16.SIY y se analizó la respuesta de los LT CD8 por citometría de flujo. Porcentaje de LT CD8 SIY.K<sup>b+</sup> (A) y de LT CD8 IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población B220<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>. A y B) n=9, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*\*, p < 0,01 (ANOVA de 2 vías con test post-hoc de Sidak).

Como se observa en la **Figura 22 A**, los ratones que habían sido desafiados con el tumor primario conservaban una población de LT CD8 anti-SIY expandida, incluso antes del re-desafío, sin embargo no se observaron diferencias entre el grupo de ratones que había sido previamente depletado de células NK o tratado con CI. Llamativamente, cuatro días después de la inoculación del tumor secundario observamos un aumento en el porcentaje de LT CD8 anti-SIY exclusivamente en los ratones que recibieron el primer tumor en ausencia de células NK. Consecuentemente, cuando evaluamos la funcionalidad de los LT CD8 en estos ratones, observamos que el grupo de ratones que había sido activado por el tumor primario en ausencia de células NK presentó un mayor porcentaje de LT CD8 productores de IFN- $\gamma$  (**Figura 22 B**). Estos resultados demuestran que la depleción de las células NK durante la activación de los LT CD8 anti-tumorales en la respuesta inmune primaria conduce a una respuesta inmune de memoria más eficiente.

A continuación, realizamos el seguimiento del desarrollo del tumor B16.SIY en ambos grupos de ratones. El porcentaje de ratones libres de tumor se muestra en la **Figura 23 A** empleando un gráfico de Kaplan-Meier. Observamos que el grupo de ratones que había recibido el primer tumor en ausencia de células NK resultó estar más protegido de la aparición del tumor B16.SIY ya que todos los animales de este grupo permanecieron libres de tumor hasta el día 27, tiempo en el que el 31,25% de los ratones que habían sido tratados con CI desarrollaron tumores de más de 200 mm<sup>3</sup>. Además, si consideramos la cinética del crecimiento tumoral de aquellos ratones que no rechazaron el tumor, observamos un retraso del crecimiento de B16.SIY en el grupo que había sido depletado de células NK (**Figura 23 B**). Estos resultados indican que cuando la activación de los LT CD8 anti-tumorales durante la respuesta inmune primaria ocurre en ausencia de células NK, el control del crecimiento de un tumor secundario es más eficiente.



**Figura 23: Rol de las células NK en el crecimiento del tumor secundario.** Siguiendo el diseño experimental esquematizado en la figura 21, se realizó el seguimiento del desarrollo del tumor B16.SIY en los ratones que habían sido previamente desafiados con el tumor MC57.SIY, tratados con CI (■) o con el Ac α-NK1 (○). A) Porcentaje de ratones libres de tumor, evaluado en un análisis Kaplan-Meier. B) Cinética del volumen tumoral de aquellos ratones que no rechazaron el tumor, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, datos acumulados de 2 experimentos independientes; \*,  $p < 0,05$  (t de Student).

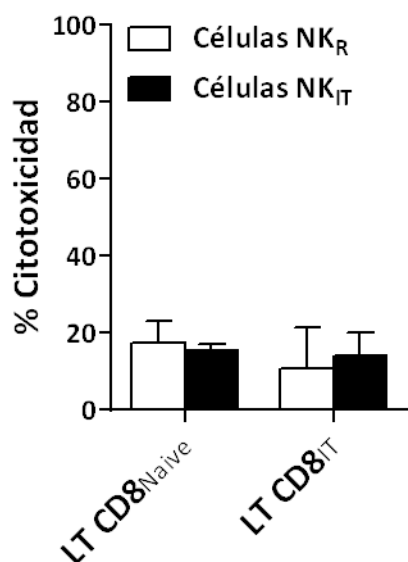
- La inhibición que las células NK ejercen sobre la activación de los LT CD8 anti-tumorales durante la respuesta inmune primaria conduce a una respuesta inmune de memoria menos eficiente.
- El rol regulatorio de las células NK tiene relevancia fisiopatológica ya que repercute en el control del crecimiento de un tumor secundario.

## MECANISMOS REGULATORIOS MEDIADOS POR CÉLULAS NK

Los resultados obtenidos nos permiten plantear dos hipótesis no excluyentes con respecto al mecanismo de acción de las células NK. Por un lado, y como se ha reportado en otros modelos (152,157), las células NK podrían regular de manera directa la subpoblación de los LT CD8 activados a través de su actividad citotóxica. Por otro lado, podrían ejercer una regulación indirecta de los LT CD8, a través de la secreción de factores inmunosupresores (167,168), del reclutamiento de células supresoras (150,151), de la modulación de la funcionalidad de las DCs (160-162) o, incluso, afectando la inmunogenicidad del tumor (199).

### ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LAS CÉLULAS NK SOBRE LOS LT CD8

Con el fin de determinar si las células NK que infiltran el tumor son capaces de eliminar a los LT CD8, realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vitro* utilizando células NK en reposo (*resting*) o células NK<sub>IT</sub> como efectoras y LT CD8 *naive* o LT CD8<sub>IT</sub> como células *target*. Pudimos observar que las células NK no modificaron la viabilidad de los LT CD8 (Figura 24), sugiriendo que el efecto inhibitorio observado no se debe a la citotoxicidad directa de las células NK sobre los LT CD8.

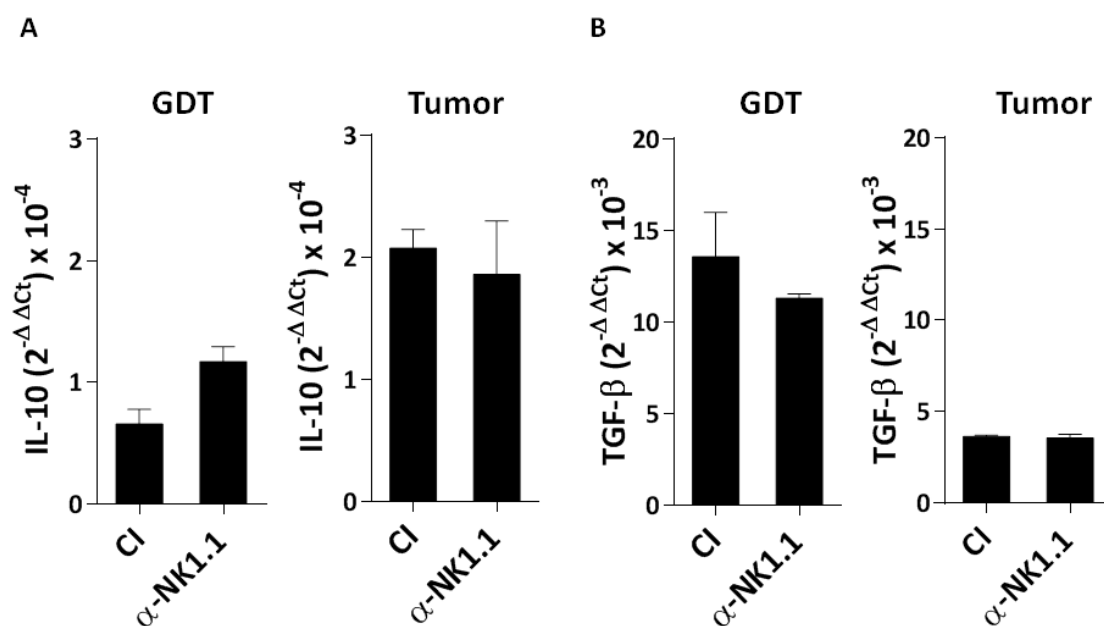


**Figura 24: Ensayo de citotoxicidad de células NK sobre LT CD8.** Se cultivaron LT CD8<sub>Naive</sub> o LT CD8<sub>IT</sub> en presencia o ausencia de células NK en reposo o células NK<sub>IT</sub> en relación 1:1 durante 18 h y se analizaron por citometría de flujo utilizando Zombie Green (ZG) para cuantificar las células no viables. n=2, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

### SECRECIÓN DE FACTORES INMUNOSUPRESORES

Se ha reportado en trabajos previos que las células NK son capaces de producir IL-10 (167,168) y TGF- $\beta$  (251), ambas citoquinas capaces de regular la respuesta de los LT de

forma directa e indirecta. Sin embargo, cuando estudiamos mediante *q-PCR* la expresión de los transcritos de IL-10 y TGF- $\beta$  en los tumores y en los GDT no hallamos diferencias entre el grupo tratado con CI y el depletado de células NK (**Figura 25 A y B**). Estos resultados indicarían que ni la secreción de IL-10 ni de TGF- $\beta$  están involucrados en el mecanismo regulatorio mediado por las células NK.

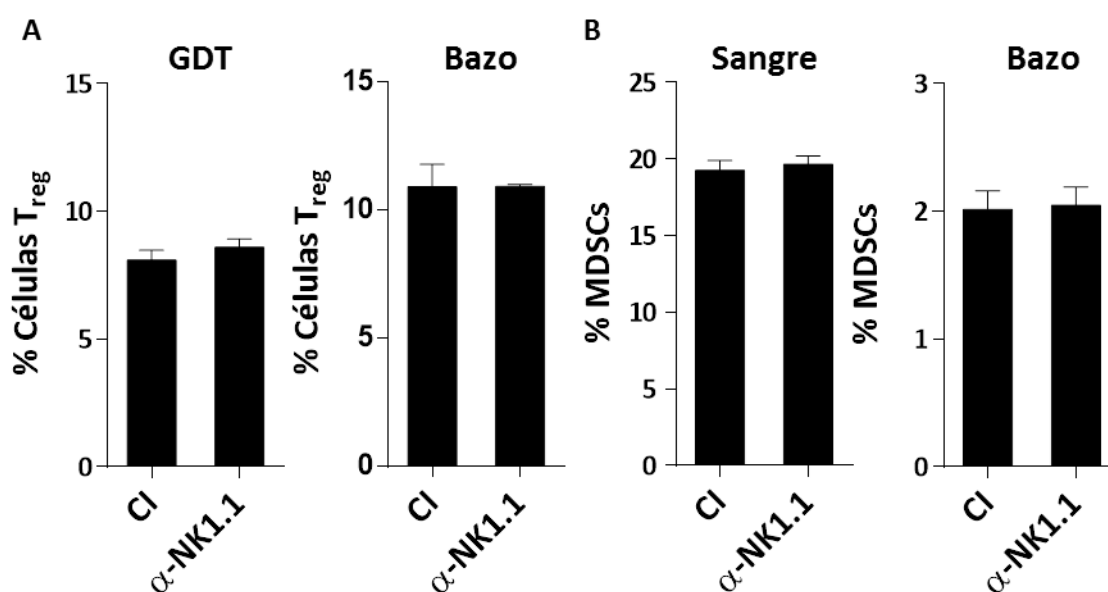


**Figura 25: Rol de las células NK en la expresión de IL-10 y TGF- $\beta$  en el microambiente tumoral.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, 6 días más tarde se obtuvieron los GDT y los tumores para determinar la expresión de IL-10 (A) y de TGF- $\beta$  (B) relativa a GAPDH por *q-PCR*.  $n=3$ , los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

#### RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS SUPRESORAS

Por otra parte, si bien las células NK son capaces de reclutar células T<sub>reg</sub> (150), no encontramos diferencias en el porcentaje de células T<sub>reg</sub> en el tumor ni en los GDT entre ambos grupos de ratones (**Figura 26 A**). Finalmente, considerando que las células NK pueden convertirse en MDSCs en ratones portadores de tumor (151), comparamos la proporción de MDSCs en sangre y bazo en los ratones depletados o no de células NK, pero tampoco encontramos diferencias (**Figura 26 B**). Por lo tanto, podemos inferir que la actividad regulatoria de las células NK en nuestro modelo no involucra a las células T<sub>reg</sub> ni a las MDSCs.

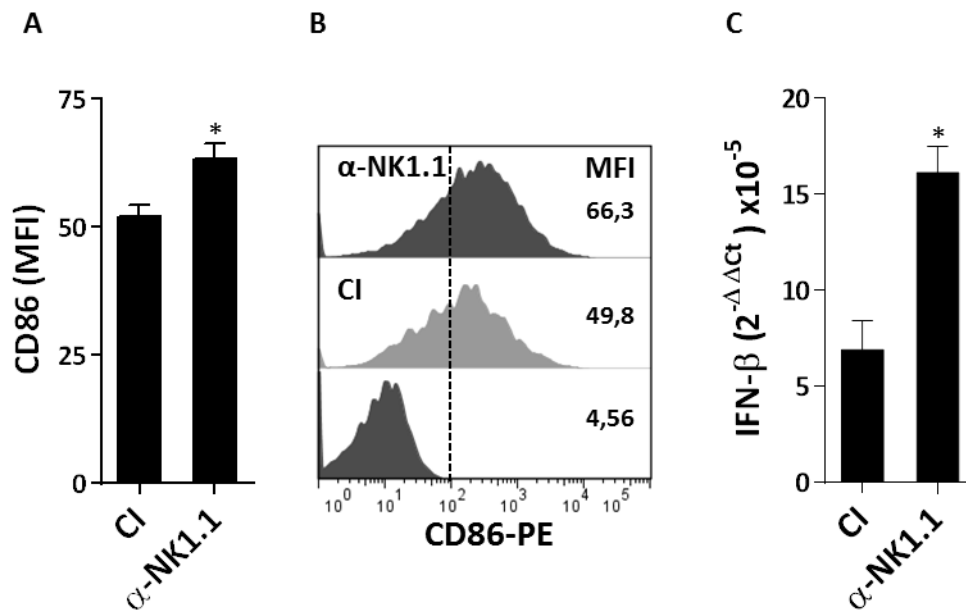




**Figura 26: Rol de las células NK sobre las células  $T_{reg}$  y MDSCs.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, 11 días más tarde se obtuvieron los GDT, los bazos y muestras de sangre para determinar por citometría de flujo (A) el porcentaje de células  $T_{reg}$  (FOXP3<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) en los LT CD4 y (B) el porcentaje de MDSCs (CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>). n=3, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes.

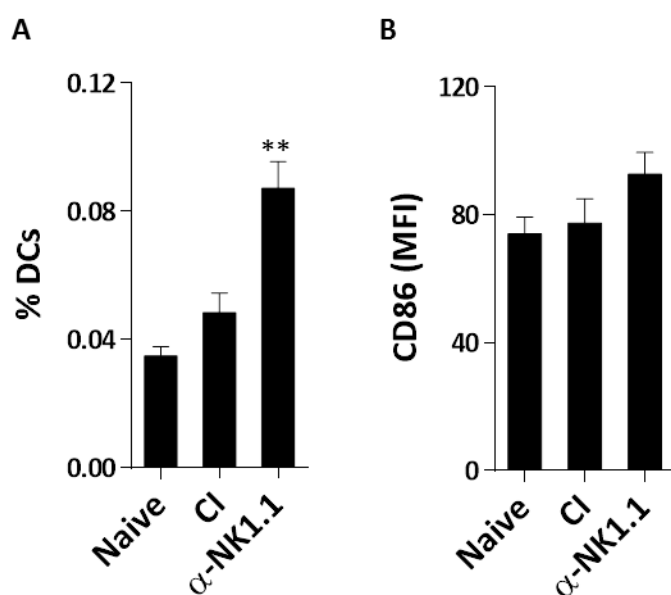
#### IMPACTO DE LAS CÉLULAS NK SOBRE LAS DCs

El incremento de la expansión de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales observada en los ratones depletados de células NK respecto a los ratones control, podría deberse a que las células NK ejercen una actividad regulatoria sobre las DCs, como fue descrito en otros modelos (160-162). Para estudiar esta posibilidad decidimos investigar el fenotipo de las DCs en el microambiente tumoral. En primer lugar comparamos el estado de maduración *in vivo* de las DCs<sub>IT</sub> en los ratones depletados de células NK y los ratones tratados con CI. Efectivamente, encontramos que las DCs<sub>IT</sub> de los ratones depletados de células NK muestran una mayor expresión de la molécula coestimuladora CD86 (Figura 27 A y B), compatible con un fenotipo de DCs más maduras. Por otra parte, considerando el rol crucial que cumple el IFN- $\beta$  producido por las DCs en la presentación cruzada de antígenos tumorales (252) y en la activación espontánea de LT CD8 anti-tumorales (101), cuantificamos su expresión en los tumores de ambos grupos de ratones y hallamos un aumento en los niveles de transcritos de IFN- $\beta$  en el grupo depletado de células NK (Figura 27 C).



**Figura 27: Rol de las células NK sobre las DCs<sub>T</sub>.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY y luego de 6 días se analizaron los tumores por citometría de flujo (A, B) o por *q-PCR* (C). A) Expresión de CD86 (MFI) en las DCs ( $CD3^{-}NKp46^{-}B220^{-}CD11c^{+}$ ), (B) histogramas representativos donde el histograma inferior corresponde al CI de CD86. C) Expresión de IFN- $\beta$  relativa a 18S.  $n=4$ , los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*,  $p<0,05$  (t de Student).

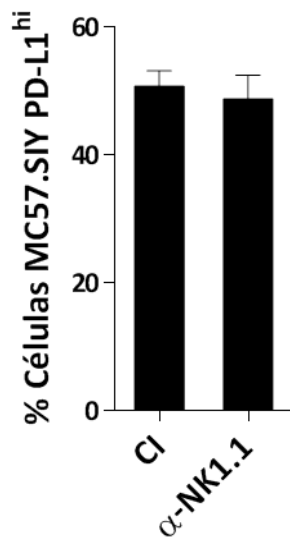
A continuación, decidimos estudiar el fenotipo de las DCs en los GDT. En concordancia, encontramos que el efecto regulatorio sobre las DCs observado en los tumores también se ve reflejado en los GDT, donde hallamos un aumento en la proporción de DCs en el grupo de ratones depletados de células NK (**Figura 28 A**) que, además, expresan mayores niveles de CD86 aunque esta diferencia no es estadísticamente significativa (**Figura 28 B**). El conjunto de estos resultados demuestra que las células NK son capaces de inhibir la maduración de las DCs *in vivo*, avalando la hipótesis de que las células NK ejercen una regulación indirecta de los LT CD8 a través de la modulación de la funcionalidad de las DCs.



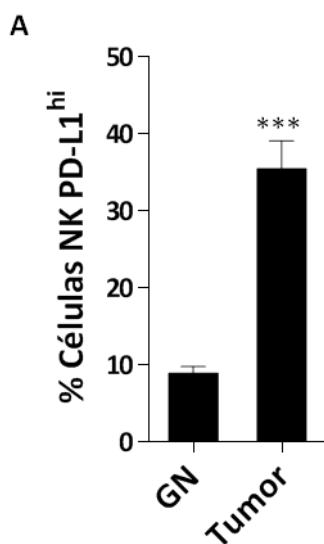
**Figura 28: Rol de las células NK sobre las DCs en los GDT.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY y luego de 6 días se analizaron los GDT por citometría de flujo. Como control se utilizaron ganglios de ratones *naive* (GN). A) porcentaje de DCs ( $CD3^{-}NKp46^{-}B220^{-}CD11c^{+}$ ) y (B) expresión de CD86 (MFI).  $n=4$ , los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*\*,  $p<0,01$  (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

### EJE PD-1/PD-L1

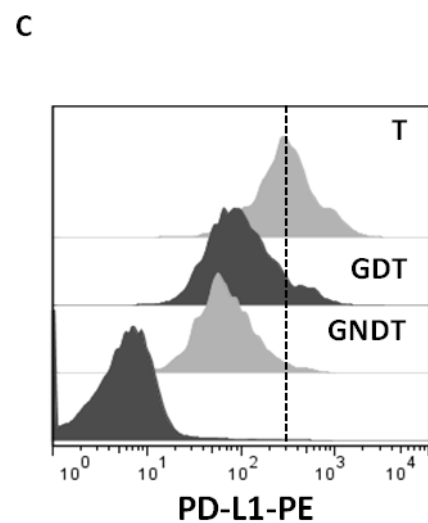
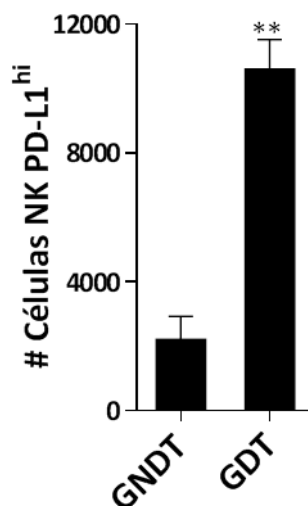
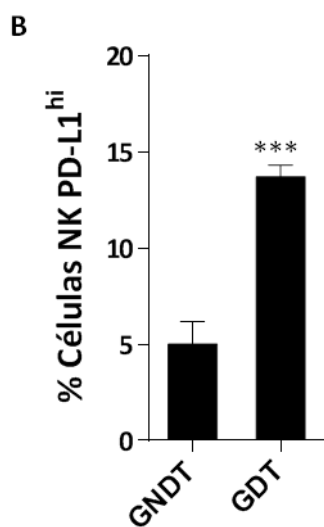
El eje PD-1/PD-L1 constituye un punto de control fundamental en la regulación de la respuesta inmune y, como ya se mencionó, posee gran relevancia en la respuesta inmune anti-tumoral (239). Dado que las células NK son la principal fuente de IFN- $\gamma$  en el comienzo de la fase de eliminación (118) y que recientemente fue demostrado que el IFN- $\gamma$  derivado de las células NK induce un aumento en la expresión de PD-L1 en células tumorales *in vitro* (199), a continuación evaluamos la expresión de PD-L1 en el microambiente tumoral. Si bien no hallamos diferencias en la expresión de PD-L1 en las células tumorales de los ratones depletados o no de células NK (**Figura 29**), sorprendentemente detectamos que las células  $NK_{IT}$  expresan elevados niveles de PD-L1 (**Figura 30 A, C**). Es interesante destacar que también encontramos un aumento en la expresión de esta molécula en las células NK de los GDT, observando tanto un incremento en el porcentaje como en el número absoluto de células NK que expresan altos niveles de PD-L1 ( $PD-L1^{hi}$ ) en los GDT en comparación con los GN (Figura 30 B y C).



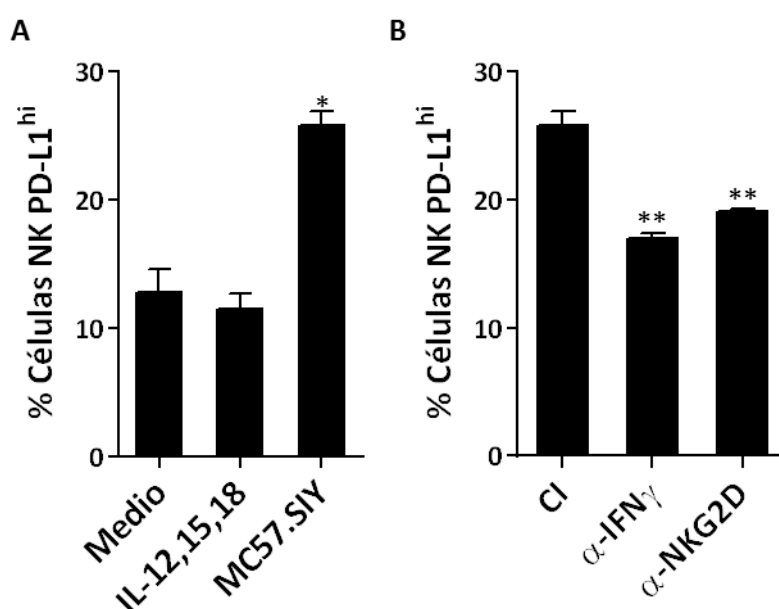
**Figura 29: Expresión de PD-L1 en el tumor MC57.SIY *in vivo*.** Ratones tratados con CI o con el Ac α-NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY y luego de 6 días se analizaron los tumores por citometría de flujo. Porcentaje de células tumorales (SIY<sup>+</sup>) que expresan elevados niveles de PD-L1 (PD-L1<sup>hi</sup>). n=4, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 3 experimentos independientes.



**Figura 30: Expresión de PD-L1 en las células NK *in vivo*.** Un grupo de ratones fue desafiado con el tumor MC57.SIY, luego de 6 días se obtuvieron los tumores, los GDT y los GNDT para analizar por citometría de flujo. Como control se utilizaron ganglios de ratones *naïve* (GN). A) Porcentaje de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en GN (en la población NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) y tumores (en la población NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>SIY<sup>+</sup>). B) Porcentaje y número de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en GNDT y GDT (en la población NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). C) Histogramas representativos donde el histograma inferior corresponde al CI de PD-L1. n=4, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 3 experimentos independientes; \*\*, p<0,01, \*\*\*, p<0,001, (t de Student).

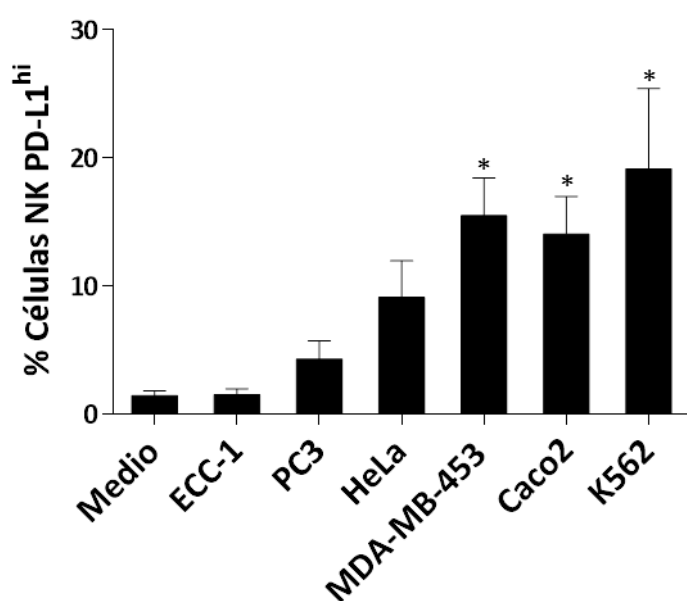


Para evaluar si esta alteración en el fenotipo de las células NK se debe a la interacción con las células tumorales, cultivamos células de bazo en presencia de células MC57.SIY y evaluamos la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo. En efecto, encontramos que el contacto con las células tumorales indujo un aumento en el porcentaje de células NK PD-L1<sup>hi</sup>, y que, por otro lado, esta no se vio modificada ante el estímulo con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 31 A**). Este incremento, inducido por las células tumorales, depende tanto de IFN- $\gamma$  como de NKG2D, ya que el bloqueo de estas moléculas utilizando Acs específicos inhibió parcialmente dicho aumento (**Figura 31 B**). Estos resultados demuestran que las células MC57.SIY inducen la expresión de PD-L1 en las células NK *in vitro* e *in vivo*.



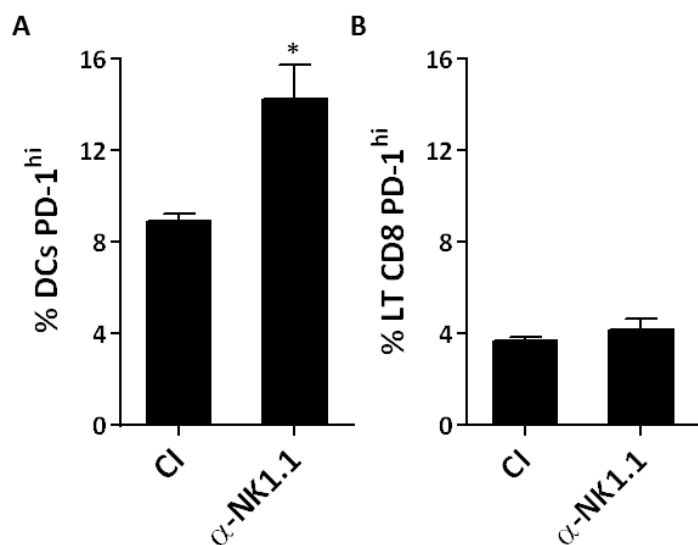
**Figura 31: Inducción de la expresión de PD-L1 en células NK de ratón *in vitro*.** Se cultivaron células de bazo de ratones *naive* en diferentes condiciones durante 48 h y se determinó el porcentaje de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en las células NK (población NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) por citometría de flujo. A) Células de bazo cultivadas en presencia o ausencia de IL-12, IL-15 e IL-18 o de células MC57.SIY. B) Células de bazo co-cultivadas con células MC57.SIY en presencia de CI, Ac neutralizante  $\alpha$ -IFN- $\gamma$  o Ac bloqueante  $\alpha$ -NKG2D. n=3, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 3 experimentos independientes; \*, p<0,05, \*\*, p<0,01 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

Con el fin de evaluar la posibilidad de la existencia de este circuito regulatorio en humanos, cultivamos CMSPs de donadores voluntarios sanos con un panel de células tumorales humanas de diversos orígenes. Encontramos que la mitad de las líneas celulares estudiadas inducen un incremento en el porcentaje de células NK PD-L1<sup>hi</sup> (Figura 32), sugiriendo que en humanos también se produciría un aumento en los niveles de expresión de PD-L1 en células NK frente a ciertos tumores.



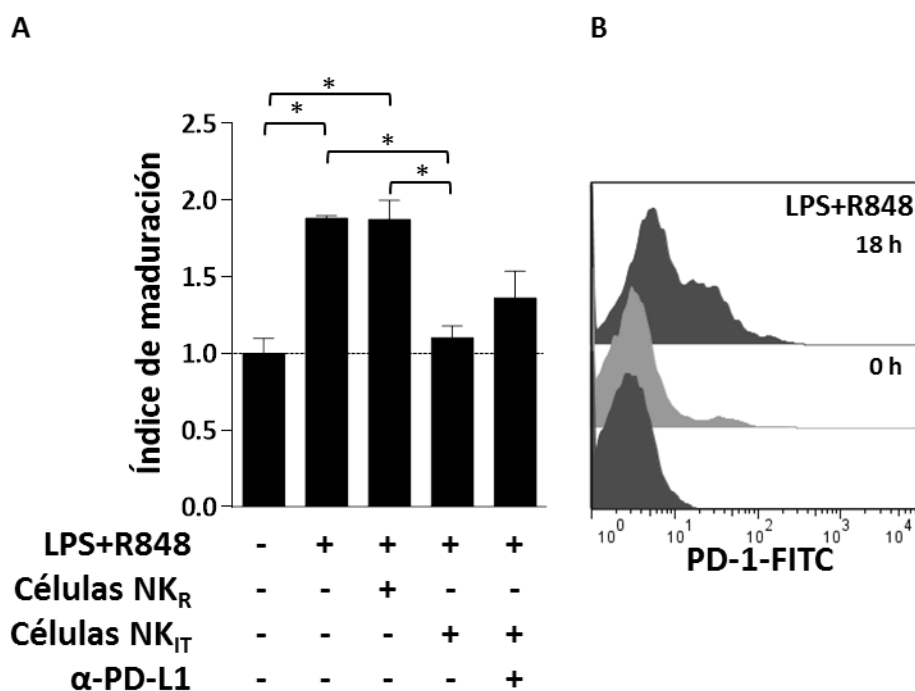
**Figura 32: Inducción de la expresión de PD-L1 en células NK humanas *in vitro*.** Se cultivaron CMSP de donadores voluntarios sanos con diferentes líneas tumorales humanas durante 48 h y se determinó el porcentaje de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en las células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) por citometría de flujo. n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM; \*, p<0,05 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

Teniendo en cuenta estos resultados y considerando que la expresión de PD-1 en las DCs tiene un rol negativo en su función y supervivencia (106,253), nos preguntamos si esta molécula estaba involucrada en la inhibición de las DCs mediada por células NK en los ratones portadores de tumor. Para lo cual, en primer lugar analizamos por citometría de flujo la expresión de PD-1 en DCs de ratones depletados de células NK o tratados con CI y encontramos un aumento en la proporción de DCs PD-1<sup>+</sup> en los GDT en aquellos ratones depletados de células NK (Figura 33 A). Estos resultados sugieren que las células NK podrían regular a las DCs a través de interacciones entre PD-1 y PD-L1. Teniendo en cuenta que PD-1 en los LT CD8, cuando reconoce PD-L1, también tiene un rol inhibitorio y conduce a su apoptosis (254), a continuación evaluamos la expresión de PD-1 en los LT CD8; sin embargo, no observamos diferencias en la expresión de PD-1 en los LT CD8 entre ambos grupos de ratones, avalando nuestra hipótesis de que la regulación de los LT CD8 ocurre mediante un mecanismo indirecto que involucra a las DCs (Figura 33 B).



**Figura 33: Expresión de PD-1 *in vivo*.** Ratones tratados con CI o con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 fueron desafiados con el tumor MC57.SIY, luego de 6 días se obtuvieron los GDT y se determinó el porcentaje de células que expresan elevados niveles de PD-1 (PD-1<sup>hi</sup>) por citometría de flujo en (A) DCs (CD3 NKp46<sup>+</sup> B220<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) y (B) LT CD8 (B). n=4, los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*, p<0,05 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

Finalmente, nos propusimos determinar si las células NK<sub>IT</sub> son capaces de regular la maduración de las DC de manera directa a través de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Para ello, aislamos DC a partir de bazo de ratones sanos y las estimulamos con LPS y R848 en ausencia o en presencia de células NK aisladas de tumores o células NK en reposo (aisladas de bazo de ratones sanos) y analizamos la expresión de CD86 en las DCs por citometría de flujo para evaluar su estado madurativo. Pudimos observar que efectivamente la maduración de las DCs fue inhibida por las células NK<sub>IT</sub>, pero no por las células NK en reposo. El bloqueo de PD-L1 utilizando un Ac específico fue capaz de revertir, aunque parcialmente, el efecto inhibitorio de las células NK<sub>IT</sub> (**Figura 34 A**). En la **Figura 34 B** mostramos que el estímulo con LPS y R848 induce la expresión de PD-1 en las DCs en el tiempo del cultivo; por lo tanto, las condiciones experimentales elegidas serían adecuadas para evaluar el efecto de la interacción entre PD-1 y PD-L1. Estos resultados demuestran que las células NK<sub>IT</sub> son capaces de inhibir la maduración de las DC, en parte, a través de interacciones entre PD-1 y PD-L1.



**Figura 34: Rol de las células NK sobre la maduración de las DCs *ex vivo*.** Se estimularon con LPS y R848 DCs aisladas de bazos de ratones *naive* solas o co-cultivadas con células NK en reposo o células NK<sub>IT</sub> en presencia o ausencia del Ac bloqueante α-PD-L1 durante 18 h y se determinó el número total recuperado de mDCs (CD11c<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup>NKp46<sup>-</sup>ZombieGreen<sup>-</sup>) por citometría de flujo. A) El índice de maduración se calculó respecto a la condición control, que no recibió ningún estímulo. B) Histogramas representativos que muestran la expresión de PD-1 en las DCs aisladas, cultivadas en ausencia de células NK, donde el histograma inferior corresponde al CI de PD-1. n=2, los resultados corresponden a la media ± SEM, de un experimento representativo de 2 experimentos independientes; \*, p<0,05 (ANOVA de 1 vía con test post-hoc de Tukey).

- Las células NK regulan la activación de los LT CD8 anti-tumorales mediante un mecanismo indirecto que involucra a las DCs.
- Las células NK activadas en el tumor, a través de NKG2D e IFN-γ, aumentan la expresión de PD-L1.
- Las células NK inhiben la maduración de las DCs mediante interacciones entre PD-1 y PD-L1.



# DISCUSIÓN

“-Veo que has comprendido...

-¡Sí, he comprendido!

-Entonces, ¿podría alguien  
explicarme...?”

René Goscinny, *Asterix y el caldero*

Las células NK cumplen un papel crítico en la detección temprana y eliminación de células infectadas con virus y neotransformadas. Sin embargo, nuevos hallazgos en distintas condiciones inmunopatológicas, como infecciones virales, autoinmunidad y trasplante, revelaron que estas células también son capaces de ejercer funciones regulatorias (155,156,160,163-165). En el contexto de un tumor, aún no se encuentra totalmente elucidado el rol de las células NK en el orquestado de la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. En este trabajo de tesis, utilizando el modelo MC57.SIY y una combinación de estrategias experimentales *in vivo* e *in vitro*, demostramos que las células NK controlan la expansión y activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales mediante la inhibición de la maduración de las DCs a través del eje PD-1/PD-L1. Las células del fibrosarcoma MC57.SIY representaron un modelo ideal para estudiar el rol de las células NK en la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral porque, además de haber sido transducidas para expresar el antígeno modelo SIY, permitiéndonos monitorear la activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, expresan naturalmente el ligando de NKG2D Rae1 posibilitando la activación de las células NK (**Figura 6**).

Schreiber y colaboradores demostraron que durante el desarrollo de un tumor, si bien las células NK juegan un rol crítico durante la fase de eliminación, en la fase de equilibrio, aunque persisten en el microambiente tumoral, no serían capaces de controlar el crecimiento del tumor (40). Se ha reportado que las células NK<sub>T</sub> de pacientes con cáncer de pulmón, de ovario, de lengua y de riñón se encuentran en un estado anérgico y presentan alteraciones en su fenotipo, sugiriendo así, que una vez que el tumor es detectable clínicamente, las células NK no tendrían funciones anti-tumorales (255). En nuestro trabajo, en concordancia con estos hallazgos, observamos que, si bien las células NK *in vitro* son capaces de eliminar a las células MC57.SIY y producir IFN- $\gamma$  (**Figura 7**), *in vivo*, no participan de su rechazo, ya que la cinética de crecimiento tumoral no se ve afectada por la depleción de células NK (**Figura 15**). Asimismo, observamos que, cuando el tumor alcanza su volumen máximo, las células NK<sub>T</sub> son en su mayoría terminalmente diferenciadas y presentan un fenotipo exhausto, caracterizado por expresar elevados niveles de los marcadores Ly6C y KLRG1 (**Figura 9**) asociados con células NK en estado quiescente e hiporespondedoras (135,137). Asimismo, las células NK pueden reconocer

distintas cadherinas en las células tumorales mediante KLRG1, inhibiendo su actividad citotóxica (139), lo que podría explicar el hecho de que las células NK no contribuyan a la eliminación del tumor *in vivo*.

En cambio, comprobamos que es crucial la acción de los LT CD8 para el rechazo de este fibrosarcoma; ya que, en su ausencia, los tumores se desarrollan velozmente alcanzando un volumen de 1000 mm<sup>3</sup> en dos semanas (**Figura 10**). En este modelo, la activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales ocurre espontáneamente, sin intervención externa, y comienza a ser detectable durante la primera semana luego de la inoculación del tumor (**Figura 11**). Ateniéndonos al paradigma clásico de activación de los LT CD8, esto implica que en ese tiempo las iDCs infiltraron el tumor, procesaron antígenos tumorales, maduraron y migraron al ganglio linfático drenante donde ocurre la presentación antigénica.

Habiendo encontrado que las células NK infiltran el tumor sin contribuir a su eliminación, consideramos pertinente evaluar si estas células cumplen un rol silente o si, en cambio, participan en la regulación de los LT CD8, ya sea induciendo su activación o inhibiéndola. Llamativamente, encontramos que *in vivo*, la depleción de las células NK con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 (clon PK136) resultó en una mayor frecuencia de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales (**Figura 13**). A continuación, nos preguntamos si este incremento correlacionaría con un aumento en las funciones efectoras de los LT CD8 o si, por el contrario, las células NK participarían en la eliminación de LT CD8 exhaustos o senescentes. En concordancia con la primera hipótesis, observamos un aumento tanto en el porcentaje de LT CD8 productores de IFN- $\gamma$  frente al re-estímulo *ex vivo* con el péptido SIY (**Figura 16**), como en el porcentaje de LT CD8 con actividad citotóxica contra las células MC57.SIY (**Figura 17**). Esta regulación podría tener consecuencias a largo plazo e impactar en la respuesta inmune de memoria ya que también encontramos una expansión de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub> (**Figura 18**) en el grupo de ratones tratado con el Ac  $\alpha$ -NK1.1. En conjunto, estos resultados nos permitieron demostrar que, en nuestro modelo, las células NK1.1<sup>+</sup> inhiben la activación de los LT CD8 anti-tumorales, a nivel de la expansión y de la diferenciación en células de memoria, conduciendo a funciones efectoras disminuidas.

La estrategia experimental de utilizar el clon PK136, si bien permite la eliminación de las células NK, presenta la desventaja inherente de que, como las células NKT también expresan el marcador NK1.1, el tratamiento con estos Ac puede resultar en la depleción de ambos tipos celulares (256). Para comprobar que el aumento observado en la activación de los LT CD8 en los ratones tratados con el Ac  $\alpha$ -NK1.1 se debe a la depleción de las células NK y no de las células NKT, realizamos una transferencia adoptiva de células NK aisladas por *cell sorting*. Utilizando este abordaje experimental, encontramos que los ratones portadores de tumor que recibieron células NK presentaron una menor expansión de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales en comparación con los ratones que recibieron PBS (**Figura 14**). De esta forma, demostramos que las células NK ejercen un rol regulatorio sobre la expansión y la activación de los LT CD8 frente al tumor MC57.SIY.

Con el fin de determinar si este rol regulatorio era un fenómeno particular asociado al modelo MC57.SIY o si podía ser extrapolable a otros modelos, estudiamos la activación de los LT CD8 frente a otros dos tumores no relacionados, también transducidos para expresar el antígeno modelo SIY, en ratones depletados o no de células NK. De esta manera, nuestros resultados pudieron ser validados utilizando el tumor Yac-1.SIY, *target* prototípico de las células NK (**Figura 20**). Este modelo difiere del anterior principalmente en que, debido a que las células no expresan moléculas del MHC de clase I, el tumor no puede ser reconocido por los LT CD8 y, por lo tanto, éstos no participan de su eliminación. Como proviene de la cepa de ratón A/Sn, su uso *in vivo* en ratones de la cepa C57BL/6 representa un sistema alogeneico, pero su defecto en la expresión de las moléculas del MHC de clase I y clase II minimiza el riesgo de promover una respuesta alogeneica (257). Nuestros hallazgos, sin embargo, no fueron extrapolables utilizando el melanoma B16.SIY (**Figura 19**), ya que no observamos diferencias en la respuesta de los LT CD8 entre los ratones depletados o no de células NK. A diferencia de los otros dos modelos, las células B16.SIY son muy poco inmunogénicas y, en particular, no expresan ningún ligando de NKG2D, por lo cual no son capaces de activar a las células NK a través de este receptor, como sí lo hacen las células MC57.SIY y las células Yac-1.SIY. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que la activación de las células NK en el microambiente tumoral, donde NKG2D podría tener especial relevancia, es necesaria

para que se gatillen sus funciones regulatorias sobre los LT CD8. Estos resultados podrían tener implicancias en el diseño de terapias anti-tumorales ya que uno de los objetivos primordiales es la inducción de una respuesta T citotóxica en pacientes con cáncer (242).

Para investigar el rol de NKG2D en las funciones regulatorias de las células NK, transducimos las células B16.SIY con el gen que codifica Rae-1 $\epsilon$  y, si bien la transducción fue efectiva ya que por PCR detectamos la inserción del plásmido en el DNA genómico, debido a algún mecanismo de silenciamiento no fue posible detectar la expresión de Rae-1 $\epsilon$  en superficie (datos no mostrados), por lo cual no nos fue posible evaluar si NKG2D es relevante *in vivo* para desencadenar las funciones regulatorias de las células NK o si se trata de una asociación casual. Otra estrategia posible, para evidenciar el rol de NKG2D, podría haber sido bloquear esta vía en los ratones desafiados con el tumor MC57.SIY con el Ac bloqueante  $\alpha$ -NKG2D (clon CX5).

El rol regulatorio de las células NK sobre la respuesta adaptativa anti-tumoral que describimos en este trabajo de Tesis, contrasta con las funciones clásicas de las células NK en la inmunovigilancia tumoral y en la respuesta contra patógenos intracelulares. Esta aparente contradicción podría reflejar la complejidad de la biología de las células NK, que serían capaces de orquestar escenarios diferentes según los estímulos recibidos a través de las distintas fases de la respuesta inmune. La actividad regulatoria de las células NK, a nivel de la respuesta inmune adaptativa, puede haber evolucionado como un mecanismo de control de la magnitud de la activación de los LT para limitar el daño asociado a una respuesta inmune generalizada. En concordancia, se observó que la mayoría de las mutaciones descritas en la linfocitosis hemofagocítica familiar, un síndrome caracterizado por la activación excesiva de macrófagos y de LT, afecta la actividad citotóxica de las células NK (258). Adicionalmente, en algunas enfermedades autoinmunes se encontraron asociaciones con alteraciones en las células NK que podrían estar involucradas en el desencadenamiento de la enfermedad (259). Por ejemplo, en pacientes con lupus eritematoso sistémico, se describieron defectos en la diferenciación de las células NK y en su actividad citotóxica (260) y, en pacientes con tiroiditis de Hashimoto y con psoriasis, se observó un porcentaje disminuido de células NK (261,262). Sin embargo, estos estudios no permiten distinguir si el defecto en las células NK es primario y contribuye a la patogénesis o si es secundario a la enfermedad. Por otra parte,

experimentos *in vivo* en ratón permitieron demostrar que las células NK cumplen un rol protector contra el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Utilizando un modelo de encefalitis autoinmune experimental, se ha demostrado que las células NK regulan tanto la inducción como la fase efectora de la enfermedad a través de la inhibición de la proliferación de los LT (263) y de la eliminación de LT específicos contra auto-antígenos (264). Adicionalmente, en un modelo de diabetes experimental, las células NK fueron eficaces para inducir tolerancia a alotrasplantes de islotes pancreáticos a través de un mecanismo que involucra perforina (265).

De esta manera, las funciones regulatorias de las células NK que contribuyen a evitar que se desarrollen enfermedades autoinmunes proveen, como contracara, posibles mecanismos de escape a patógenos y también a células tumorales, como demostramos en este trabajo de tesis. Las implicancias fisiopatológicas de dichas funciones regulatorias fueron mejor estudiadas en modelos de infecciones virales, pero aún no fueron exploradas durante el desarrollo de tumores. Utilizando un modelo de infección con el LCMV, se comprobó que las células NK promueven el establecimiento de la infección crónica (156). Similar a lo observado en nuestro trabajo, fue demostrado que las células NK frente a la infección con el LCMV, inducen una disminución en el número de LT CD8 específicos contra antígenos virales y restringen la generación de LT CD8 de memoria, en este caso, a través de un mecanismo dependiente de perforina (266). Asimismo, se observó que la infección con LCMV induce la maduración de las células NK, con predominio de la población terminalmente diferenciada CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>, y que la depleción de las células NK reduce los porcentajes de LT CD8 virus-específicos a través de un mecanismo que involucra a las DCs (160). Las funciones regulatorias de las células NK durante infecciones virales no se restringen únicamente al modelo de infección con LCMV (267). Empleando el modelo de infección con MCMV, se ha comprobado que las células NK pueden regular la activación de los LT de forma directa (167) o indirecta, a través de la eliminación de las DCs que presentan antígenos virales (161).

Durante el desafío con el tumor MC57.SIY, mostramos que las células NK inhiben la generación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub>, sin afectar la subpoblación de LT CD8<sub>MC</sub> (**Figura 18**). Si bien el mecanismo por el cual los LT CD8 *naive* al activarse se diferencian en LT CD8<sub>MC</sub> o LT CD8<sub>ME</sub> no está completamente elucidado, fue demostrado que la IL-2

cumple un rol fundamental en la diferenciación y supervivencia de estos últimos (53). Por lo tanto, las células NK en nuestro modelo podrían competir por la IL-2 y, así, limitar selectivamente la diferenciación de los LT CD8<sub>ME</sub>. En concordancia con las funciones de las células NK que previenen la autoinmunidad, las células NK limitarían la extensión de la respuesta inmune adaptativa en la periferia inhibiendo la generación de los LT CD8<sub>ME</sub>. A su vez, como las células NK no afectan la subpoblación de LT CD8<sub>MC</sub>, se preservaría la inmunodominancia de los clones específicos contra antígenos tumorales.

Desde este punto de vista y considerando que los ratones depletados de células NK rechazan el tumor primario con la misma eficacia que los ratones control (**Figura 15**), el rol regulatorio de las células NK sobre la respuesta inmune anti-tumoral sería parte de un mecanismo homeostático sin relevancia fisiopatológica. Sin embargo, mediante la utilización del modelo Yac-1.SIY, pudimos evidenciar que no es necesario que los LT CD8 eliminen el tumor para que las células NK tengan un rol inhibitorio sobre la inmunidad anti-tumoral. Además, la regulación de las funciones efectoras de los LT CD8 por parte de las células NK no debería desestimarse únicamente debido a que en el modelo MC57.SIY no haya tenido consecuencias en el crecimiento tumoral, ya que es un tumor que se rechaza muy rápidamente. Hacia el día 11, cuando observamos que en los ratones depletados de células NK hay un mayor porcentaje de LT CD8 con actividad citotóxica frente a las células MC57.SIY, los tumores ya no son palpables. Por lo tanto, con el fin de evaluar el impacto del rol regulatorio de las células NK sobre los LT CD8 en el crecimiento de un tumor primario, sería necesario extender estos estudios a más modelos.

Con el fin de determinar si la diferencia observada en la población de LT CD8<sub>ME</sub> tiene consecuencias en la respuesta inmune anti-tumoral secundaria, desafiamos con el tumor MC57.SIY a ratones depletados y no depletados de células NK y, tiempo después, los re-desafiamos con el tumor B16.SIY (**Figura 21**). Clínicamente, el hecho de que tumores no relacionados tengan antígenos en común es frecuente debido a la expresión ectópica de algunos genes germinales. Por ejemplo, el antígeno MZ2-E codificado por el gen MAGE-1 fue hallado en melanomas de diferentes pacientes e incluso en tumores de otros orígenes, pero no en tejidos normales (268), y el antígeno NY-ESO-1, primero descrito en cáncer de esófago, está presente entre el 25% y el 33% de todos los melanomas, tumores de pulmón, esófago, hígado, estómago, próstata, ovario y vejiga

(269). De acuerdo con la hipótesis de *inmunoección* del cáncer postulada por Schreiber, si la fase de eliminación resulta exitosa, el tumor puede desaparecer sin haber sido detectado clínicamente (24). Por lo tanto, considerando que durante el transcurso de la vida la eliminación inmune de células tumorales puede ocurrir numerosas veces de forma desapercibida y que es posible una re-exposición a un mismo antígeno tumoral, cabe preguntarse si este tipo de “inmunización natural” otorga mayor protección o si, por el contrario, induce tolerancia.

Con nuestro abordaje experimental, encontramos que el rechazo previo del tumor MC57.SIY otorgó protección parcial frente al desarrollo del tumor B16.SIY (datos no mostrados); asimismo, esta protección resultó más eficiente en aquellos ratones que habían sido depletados de células NK, demostrando que el rol regulatorio de las células NK puede contribuir al escape tumoral. De esta manera, pudimos evidenciar que el efecto de las células NK sobre la expansión de los LT CD8<sub>ME</sub> es biológicamente relevante, ya que la depleción de células NK durante la fase de activación de la respuesta inmune contra el tumor primario favoreció el control del crecimiento de un tumor secundario no inmunogénico (**Figura 22, Figura 23**). Para poder demostrar fehacientemente que los LT CD8 son los mediadores responsables de la diferencia en el control del crecimiento tumoral entre ambos grupos de ratones, sería necesario comprobar que dicha diferencia no fuera observable si se depletaran los LT CD8 previamente al re-desafío con el tumor B16.SIY.

A la luz de estos resultados, nos propusimos investigar los mecanismos involucrados en las funciones regulatorias de las células NK durante la activación de la respuesta inmune primaria anti-tumoral. Se han descrito numerosos mecanismos a través de los cuales las células NK pueden regular a los LT CD8. Fue reportado que las células NK eliminan a los LT CD8 de forma directa *in vitro* y en modelos *in vivo* de inmunización con OVA y de infección con LCMV (152,154,155); sin embargo, mediante un ensayo de citotoxicidad *in vitro*, no fue posible detectar que las células NK<sub>IT</sub> tuvieran actividad citotóxica sobre los LT CD8<sub>Naive</sub> ni los LT CD8<sub>IT</sub> (**Figura 24**). El escaso número de células NK que puede ser aislado a partir de los tumores sólo nos permitió evaluar la relación E:T 1:1, mientras que los trabajos mencionados demostraron que las células NK tienen actividad citotóxica sobre los LT CD8 activados utilizando relaciones E:T de al



menos 3:1. Igualmente, considerando la desventaja numérica que tienen las células NK respecto a los LT CD8 *in vivo*, las relaciones E:T más elevadas probablemente no reflejan lo que ocurre en los ratones portadores de tumor. Diseñar ensayos que permitan evaluar *in vivo* la actividad citotóxica de las células NK requiere del aislamiento de LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, lo cual no es posible utilizando ratones *wild type* ya que esta subpoblación celular es muy minoritaria. Para tal fin, podrían utilizarse ratones transgénicos 2C cuyos LT CD8 expresan un TCR monoespecífico capaz de reconocer el péptido SIY (270). De esta manera, realizando transferencias adoptivas de LT CD8 aislados de ratones 2C, como células *target*, se podrían realizar ensayos de citotoxicidad *in vivo* en ratones portadores del tumor MC57.SIY, depletados o no de células NK.

Por otra parte, las células NK podrían regular la expansión y activación de los LT CD8 anti-tumorales a través de mecanismos indirectos. Se ha descrito que, frente al estímulo con fitohemaglutinina, una subpoblación de células NK secreta IL-10 *in vitro* (168) y también se encontraron células NK productoras de IL-10 durante la infección con MCMV *in vivo* (167). Asimismo, se observó que las células NK secretan TGF- $\beta$  *in vitro* ante el estímulo con  $\alpha$ -CD2 (251). Por lo tanto, determinamos la expresión de los transcritos de estas citoquinas inmunosupresoras en los GDT y en los tumores, pero no hallamos diferencias entre los ratones depletados o no de células NK (**Figura 25**), sugiriendo que estas citoquinas no participan del circuito regulatorio. Además, las células NK podrían favorecer la acción de otras células supresoras, como las células T<sub>reg</sub>, mediante su reclutamiento (150) o, incluso, podrían desdiferenciarse en el microambiente tumoral y adquirir el fenotipo de las MDSCs (151). En consecuencia, estudiamos estas poblaciones celulares en los ratones portadores de tumores, depletados o no de células NK, y nuevamente, no hallamos diferencias entre ambos grupos (**Figura 26**), indicando que ni las células T<sub>reg</sub> ni las MDSCs están involucradas en la regulación de los LT CD8 anti-tumorales mediada por las células NK.

Debido al rol crucial que las DCs cumplen en la activación de los LT, cualquier alteración en la maduración, función o número de las DCs se relaciona directamente con una modulación de la expansión y activación de los LT; por lo tanto, nos preguntamos si las células NK pueden regular la funcionalidad de las DCs en nuestro modelo. En

congruencia con esta hipótesis, encontramos que las DCs infiltrantes del tumor, en los ratones depletados de células NK, presentaron un fenotipo más maduro, caracterizado por una mayor expresión de la molécula coestimuladora CD86 y un aumento en la producción de IFN- $\beta$  (**Figura 27**). Adicionalmente, observamos una mayor proporción de DCs en los GDT de estos ratones (**Figura 28**). Para demostrar si las células NK además afectan la capacidad de las DCs de realizar presentación cruzada de antígenos tumorales, sería interesante aislar DCs provenientes de GDT de ratones depletados de células NK y de ratones tratados con CI y realizar un ensayo de proliferación *in vitro* de LT CD8 aislados de ratones 2C. En función de los resultados obtenidos hasta el momento, postulamos que el mecanismo responsable de la inhibición de la activación de los LT CD8 anti-tumorales es indirecto e involucra a las DCs.

PD-L1 es una molécula con propiedades inmunoregulatorias que se expresa diferencialmente en las células tumorales y contribuye a su escape, debido principalmente a que inhibe la activación y las funciones efectoras de los LT. La utilización de Acs bloqueantes contra esta molécula o su receptor están teniendo resultados muy prometedores en ensayos clínicos en diversos tipos de tumores en estadíos muy avanzados, siendo particularmente efectivos cuando, previo al tratamiento, en el microambiente tumoral ya existe un infiltrado inflamatorio, pero su acción está inhibida debido a que las células tumorales son PD-L1<sup>+</sup> (239,271). Estas terapias ya cuentan con la aprobación de la FDA para el tratamiento de melanoma y cáncer de pulmón y se espera que próximamente su uso se extienda a otros tumores.

Se hipotetiza que el éxito de estas terapias, en neoplasias de origen tan distinto, se debe a que estos tumores tienen en común que presentan una alta tasa de mutaciones, por la radiación UV en melanoma y por el humo del cigarrillo en cáncer de pulmón, dando lugar a neoantígenos capaces de ser reconocidos por LT CD8 (272). Llamativamente, la radiación UV al igual que el humo del cigarrillo causan el aumento de la expresión de ligandos de NKG2D a través de distintos mecanismos (273,274); por lo tanto, estas neoplasias tendrían en común, además, la potencialidad de activar a las células NK.

Actualmente, la búsqueda de biomarcadores que permitan predecir qué pacientes pueden ser beneficiados con las terapias bloqueantes del punto de control inmunológico

PD-1/PD-L1 representa una prioridad dentro del estudio de la inmunología tumoral. Si bien la expresión de PD-L1 en los tumores resulta un marcador sugestivo de la respuesta a la terapia, no resulta totalmente adecuado ya que muchos pacientes con tumores PD-L1<sup>+</sup> son también respondedores (275), lo que sugiere que la expresión de PD-L1 en otras células debe contribuir a la inhibición. Particularmente, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión de PD-L1 en las células del sistema inmune que infiltran los tumores y la respuesta al tratamiento (241).

En este trabajo de tesis, encontramos que las células NK<sub>IT</sub> expresan niveles elevados de PD-L1 (**Figura 30**) y que este aumento depende de IFN- $\gamma$  y del reconocimiento del tumor a través de NKG2D (**Figura 31**). Es en apariencia paradójico que el cultivo con la combinación de citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18, que estimula la secreción de IFN- $\gamma$  (dato no mostrado), no favorezca la inducción de PD-L1 (**Figura 31**); sin embargo, esto podría destacar la importancia del contacto con la célula tumoral o la necesidad de que exista más de una señal para desencadenar la inducción de PD-L1 en las células NK.

Considerando que hasta la fecha no existen reportes que muestren el destino de las células NK luego de infiltrar el tumor, fue particularmente interesante el hallazgo de una subpoblación de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en el GDT (**Figura 30**), sugiriendo que las células NK podrían migrar desde el tumor al GDT.

Es importante destacar que el aumento de expresión de PD-L1 en las células NK no es un fenómeno restringido a los modelos murinos, ya que evaluamos un panel de líneas celulares tumorales humanas de diversos orígenes y encontramos que varias de ellas inducen la sobre-expresión de PD-L1 en células NK humanas (**Figura 32**). En todas las líneas celulares evaluadas determinamos la expresión de los ligandos de NKG2D; sin embargo, no encontramos una asociación entre los niveles de expresión de estos ligandos y su capacidad de inducir PD-L1 en las células NK (datos no mostrados), lo que sugiere que existen otras moléculas involucradas en este fenómeno.

La expresión de PD-L1 en células NK fue previamente reportada utilizando un modelo experimental de diabetes (165) y un modelo de cáncer (276). Sin embargo, en ambos modelos, PD-L1 se expresa en una subpoblación particular de células NK con un fenotipo inmaduro (c-Kit<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>) mientras que, en nuestro modelo experimental, no

observamos expresión de c-Kit en las células NK PD-L1<sup>+</sup> (datos no mostrados) y, en base a la expresión de CD11b y de CD27, observamos que son mayoritariamente células terminalmente diferenciadas (**Figura 9**).

Teniendo en cuenta que el IFN- $\gamma$  es un conocido inductor de la expresión de PD-L1 (277) y las células NK pueden secretar IFN- $\gamma$  en respuesta al reconocimiento de las células tumorales, podríamos hipotetizar que el IFN- $\gamma$  producido por las células NK puede inducir, además, un aumento en la expresión de PD-L1 en otras células del microambiente tumoral. Si bien no encontramos diferencias en la expresión de PD-L1 en las células tumorales provenientes de ratones depletados o no de células NK (**Figura 29**), no podemos excluir la posibilidad de que el estroma u otras células del sistema inmune, contribuyan también a la regulación de la respuesta inmune anti-tumoral a través de PD-L1.

Mediante PD-L1 las células NK podrían afectar la respuesta de los LT de forma directa, o a través de la regulación de la actividad de las DCs. Recientemente, fue descrito que el reconocimiento de los ligandos de PD-1 por las DCs inhibe su maduración e induce la apoptosis (106). En concordancia con esta segunda hipótesis, encontramos una expansión de la subpoblación de DCs PD-1<sup>+</sup> en los ratones depletados de células NK (**Figura 33 A**), pero no observamos cambios en la subpoblación de LT CD8 PD-1<sup>+</sup> (**Figura 33 B**), sugiriendo que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> tienen como *targets* a las DCs.

La prueba de principio que nos permitió demostrar fehacientemente que las células NK en el microambiente tumoral tienen un rol regulatorio directo sobre las DCs fue obtenida *ex vivo* al encontrar que las células NK aisladas de tumores inhibieron totalmente la maduración de las DCs. Asimismo, evidenciamos que la sobre-expresión de PD-L1 en las células NK tiene relevancia funcional, ya que el bloqueo de PD-L1 restituyó parcialmente la maduración de las DCs (**Figura 34**).

Las células NK PD-L1<sup>hi</sup> podrían regular a las DCs no sólo a través de PD-1. En 1996, B. J. Chambers y colaboradores describieron que las células NK pueden tener actividad citotóxica sobre las DCs a través del reconocimiento de CD80, mediante una interacción que no involucra CD28 ni CTLA-4, los dos ligandos conocidos hasta ese momento (278). Años más tarde, se descubrió que PD-L1 también es ligando de CD80 tanto en ratón (279) como en humano (280), pero aún no fue explorado cómo esta interacción puede afectar

la funcionalidad de las DCs. Llamativamente, se observó que CD80 se expresa en las células T anérgicas y que su interacción con PD-L1 es crucial para el mantenimiento de la tolerancia (281). Por lo tanto, sería importante evaluar la expresión de CD80 en los LT y en las DCs al igual que hicimos con PD-1.

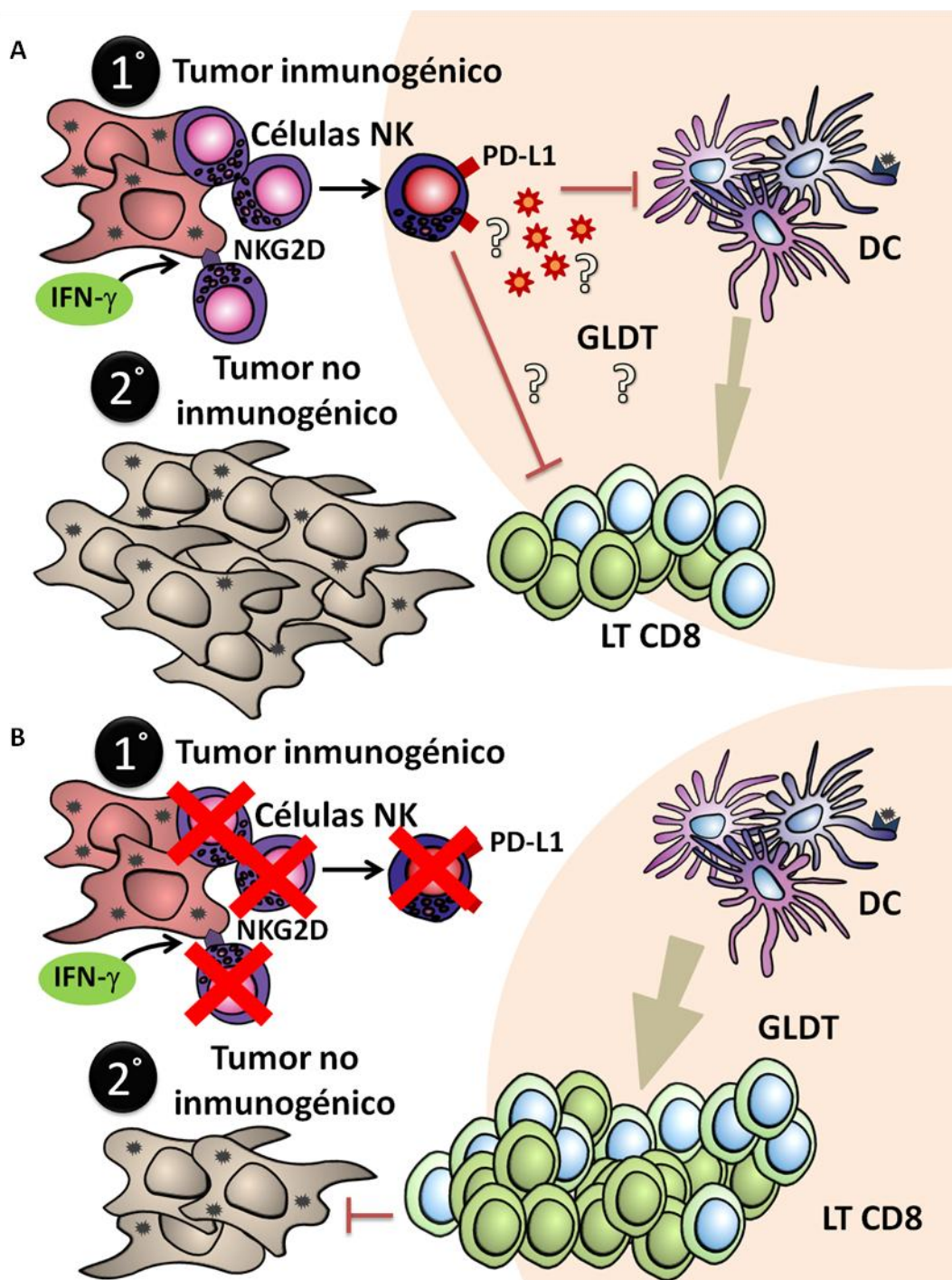
Dado que el bloqueo de PD-L1 sólo restituyó parcialmente la maduración de las DCs (utilizamos el clon 10F.9G2 que inhibe la interacción de PD-L1 tanto con PD-1, como con CD80, 282), podemos suponer que además existen otras moléculas involucradas. Para investigar si participan de este mecanismo factores solubles secretados por las células NK<sub>IT</sub>, debería realizarse un ensayo de *transwell*. Si al evitar el contacto celular entre las DCs y las células NK<sub>IT</sub> siguiéramos observando un efecto regulatorio, eso implicaría la participación de factores solubles. Las células NK además podrían expresar otras moléculas en superficie capaces de regular a las DCs. Recientemente, se demostró que las células NK que infiltran algunos tumores expresan CTLA-4 (283); sin embargo, desconocemos si esto sucede en nuestro modelo. También fue descrito que las células NK son capaces de tener actividad citotóxica sobre las DCs a través de LFA-1 (284). Por otra parte, el *clustering* de LFA-1 necesario para dar comienzo a la polarización de los gránulos citotóxicos es inducido por Ly6C (285,286). Considerando que en nuestro modelo encontramos que las células NK<sub>IT</sub> son Ly6C<sup>high</sup> (**Figura 9 C y D**), este mecanismo también podría estar involucrado en la actividad regulatoria de las células NK sobre las DCs.

Está ampliamente reportado que el escenario de la interacción entre las células NK y las DCs puede desencadenar consecuencias muy distintas dependiendo de la relación numérica entre estas células y el estado de activación (287). Existe cierto consenso en considerar que, frente a iDCs, si la relación numérica favorece a las células NK, éstas inducirán su muerte (162,288), pero si, por el contrario, las iDCs son mayoría, las células NK promoverán su maduración (289,290). Por lo tanto, se suele considerar que la edición de las DCs por parte de las células NK favorece el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. Sin embargo, en el contexto de la respuesta inmune anti-tumoral, encontramos que las células NK activadas en el microambiente tumoral tienen un rol regulatorio sobre las DCs. Por los experimentos realizados, no podemos diferenciar si las células NK inhiben la maduración de las DCs, lo que las conduce a la muerte, o si

directamente tienen actividad citotóxica sobre las mDCs. Cabe destacar que, tanto en el tumor como en el GDT, las células NK y las DCs se encuentran en una relación numérica similar (datos no mostrados) y que, en el ensayo realizado *ex-vivo*, las células NK y las DCs se co-cultivaron en una relación 1:1, emulando la relación que observamos *in vivo*.

El lugar anatómico donde se produce la interacción entre las células NK y las DCs, resultando en la inhibición de estas últimas, resta ser elucidado. Se ha descrito que las células NK se encuentran en estrecha asociación con las DCs tanto en los sitios de inflamación como en los órganos linfoides secundarios (291). Si bien está establecido que las iDCs y las células NK son reclutadas a los sitios de inflamación y que las DCs, una vez que maduran, migran a los GD donde inician la respuesta inmune adaptativa, se desconoce si las células NK pueden abandonar el sitio de inflamación. De esta forma, podemos hipotetizar que las células NK interactúan con las DCs en el tumor, lo que está avalado por nuestras observaciones en relación a la expresión de CD86 y al IFN- $\beta$  (**Figura 27**), interfiriendo con la maduración y consecuente migración de las DCs del tumor al GDT y, como consecuencia, encontramos un porcentaje disminuido de DCs en el GDT (**Figura 28**). Sin embargo, considerando que en el GDT encontramos una subpoblación de células NK PD-L1<sup>hi</sup> (**Figura 30 B y C**) y una disminución en el porcentaje de DCs PD-1<sup>+</sup> (**Figura 33 A**), no podemos descartar que también allí se produzca la interacción.

En resumen, nuestros resultados sugieren un modelo en el cual las células NK activadas por células tumorales regulan la activación de las DCs, por un mecanismo que involucra al eje PD-1/PD-L1, conduciendo a una activación restringida de los LT CD8 anti-tumorales. Aunque esta respuesta es suficiente para erradicar un tumor inmunogénico, la memoria que se genera resulta insuficiente tiempo después para eliminar un tumor no inmunogénico (**Figura 35 A**). En cambio, cuando el primer desafío tumoral se realiza en ratones depletados de células NK, se observa una mayor activación de las DCs y expansión de los LT CD8 anti-tumorales. La cinética del rechazo del tumor primario no es diferente pero, frente a un tumor secundario no inmunogénico, se observa un retraso en el crecimiento (**Figura 35 B**).



**Figura 35: Modelo propuesto del circuito regulatorio mediado por las células NK.** A) Las células NK, al activarse en contacto con un tumor inmunogénico a través de NKG2D o debido a la presencia de IFN- $\gamma$ , aumentan la expresión de PD-L1 y limitan la maduración de las DCs regulando la expansión de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales. Luego, frente a un tumor diferente y no inmunogénico, pero con un antígeno en común con el primero, la respuesta inmune de memoria generada es insuficiente y el tumor se desarrolla. B) Si la maduración de las DCs se produce en presencia de un tumor inmunogénico, pero sin las restricciones ejercidas por las células NK, la expansión de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales se ve favorecida. De esta manera, se genera una respuesta inmune de memoria capaz de eliminar posteriormente un tumor no inmunogénico que comparte un antígeno con el primero.

Según el modelo que proponemos, el bloqueo del punto de control inmunológico PD-1/PD-L1 en los pacientes con cáncer permitiría la interrupción del rol regulador de las células NK sobre las DCs, conduciendo a una potenciación de la activación de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, al promover su expansión y sus funciones efectoras. Esta interrupción podría contribuir al efecto terapéutico de los Acs bloqueantes, en concordancia con la asociación reportada entre la expresión de PD-L1 en el infiltrado inflamatorio tumoral y la respuesta al tratamiento (241), brindando además una explicación racional a la eficacia del tratamiento en algunos pacientes con tumores PD-L1<sup>+</sup>. Por lo tanto, la determinación de la expresión de PD-L1 en las células NK podría permitir refinar la búsqueda de pacientes respondedores y debería ser estudiada como potencial biomarcador terapéutico en pacientes con cáncer.



# CONCLUSIÓN

“De modo que también del amor, como de la guerra, diré por las buenas lo que consigo imaginarme: el arte de escribir historias está en saber sacar de lo poco que se ha comprendido de la vida todo lo demás; pero acabada la página se reanuda la vida y una se da cuenta de que lo que se sabía es muy poco.”

Italo Calvino, *El caballero inexistente*

En conclusión, a lo largo de este trabajo de tesis, utilizando una combinación de estrategias experimentales *in vivo* e *in vitro*, exploramos la capacidad de las células NK de regular el orquestado de la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. Como resultado de este estudio, proponemos un nuevo circuito regulatorio donde las células NK, frente a un tumor inmunogénico, aumentan la expresión de PD-L1 y limitan la maduración de las DCs, lo que resulta en una disminución en la activación de los LT CD8 anti-tumorales y la respuesta de memoria. En particular, nuestros hallazgos permitieron demostrar que:

**Las células NK, si bien *in vitro* reconocen a las células MC57.SIY y despliegan sus funciones efectoras, *in vivo* presentan un fenotipo exhausto y no participan de la eliminación del tumor.**

**Los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, que son esenciales para la eliminación del tumor, se activan espontáneamente siguiendo una cinética que alcanza un máximo hacia el día 11 luego del desafío tumoral.**

**Las células NK regulan la expansión de los LT CD8 específicos contra antígenos tumorales, comprometiendo además sus funciones efectoras y la generación de la subpoblación de LT CD8<sub>ME</sub>. Este fenómeno fue demostrado en dos modelos diferentes de tumores inmunogénicos, pero no se observó al emplear una línea tumoral que no expresa ligandos de NKG2D.**

**El rol regulatorio de las células NK sobre la activación de los LT CD8 anti-tumorales durante la respuesta inmune primaria conduce a una respuesta inmune de memoria menos eficiente, lo cual tiene relevancia fisiopatológica ya que repercute en el control del crecimiento de un tumor secundario no inmunogénico.**

**Las células NK regulan la activación de los LT CD8 anti-tumorales mediante un mecanismo indirecto que involucra la inhibición de la maduración de las DCs tanto *in vivo* como *ex vivo*.**

**Las células NK infiltrantes del tumor expresan altos niveles de PD-L1. *In vitro*, demostramos que el aumento de la expresión de PD-L1 en las células NK de ratón, es dependiente de NKG2D e IFN- $\gamma$ . Además, observamos que diversas líneas tumorales humanas son capaces de inducir el aumento de expresión de PD-L1 en células NK humanas.**

**Las células NK activadas en el tumor modulan la maduración de las DCs, en parte, a través de interacciones entre PD-1 y PD-L1.**

En este trabajo de tesis describimos un novedoso rol regulatorio de las células NK sobre las DCs en el contexto de la respuesta inmune anti-tumoral. En condiciones fisiopatológicas de rápida resolución, podría contribuir a la homeostasis de la respuesta inmune adaptativa, pero en el contexto de un tumor en crecimiento, este mecanismo puede favorecer el escape tumoral al limitar indirectamente la respuesta mediada por los LT CD8. Nuestros resultados además constituyen un aporte para una mejor comprensión del mecanismo de acción de las inmunoterapias basadas en el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 y sugieren que la determinación de PD-L1 en las células NK debería ser estudiada como potencial biomarcador terapéutico en pacientes con cáncer.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

“-Conforme a lo dicho resultan tres clases de camas: una, la que existe en la naturaleza, que, según creo, podríamos decir que es fabricada por Dios, porque, ¿quién otro podría hacerla?

-Nadie, creo yo.

-Otra, la que hace el carpintero.

-Sí -dijo.

-Y otra, la que hace el pintor; ¿no es así?”

Platón, *La República*

1. Global Burden of Disease Cancer C, Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA oncology* 2015;1(4):505-27.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57-70.
3. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* 2011;29:235-71.
4. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010;140(6):883-99.
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144(5):646-74.
6. Pages F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautes-Fridman C, Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 2010;29(8):1093-102.
7. Gajewski TF, Woo SR, Zha Y, Spaapen R, Zheng Y, Corrales L, et al. Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment. *Current opinion in immunology* 2013;25(2):268-76.
8. Galon J, Pages F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *Journal of translational medicine* 2012;10:205.
9. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30(7):1073-81.
10. Houghton J, Stoicov C, Nomura S, Rogers AB, Carlson J, Li H, et al. Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells. *Science* 2004;306(5701):1568-71.
11. Ekblom A, Helmick C, Zack M, Adami HO. Increased risk of large-bowel cancer in Crohn's disease with colonic involvement. *Lancet* 1990;336(8711):357-9.
12. Leroy V, Asselah T. Universal hepatitis B vaccination: the only way to eliminate hepatocellular carcinoma? *Journal of hepatology* 2015.
13. Steenbergen RD, Snijders PJ, Heideman DA, Meijer CJ. Clinical implications of (epi)genetic changes in HPV-induced cervical precancerous lesions. *Nature reviews Cancer* 2014;14(6):395-405.
14. Thompson MP, Kurzrock R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2004;10(3):803-21.
15. Mesri EA, Cesarman E, Boshoff C. Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus. *Nature reviews Cancer* 2010;10(10):707-19.
16. Johnson JM, Harrod R, Franchini G. Molecular biology and pathogenesis of the human T-cell leukaemia/lymphotropic virus Type-1 (HTLV-1). *International journal of experimental pathology* 2001;82(3):135-47.
17. Ting CC, Lavrin DH, Shiu G, Herberman RB. Expression of fetal antigens in tumor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1972;69(7):1664-8.
18. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* 2015;348(6230):69-74.
19. Dubey P, Hendrickson RC, Meredith SC, Siegel CT, Shabanowitz J, Skipper JC, et al. The immunodominant antigen of an ultraviolet-induced regressor tumor is

- generated by a somatic point mutation in the DEAD box helicase p68. *The Journal of experimental medicine* 1997;185(4):695-705.
20. Fuertes MB. Rol del Sistema MICA-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral: Universidad de Buenos Aires; 2008.
  21. Myron Kauffman H, McBride MA, Cherikh WS, Spain PC, Marks WH, Roza AM. Transplant tumor registry: donor related malignancies. *Transplantation* 2002;74(3):358-62.
  22. Gatti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971;28(1):89-98.
  23. Biggar RJ, Chaturvedi AK, Goedert JJ, Engels EA. AIDS-related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(12):962-72.
  24. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 2002;3(11):991-8.
  25. Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007;121(1):1-14.
  26. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *The Journal of experimental medicine* 2011;208(10):1989-2003.
  27. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, et al. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(13):7556-61.
  28. Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 2001;97(1):192-7.
  29. Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *Journal of immunology* 2002;168(3):1356-61.
  30. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001;410(6832):1107-11.
  31. Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, Volkmer JP, Ho PY, McKenna KM, et al. Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015;112(7):2145-50.
  32. Moreno M, Molling JW, von Mensdorff-Pouilly S, Verheijen RH, Hooijberg E, Kramer D, et al. IFN-gamma-producing human invariant NKT cells promote tumor-associated antigen-specific cytotoxic T cell responses. *Journal of immunology* 2008;181(4):2446-54.
  33. Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jeno P, Mori L, De Libero G. Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine* 2003;197(2):163-8.
  34. Moretta L, Bottino C, Pende D, Castriconi R, Mingari MC, Moretta A. Surface NK receptors and their ligands on tumor cells. *Semin Immunol* 2006;18(3):151-8.

35. Wendel M, Galani IE, Suri-Payer E, Cerwenka A. Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands. *Cancer Res* 2008;68(20):8437-45.
36. Mumberg D, Monach PA, Wanderling S, Philip M, Toledano AY, Schreiber RD, et al. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(15):8633-8.
37. Szabo SJ, Sullivan BM, Stemmann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH. Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* 2002;295(5553):338-42.
38. Franciszkievicz K, Boissonnas A, Boutet M, Combadiere C, Mami-Chouaib F. Role of chemokines and chemokine receptors in shaping the effector phase of the antitumor immune response. *Cancer Res* 2012;72(24):6325-32.
39. van Mierlo GJ, Boonman ZF, Dumortier HM, den Boer AT, Fransen MF, Nouta J, et al. Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8+ CTL to cause tumor eradication. *Journal of immunology* 2004;173(11):6753-9.
40. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007;450(7171):903-7.
41. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. *Current opinion in immunology* 2014;27:16-25.
42. Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:267-96.
43. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nature reviews Cancer* 2003;3(6):401-10.
44. Morikawa S, Baluk P, Kaidoh T, Haskell A, Jain RK, McDonald DM. Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *The American journal of pathology* 2002;160(3):985-1000.
45. Pages F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009;27(35):5944-51.
46. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, Richardsen E, Paulsen EE, Hald SM, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2015.
47. Paulsen EE, Kilvaer T, Khanekkenari MR, Maurseth RJ, Al-Saad S, Hald SM, et al. CD45RO(+) Memory T Lymphocytes - a Candidate Marker for TNM-Immunoscore in Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Neoplasia* 2015;17(11):839-48.
48. Sun C, Xu J, Song J, Liu C, Wang J, Weng C, et al. The predictive value of centre tumour CD8+ T cells in patients with hepatocellular carcinoma: comparison with Immunoscore. *Oncotarget* 2015;6(34):35602-15.
49. Goldrath AW, Bevan MJ. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 1999;402(6759):255-62.

50. Qi Q, Liu Y, Cheng Y, Glanville J, Zhang D, Lee JY, et al. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111(36):13139-44.
51. Gerlach C, van Heijst JW, Swart E, Sie D, Armstrong N, Kerkhoven RM, et al. One naive T cell, multiple fates in CD8+ T cell differentiation. *J Exp Med* 2010;207(6):1235-46.
52. Mescher MF, Curtsinger JM, Agarwal P, Casey KA, Gerner M, Hammerbeck CD, et al. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol Rev* 2006;211:81-92.
53. Mitchell DM, Ravkov EV, Williams MA. Distinct roles for IL-2 and IL-15 in the differentiation and survival of CD8+ effector and memory T cells. *J Immunol* 2010;184(12):6719-30.
54. Kurachi M, Kurachi J, Suenaga F, Tsukui T, Abe J, Ueha S, et al. Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration. *J Exp Med* 2011;208(8):1605-20.
55. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011;35(2):161-8.
56. Franciszkiewicz K, Le Floch A, Boutet M, Vergnon I, Schmitt A, Mami-Chouaib F. CD103 or LFA-1 engagement at the immune synapse between cytotoxic T cells and tumor cells promotes maturation and regulates T-cell effector functions. *Cancer Res* 2013;73(2):617-28.
57. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 2003;3(5):361-70.
58. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2002;2(6):401-9.
59. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003;281(1-2):65-78.
60. Topham DJ, Tripp RA, Doherty PC. CD8+ T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J Immunol* 1997;159(11):5197-200.
61. Brincks EL, Katewa A, Kucaba TA, Griffith TS, Legge KL. CD8 T cells utilize TRAIL to control influenza virus infection. *J Immunol* 2008;181(7):4918-25.
62. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 2004;75(2):163-89.
63. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(15):7673-8.
64. Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, et al. Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 1997;272(26):16351-7.
65. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1994;1(6):447-56.
66. Balkwill F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25(3):409-16.



67. Palmer EM, Holbrook BC, Arimilli S, Parks GD, Alexander-Miller MA. IFN $\gamma$ -producing, virus-specific CD8<sup>+</sup> effector cells acquire the ability to produce IL-10 as a result of entry into the infected lung environment. *Virology* 2010;404(2):225-30.
68. Trandem K, Zhao J, Fleming E, Perlman S. Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J Immunol* 2011;186(6):3642-52.
69. Vuillefroy de Silly R, Ducimetiere L, Yacoub Maroun C, Dietrich PY, Derouazi M, Walker PR. Phenotypic switch of CD8(+) T cells reactivated under hypoxia toward IL-10 secreting, poorly proliferative effector cells. *Eur J Immunol* 2015;45(8):2263-75.
70. Li J, Huang ZF, Xiong G, Mo HY, Qiu F, Mai HQ, et al. Distribution, characterization, and induction of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells and IL-17-producing CD8<sup>+</sup> T cells in nasopharyngeal carcinoma. *J Transl Med* 2011;9:189.
71. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 2002;3(7):619-26.
72. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis* 2015;6:e1792.
73. Wherry EJ, Barber DL, Kaech SM, Blattman JN, Ahmed R. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(45):16004-9.
74. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol* 2003;77(8):4911-27.
75. Klebanoff CA, Gattinoni L, Restifo NP. CD8<sup>+</sup> T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunol Rev* 2006;211:214-24.
76. Yajima T, Yoshihara K, Nakazato K, Kumabe S, Koyasu S, Sad S, et al. IL-15 regulates CD8<sup>+</sup> T cell contraction during primary infection. *J Immunol* 2006;176(1):507-15.
77. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4(12):1191-8.
78. Nussbaum AK, Whitton JL. The contraction phase of virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells is unaffected by a pan-caspase inhibitor. *J Immunol* 2004;173(11):6611-8.
79. Petschner F, Zimmerman C, Strasser A, Grillot D, Nunez G, Pircher H. Constitutive expression of Bcl-xL or Bcl-2 prevents peptide antigen-induced T cell deletion but does not influence T cell homeostasis after a viral infection. *Eur J Immunol* 1998;28(2):560-9.
80. Prlic M, Bevan MJ. Exploring regulatory mechanisms of CD8<sup>+</sup> T cell contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(43):16689-94.
81. Ahmed KA, Wang L, Griebel P, Mousseau DD, Xiang J. Differential expression of mannose-6-phosphate receptor regulates T cell contraction. *J Leukoc Biol* 2015;98(3):313-8.
82. Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrancois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001;291(5512):2413-7.
83. Arens R, Schoenberger SP. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev* 2010;235(1):190-205.

84. Roberts AD, Ely KH, Woodland DL. Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses. *J Exp Med* 2005;202(1):123-33.
85. Wherry EJ, Teichgraber V, Becker TC, Masopust D, Kaech SM, Antia R, et al. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003;4(3):225-34.
86. Perret R, Ronchese F. Memory T cells in cancer immunotherapy: which CD8 T-cell population provides the best protection against tumours? *Tissue Antigens* 2008;72(3):187-94.
87. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;353(25):2654-66.
88. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nature reviews Immunology* 2004;4(12):941-52.
89. Ma Y, Shurin GV, Peiyuan Z, Shurin MR. Dendritic cells in the cancer microenvironment. *J Cancer* 2013;4(1):36-44.
90. Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends in immunology* 2013;34(8):361-70.
91. Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nature immunology* 2010;11(2):155-61.
92. Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature reviews Immunology* 2008;8(4):279-89.
93. Bucciarelli LG, Wendt T, Rong L, Lalla E, Hofmann MA, Goova MT, et al. RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2002;59(7):1117-28.
94. Kaisho T. Pathogen sensors and chemokine receptors in dendritic cell subsets. *Vaccine* 2012;30(52):7652-7.
95. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature reviews Immunology* 2010;10(12):826-37.
96. Cai X, Chiu YH, Chen ZJ. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling. *Mol Cell* 2014;54(2):289-96.
97. Savina A, Amigorena S. Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol Rev* 2007;219:143-56.
98. van Montfoort N, van der Aa E, Woltman AM. Understanding MHC class I presentation of viral antigens by human dendritic cells as a basis for rational design of therapeutic vaccines. *Frontiers in immunology* 2014;5:182.
99. Belz GT, Smith CM, Eichner D, Shortman K, Karupiah G, Carbone FR, et al. Cutting edge: conventional CD8 alpha+ dendritic cells are generally involved in priming CTL immunity to viruses. *J Immunol* 2004;172(4):1996-2000.
100. Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity* 2014;41(5):830-42.
101. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *J Exp Med* 2011;208(10):2005-16.

102. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* 2014;41(5):843-52.
103. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 2007;13(9):1050-9.
104. Esche C, Lokshin A, Shurin GV, Gastman BR, Rabinowich H, Watkins SC, et al. Tumor's other immune targets: dendritic cells. *J Leukoc Biol* 1999;66(2):336-44.
105. Pinzon-Charry A, Maxwell T, Lopez JA. Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol* 2005;83(5):451-61.
106. Park SJ, Namkoong H, Doh J, Choi JC, Yang BG, Park Y, et al. Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells. *Journal of leukocyte biology* 2014;95(4):621-9.
107. Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 1996;74(5):975-83.
108. Lee BN, Follen M, Rodriguez G, Shen DY, Malpica A, Shearer WT, et al. Deficiencies in myeloid antigen-presenting cells in women with cervical squamous intraepithelial lesions. *Cancer* 2006;107(5):999-1007.
109. Perrot I, Blanchard D, Freymond N, Isaac S, Guibert B, Pacheco Y, et al. Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage. *J Immunol* 2007;178(5):2763-9.
110. Ormandy LA, Farber A, Cantz T, Petrykowska S, Wedemeyer H, Horning M, et al. Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006;12(20):3275-82.
111. Pinzon-Charry A, Ho CS, Maxwell T, McGuckin MA, Schmidt C, Furnival C, et al. Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer. *Br J Cancer* 2007;97(9):1251-9.
112. Schmidt SV, Nino-Castro AC, Schultze JL. Regulatory dendritic cells: there is more than just immune activation. *Front Immunol* 2012;3:274.
113. Ilarregui JM, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, et al. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol* 2009;10(9):981-91.
114. Park SJ, Nakagawa T, Kitamura H, Atsumi T, Kamon H, Sawa S, et al. IL-6 regulates in vivo dendritic cell differentiation through STAT3 activation. *Journal of immunology* 2004;173(6):3844-54.
115. Melillo JA, Song L, Bhagat G, Blazquez AB, Plumlee CR, Lee C, et al. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *Journal of immunology* 2010;184(5):2638-45.
116. Ferlazzo G, Moretta L. Dendritic cell editing by natural killer cells. *Crit Rev Oncog* 2014;19(1-2):67-75.
117. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9(5):503-10.
118. Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 2006;18(4):391-8.

119. Wallin RP, Screpanti V, Michaelsson J, Grandien A, Ljunggren HG. Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *Eur J Immunol* 2003;33(10):2727-35.
120. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrott RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 2001;193(6):661-70.
121. Salcedo TW, Azzoni L, Wolf SF, Perussia B. Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol* 1993;151(5):2511-20.
122. Topham NJ, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology* 2009;128(1):7-15.
123. Thielens A, Vivier E, Romagne F. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol* 2012;24(2):239-45.
124. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Carrega P, Mantovani A, Ferlazzo G, et al. Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett* 2014;161(2):168-73.
125. Shimizu I, Tomita Y, Zhang QW, Iwai T, Matsuzaki G, Yasui H. Different expressions of Ly-49 receptors on mouse NK and NK T cells. *Immunobiology* 2001;204(4):466-76.
126. Orr MT, Lanier LL. Inhibitory Ly49 receptors on mouse natural killer cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2011;350:67-87.
127. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9(5):495-502.
128. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005;436(7054):1186-90.
129. Carayannopoulos LN, Yokoyama WM. Recognition of infected cells by natural killer cells. *Curr Opin Immunol* 2004;16(1):26-33.
130. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, et al. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005;42(4):501-10.
131. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, et al. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 1999;190(10):1505-16.
132. Pessino A, Sivori S, Bottino C, Malaspina A, Morelli L, Moretta L, et al. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 1998;188(5):953-60.
133. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, et al. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 1998;187(12):2065-72.
134. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 2009;113(22):5488-96.
135. Omi A, Enomoto Y, Kiniwa T, Miyata N, Miyajima A. Mature resting Ly6C(high) natural killer cells can be reactivated by IL-15. *Eur J Immunol* 2014;44(9):2638-47.

136. Robbins SH, Nguyen KB, Takahashi N, Mikayama T, Biron CA, Brossay L. Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells. *J Immunol* 2002;168(6):2585-9.
137. Huntington ND, Tabarias H, Fairfax K, Brady J, Hayakawa Y, Degli-Esposti MA, et al. NK cell maturation and peripheral homeostasis is associated with KLRG1 up-regulation. *J Immunol* 2007;178(8):4764-70.
138. Elpek KG, Rubinstein MP, Bellemare-Pelletier A, Goldrath AW, Turley SJ. Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15R $\alpha$  complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(50):21647-52.
139. Ito M, Maruyama T, Saito N, Koganei S, Yamamoto K, Matsumoto N. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J Exp Med* 2006;203(2):289-95.
140. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001;413(6852):165-71.
141. Wu J, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res* 2003;90:127-56.
142. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 2008;27(45):5932-43.
143. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000;356(9244):1795-9.
144. Jin J, Fu B, Mei X, Yue T, Sun R, Tian Z, et al. CD11b(-)CD27(-) NK cells are associated with the progression of lung carcinoma. *PLoS One* 2013;8(4):e61024.
145. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, Mingari MC, Moretta L. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014;44(6):1582-92.
146. Guillerey C, Smyth MJ. NK Cells and Cancer Immunoediting. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015.
147. Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy BA. Natural killer cell-triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol* 2011;8(1):1-11.
148. Ayach BB, Yoshimitsu M, Dawood F, Sun M, Arab S, Chen M, et al. Stem cell factor receptor induces progenitor and natural killer cell-mediated cardiac survival and repair after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(7):2304-9.
149. Bruno A, Ferlazzo G, Albin A, Noonan DM. A think tank of TINK/TANKs: tumor-infiltrating/tumor-associated natural killer cells in tumor progression and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2014;106(8):dju200.
150. Mailloux AW, Young MR. NK-dependent increases in CCL22 secretion selectively recruits regulatory T cells to the tumor microenvironment. *J Immunol* 2009;182(5):2753-65.
151. Park YJ, Song B, Kim YS, Kim EK, Lee JM, Lee GE, et al. Tumor microenvironmental conversion of natural killer cells into myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res* 2013;73(18):5669-81.
152. Rabinovich BA, Li J, Shannon J, Hurren R, Chalupny J, Cosman D, et al. Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *J Immunol* 2003;170(7):3572-6.
153. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-

- dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* 2007;110(2):606-15.
154. Soderquest K, Walzer T, Zafirova B, Klavinskis LS, Polic B, Vivier E, et al. Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J Immunol* 2011;186(6):3304-8.
  155. Waggoner SN, Taniguchi RT, Mathew PA, Kumar V, Welsh RM. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J Clin Invest* 2010;120(6):1925-38.
  156. Lang PA, Lang KS, Xu HC, Grusdat M, Parish IA, Recher M, et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(4):1210-5.
  157. Peppas D, Gill US, Reynolds G, Easom NJ, Pallett LJ, Schurich A, et al. Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *J Exp Med* 2013;210(1):99-114.
  158. Lu L, Ikizawa K, Hu D, Werneck MB, Wucherpfennig KW, Cantor H. Regulation of activated CD4+ T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity* 2007;26(5):593-604.
  159. Waggoner SN, Cornberg M, Selin LK, Welsh RM. Natural killer cells act as rheostats modulating antiviral T cells. *Nature* 2012;481(7381):394-8.
  160. Cook KD, Whitmire JK. The depletion of NK cells prevents T cell exhaustion to efficiently control disseminating virus infection. *J Immunol* 2013;190(2):641-9.
  161. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, Wikstrom ME, Khong A, Voigt V, et al. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med* 2010;207(6):1333-43.
  162. Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, Grandien A, Ljunggren HG, Smyth MJ, et al. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol* 2004;172(1):123-9.
  163. Schuster IS, Wikstrom ME, Brizard G, Coudert JD, Estcourt MJ, Manzur M, et al. TRAIL+ NK cells control CD4+ T cell responses during chronic viral infection to limit autoimmunity. *Immunity* 2014;41(4):646-56.
  164. Laffont S, Seillet C, Ortaldo J, Coudert JD, Guery JC. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood* 2008;112(3):661-71.
  165. Ehlers M, Papewalis C, Stenzel W, Jacobs B, Meyer KL, Deenen R, et al. Immunoregulatory natural killer cells suppress autoimmunity by down-regulating antigen-specific CD8+ T cells in mice. *Endocrinology* 2012;153(9):4367-79.
  166. Gray JD, Hirokawa M, Horwitz DA. The role of transforming growth factor beta in the generation of suppression: an interaction between CD8+ T and NK cells. *J Exp Med* 1994;180(5):1937-42.
  167. Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, Vidal SM, Biron CA. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med* 2009;206(10):2235-51.
  168. Deniz G, Erten G, Kucuksezer UC, Kocacik D, Karagiannidis C, Aktas E, et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol* 2008;180(2):850-7.

169. Cooper MA, Fehniger TA, Fuchs A, Colonna M, Caligiuri MA. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol* 2004;25(1):47-52.
170. Amakata Y, Fujiyama Y, Andoh A, Hodohara K, Bamba T. Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin Exp Immunol* 2001;124(2):214-22.
171. Borg C, Jalil A, Laderach D, Maruyama K, Wakasugi H, Charrier S, et al. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 2004;104(10):3267-75.
172. Zhu J, Huang X, Yang Y. A critical role for type I IFN-dependent NK cell activation in innate immune elimination of adenoviral vectors in vivo. *Mol Ther* 2008;16(7):1300-7.
173. Miller G, Lahrs S, Dematteo RP. Overexpression of interleukin-12 enables dendritic cells to activate NK cells and confer systemic antitumor immunity. *FASEB J* 2003;17(6):728-30.
174. Semino C, Angelini G, Poggi A, Rubartelli A. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* 2005;106(2):609-16.
175. Vujanovic L, Szymkowski DE, Alber S, Watkins SC, Vujanovic NL, Butterfield LH. Virally infected and matured human dendritic cells activate natural killer cells via cooperative activity of plasma membrane-bound TNF and IL-15. *Blood* 2010;116(4):575-83.
176. Lucas M, Schachterle W, Oberle K, Aichele P, Diefenbach A. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 2007;26(4):503-17.
177. Barreira da Silva R, Munz C. Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci* 2011;68(21):3505-18.
178. Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L, Vivier E. Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 2005;106(7):2252-8.
179. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Pende D, Arico M, Moretta L, et al. NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor. *Blood* 2005;106(2):566-71.
180. Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 1997;90(5):1920-6.
181. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 2004;5(12):1260-5.
182. Hayashi T, Faustman DL. Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Res* 2002;62(1):24-7.
183. Khanna R. Tumour surveillance: missing peptides and MHC molecules. *Immunol Cell Biol* 1998;76(1):20-6.
184. Leone P, Shin EC, Perosa F, Vacca A, Dammacco F, Racanelli V. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(16):1172-87.
185. Fuertes MB, Girart MV, Molinero LL, Domaica CI, Rossi LE, Barrio MM, et al. Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in

- human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 2008;180(7):4606-14.
186. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008;180(11):7249-58.
  187. Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, et al. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 2007;282(26):18922-8.
  188. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002;169(8):4098-102.
  189. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734-8.
  190. O'Connell J, Houston A, Bennett MW, O'Sullivan GC, Shanahan F. Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma. *Nat Med* 2001;7(3):271-4.
  191. Restifo NP. Not so Fas: Re-evaluating the mechanisms of immune privilege and tumor escape. *Nat Med* 2000;6(5):493-5.
  192. Ryan AE, Shanahan F, O'Connell J, Houston AM. Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo. *Cancer Res* 2005;65(21):9817-23.
  193. Li JH, Rosen D, Sondel P, Berke G. Immune privilege and FasL: two ways to inactivate effector cytotoxic T lymphocytes by FasL-expressing cells. *Immunology* 2002;105(3):267-77.
  194. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer cell* 2015;27(4):450-61.
  195. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252-64.
  196. Atefi M, Avramis E, Lassen A, Wong DJ, Robert L, Foulad D, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(13):3446-57.
  197. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med* 2007;13(1):84-8.
  198. Blank C, Brown I, Peterson AC, Spiotto M, Iwai Y, Honjo T, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer research* 2004;64(3):1140-5.
  199. Bellucci R, Martin A, Bommarito D, Wang K, Hansen SH, Freeman GJ, et al. Interferon-gamma-induced activation of JAK1 and JAK2 suppresses tumor cell susceptibility to NK cells through upregulation of PD-L1 expression. *Oncoimmunology* 2015;4(6):e1008824.
  200. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, Fagarasan S, Honjo T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol* 2013;14(12):1212-8.
  201. Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH. The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol* 2005;23:515-48.



202. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 2000;192(7):1027-34.
203. Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8(12):1353-62.
204. Mempel TR, Pittet MJ, Khazaie K, Weninger W, Weissleder R, von Boehmer H, et al. Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity* 2006;25(1):129-41.
205. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2005;202(8):1075-85.
206. Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 2006;107(10):3925-32.
207. Tiemessen MM, Jagger AL, Evans HG, van Herwijnen MJ, John S, Taams LS. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(49):19446-51.
208. Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S. Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(29):10113-8.
209. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine* 2004;10(9):942-9.
210. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature reviews Immunology* 2006;6(4):295-307.
211. Nishikawa H, Sakaguchi S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int J Cancer* 2010;127(4):759-67.
212. Chaudhry A, Rudensky AY. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. *J Clin Invest* 2013;123(3):939-44.
213. Oderup C, Cederbom L, Makowska A, Cilio CM, Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006;118(2):240-9.
214. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 2011;332(6029):600-3.
215. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008;133(5):775-87.
216. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 2012;12(4):253-68.
217. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, Rodriguez P, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res* 2010;70(1):68-77.
218. Movahedi K, Guillemins M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived

- suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 2008;111(8):4233-44.
219. Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, et al. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004;5(3):241-51.
220. Dalotto-Moreno T, Croci DO, Cerliani JP, Martinez-Allo VC, Dergan-Dylon S, Mendez-Huergo SP, et al. Targeting galectin-1 overcomes breast cancer-associated immunosuppression and prevents metastatic disease. *Cancer Res* 2013;73(3):1107-17.
221. Croci DO, Salatino M, Rubinstein N, Cerliani JP, Cavallin LE, Leung HJ, et al. Disrupting galectin-1 interactions with N-glycans suppresses hypoxia-driven angiogenesis and tumorigenesis in Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 2012;209(11):1985-2000.
222. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003;9(10):1269-74.
223. Zelenay S, van der Veen AG, Bottcher JP, Snelgrove KJ, Rogers N, Acton SE, et al. Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* 2015;162(6):1257-70.
224. Wrzesinski SH, Wan YY, Flavell RA. Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clin Cancer Res* 2007;13(18 Pt 1):5262-70.
225. Kim J, Modlin RL, Moy RL, Dubinett SM, McHugh T, Nickoloff BJ, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 1995;155(4):2240-7.
226. Aruga A, Aruga E, Tanigawa K, Bishop DK, Sondak VK, Chang AE. Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. *J Immunol* 1997;159(2):664-73.
227. Loser K, Apelt J, Voskort M, Mohaupt M, Balkow S, Schwarz T, et al. IL-10 controls ultraviolet-induced carcinogenesis in mice. *J Immunol* 2007;179(1):365-71.
228. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013;39(1):1-10.
229. Milas L, Mason KA, Ariga H, Hunter N, Neal R, Valdecanas D, et al. CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation. *Cancer research* 2004;64(15):5074-7.
230. Lorenzi S, Mattei F, Sistigu A, Bracci L, Spadaro F, Sanchez M, et al. Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8alpha(+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming. *Journal of immunology* 2011;186(9):5142-50.
231. Eggermont AM, Suci S, Santinami M, Testori A, Kruit WH, Marsden J, et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. *Lancet* 2008;372(9633):117-26.

232. Fyfe G, Fisher RI, Rosenberg SA, Sznol M, Parkinson DR, Louie AC. Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1995;13(3):688-96.
233. Hong M, Puaux AL, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control. *Cancer research* 2011;71(22):6997-7009.
234. Spear P, Barber A, Rynda-Apple A, Sentman CL. NKG2D CAR T-cell therapy inhibits the growth of NKG2D ligand heterogeneous tumors. *Immunology and cell biology* 2013;91(6):435-40.
235. Voskens CJ, Goldinger SM, Loquai C, Robert C, Kaehler KC, Berking C, et al. The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network. *PLoS One* 2013;8(1):e53745.
236. O'Sullivan Coyne G, Madan RA, Gulley JL. Nivolumab: promising survival signal coupled with limited toxicity raises expectations. *J Clin Oncol* 2014;32(10):986-8.
237. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol* 2014;32(10):1020-30.
238. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2443-54.
239. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res* 2015;75(11):2139-45.
240. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braiteh FS, Loria Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* 2014;515(7528):558-62.
241. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* 2014;515(7528):563-7.
242. Emens LA, Middleton G. The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies. *Cancer Immunol Res* 2015;3(5):436-43.
243. Zhang B, Bowerman NA, Salama JK, Schmidt H, Spiotto MT, Schietinger A, et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. *The Journal of experimental medicine* 2007;204(1):49-55.
244. Usharauli D, Perez-Diez A, Matzinger P. The JAM Test and its daughter P-JAM: simple tests of DNA fragmentation to measure cell death and stasis. *Nature protocols* 2006;1(2):672-82.
245. Bustin SA. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla: International University Line; 2004.
246. Spiotto MT, Yu P, Rowley DA, Nishimura MI, Meredith SC, Gajewski TF, et al. Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. *Immunity* 2002;17(6):737-47.
247. Schuster K, Gadiot J, Andreesen R, Mackensen A, Gajewski TF, Blank C. Homeostatic proliferation of naive CD8+ T cells depends on CD62L/L-selectin-mediated homing to peripheral LN. *European journal of immunology* 2009;39(11):2981-90.

248. Ochsenbein AF, Klenerman P, Karrer U, Ludewig B, Pericin M, Hengartner H, et al. Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96(5):2233-8.
249. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol* 2008;8(2):107-19.
250. Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 2000;1(2):119-26.
251. Gray JD, Hirokawa M, Ohtsuka K, Horwitz DA. Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *J Immunol* 1998;160(5):2248-54.
252. Schiavoni G, Mattei F, Gabriele L. Type I Interferons as Stimulators of DC-Mediated Cross-Priming: Impact on Anti-Tumor Response. *Front Immunol* 2013;4:483.
253. Yao S, Wang S, Zhu Y, Luo L, Zhu G, Flies S, et al. PD-1 on dendritic cells impedes innate immunity against bacterial infection. *Blood* 2009;113(23):5811-8.
254. Riley JL. PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol Rev* 2009;229(1):114-25.
255. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):298-306.
256. Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, et al. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 2000;191(4):661-8.
257. Morandi B, Mortara L, Chiossone L, Accolla RS, Mingari MC, Moretta L, et al. Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. *PLoS One* 2012;7(6):e39170.
258. Cote M, Menager MM, Burgess A, Mahlaoui N, Picard C, Schaffner C, et al. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J Clin Invest* 2009;119(12):3765-73.
259. Fogel LA, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther* 2013;15(4):216.
260. Park YW, Kee SJ, Cho YN, Lee EH, Lee HY, Kim EM, et al. Impaired differentiation and cytotoxicity of natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2009;60(6):1753-63.
261. Ciampolillo A, Guastamacchia E, Amati L, Magrone T, Munno I, Jirillo E, et al. Modifications of the immune responsiveness in patients with autoimmune thyroiditis: evidence for a systemic immune alteration. *Curr Pharm Des* 2003;9(24):1946-50.
262. Cameron AL, Kirby B, Griffiths CE. Circulating natural killer cells in psoriasis. *Br J Dermatol* 2003;149(1):160-4.
263. Zhang B, Yamamura T, Kondo T, Fujiwara M, Tabira T. Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells. *J Exp Med* 1997;186(10):1677-87.
264. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2005;163(1-2):24-30.

265. Beilke JN, Kuhl NR, Van Kaer L, Gill RG. NK cells promote islet allograft tolerance via a perforin-dependent mechanism. *Nat Med* 2005;11(10):1059-65.
266. Rydzynski C, Daniels KA, Karmele EP, Brooks TR, Mahl SE, Moran MT, et al. Generation of cellular immune memory and B-cell immunity is impaired by natural killer cells. *Nat Commun* 2015;6:6375.
267. Crouse J, Xu HC, Lang PA, Oxenius A. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol* 2015;36(1):49-58.
268. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991;254(5038):1643-7.
269. Gnjatic S, Nishikawa H, Jungbluth AA, Gure AO, Ritter G, Jager E, et al. NY-ESO-1: review of an immunogenic tumor antigen. *Adv Cancer Res* 2006;95:1-30.
270. Sha WC, Nelson CA, Newberry RD, Kranz DM, Russell JH, Loh DY. Selective expression of an antigen receptor on CD8-bearing T lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 1988;335(6187):271-4.
271. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012;366(26):2455-65.
272. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N Engl J Med* 2015;372(26):2509-20.
273. Cerwenka A. New twist on the regulation of NKG2D ligand expression. *J Exp Med* 2009;206(2):265-8.
274. Wortham BW, Eppert BL, Flury JL, Morgado Garcia S, Borchers MT. TLR and NKG2D signaling pathways mediate CS-induced pulmonary pathologies. *PLoS One* 2013;8(10):e78735.
275. Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The Next Immune-Checkpoint Inhibitors: PD-1/PD-L1 Blockade in Melanoma. *Clin Ther* 2015.
276. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Coudert JD, Desbois M, et al. Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res* 2012;72(11):2757-67.
277. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 2002;8(8):793-800.
278. Chambers BJ, Salcedo M, Ljunggren HG. Triggering of natural killer cells by the costimulatory molecule CD80 (B7-1). *Immunity* 1996;5(4):311-7.
279. Butte MJ, Keir ME, Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity* 2007;27(1):111-22.
280. Butte MJ, Pena-Cruz V, Kim MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. Interaction of human PD-L1 and B7-1. *Mol Immunol* 2008;45(13):3567-72.
281. Park JJ, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 2010;116(8):1291-8.

282. Paterson AM, Brown KE, Keir ME, Vanguri VK, Riella LV, Chandraker A, et al. The programmed death-1 ligand 1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *J Immunol* 2011;187(3):1097-105.
283. Stojanovic A, Fiegler N, Brunner-Weinzierl M, Cerwenka A. CTLA-4 is expressed by activated mouse NK cells and inhibits NK Cell IFN-gamma production in response to mature dendritic cells. *J Immunol* 2014;192(9):4184-91.
284. Poggi A, Carosio R, Spaggiari GM, Fortis C, Tambussi G, Dell'Antonio G, et al. NK cell activation by dendritic cells is dependent on LFA-1-mediated induction of calcium-calmodulin kinase II: inhibition by HIV-1 Tat C-terminal domain. *J Immunol* 2002;168(1):95-101.
285. Jaakkola I, Merinen M, Jalkanen S, Hanninen A. Ly6C induces clustering of LFA-1 (CD11a/CD18) and is involved in subtype-specific adhesion of CD8 T cells. *J Immunol* 2003;170(3):1283-90.
286. Barber DF, Faure M, Long EO. LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity. *J Immunol* 2004;173(6):3653-9.
287. Degli-Esposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2005;5(2):112-24.
288. Wilson JL, Heffler LC, Charo J, Scheynius A, Bejarano MT, Ljunggren HG. Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells. *J Immunol* 1999;163(12):6365-70.
289. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, Valiante NM. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 2002;195(3):335-41.
290. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195(3):327-33.
291. Lunemann A, Lunemann JD, Munz C. Regulatory NK-cell functions in inflammation and autoimmunity. *Mol Med* 2009;15(9-10):352-8.