Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Impacto de los inhibidores de Deacetilasas de Histonas (iHDAC) sobre la funcionalidad de células NK

Rossi, Lucas Ezequiel

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Rossi, Lucas Ezequiel. (2012). Impacto de los inhibidores de Deacetilasas de Histonas (iHDAC) sobre la funcionalidad de células NK. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Rossi, Lucas Ezequiel. "Impacto de los inhibidores de Deacetilasas de Histonas (iHDAC) sobre la funcionalidad de células NK". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Impacto de los inhibidores de Deacetilasas de Histonas (iHDAC) sobre la funcionalidad de células NK

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Lic. Lucas Ezequiel Rossi

Director de tesis: Dr. Norberto Walter Zwirner

Consejero de Estudios: Dr. Jorge Muschietti

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunopatología, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2012

Resumen

Impacto de los inhibidores de deacetilasas de histonas (iHDAC) sobre la funcionalidad de células NK

Desde el descubrimiento de que la expresión y funcionalidad de las deacetilasas de histonas (HDAC) se encuentra alterada en muchos tumores y que las mismas contribuyen a la carcinogénesis, se han desarrollado inhibidores de HDAC (iHDAC) para el tratamiento del cáncer. Los iHDAC inducen apoptosis, arresto del ciclo celular e inhibición de la angiogénesis en células tumorales. Sin embargo, no se ha estudiado adecuadamente el impacto de los iHDAC sobre células del sistema inmune involucradas en la respuesta anti-tumoral. Por eso y debido a la relevancia de las células NK en la respuesta contra tumores, **el objetivo de esta tesis fue estudiar el impacto de los iHDAC sobre estas células**. Hemos demostrado que los iHDAC Tricostatina A (TSA), valproato de sodio (VPA) y butirato de sodio (NaB) inhibieron la producción de IFN-γ y la actividad citotóxica de células NK humanas. Aunque las drogas indujeron apoptosis en una fracción de las células NK, la marcada inhibición de sus funciones efectoras también se debió a la inhibición de la translocación nuclear de NF-κB y a una modulación negativa en la expresión de receptores activadores (NKG2D, NKp44 y NKp46), receptores de citoquinas (IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2Rγ e IL-18R) y de la subunidad α del receptor de IL-2 de alta afinidad (CD25). Además, demostramos que esta modulación negativa de NKG2D, NKp46 y CD25 fue funcionalmente relevante. Estos resultados fueron validados *in vivo* con células NK de ratones tratados con TSA, las que mostraron una menor expresión de los receptores NK1.1, NKG2D y NKp46, y una menor producción de IFN-γ en respuesta a la estimulación *ex vivo* con citoquinas. Asimismo, comenzamos un estudio con muestras de sangre de pacientes epilépticos tratados con VPA ya que las células NK de estos pacientes se encuentran expuestas sólo a los efectos de la droga. Observamos un menor porcentaje de células NK en células mononucleares de los pacientes, las que exhibieron una menor expresión de receptores activadores, una menor producción de IFN-γ y una menor capacidad de degranulación. Estos resultados indican que estas drogas poseen efectos supresores sobre células NK (comprometidas en la inmunovigilancia contra tumores) y contribuyen al diseño de nuevos enfoques para el desarrollo de drogas terapéuticas que no comprometan la respuesta inmune anti-tumoral.

Palabras clave: células NK - inhibidores de deacetilasas de histonas - IFN-γ - receptores de citoquinas - citotoxicidad - receptores activadores

Abstract

Impact of Histone deacetylases inhibitors (HDACi) on NK cell functions

Since the discovery that many tumors exhibit altered expression and activity of different histone deacetylases (HDAC) and that they contribute to carcinogenesis, many HDAC inhibitors (HDACi) have been developed for the treatment of cancer. HDACi can induce apoptosis, cell cycle arrest and inhibit angiogenesis on tumor cells. However, their impact on cells of the immune system involved in immune surveillance against tumors has not been studied. Thus, **the aim of this work was to investigate the effect HDACi on NK cells as they constitute critical actors of the anti-tumor immune response**. We have demonstrated that the HDACi Tricostatin A (TSA), sodium valproate (VPA) and sodium butyrate (NaB) inhibited *in vitro* IFN-γ production and cytolytic activity by human NK cells. Although the drugs induced apoptosis of a minor fraction of NK cells, the strong inhibition of their effector functions involves additional mechanisms such as inhibition NF-κB p50 nuclear translocation and down-regulation of activating receptors (NKG2D, NKp44 and NKp46), cytokine receptors (IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2Rγ, IL-18R) and CD25 (the α chain of the high affinity IL-2R). Downregulation of NKG2D, NKp46 and CD25 were functionally relevant. Our results were validated *in vivo*, in HDACi treated mice, which exhibited NK cells with lower expression of the activating receptors NK1.1, NKp46 and NKG2D, and produced less IFN-γ upon *ex vivo* stimulation with cytokines. Preliminary data obtained with peripheral blood mononuclear cells from epileptic patients treated with VPA, showed that these patients exhibited lower percentages of NK cells than normal controls, and these NK cells presented lower expression of NKG2D and NKp46, lower IFN-γ production upon stimulation with citokynes and lower degranulation after stimulation with K562 cell line. Thus, our results suggest that HDACi have immunosuppressive effects on NK cells that may dampen their immune surveillance capacity. Our results may contribute to the development of drugs with a higher therapeutic eficacy which do not compromise immune response.

Key words: NK cells - histone deacetylases inhibitors - IFN-γ - citokyne receptors - cytotoxicity - activating receptors

Agradecimientos

Creo que todo agradecimiento es consecuencia directa de un reconocimiento hacia una persona, un espacio o simplemente una memoria y creo que ese debería ser el verdadero título de esta sección.

En mi caso particular, además de que esta situación implica el duelo que significa concluir una etapa de la vida (y los duelos pueden ser dolorosos pero no siempre son malos; simplemente son una puerta a nuevas experiencias), también es una despedida de este ámbito en el que me formé. Muchos fueron partícipes o testigos de este recorrido y como yo no hice tesina de licenciatura, es la primera vez que escribo esto y no querría olvidarme de nadie, así que va para largo…

Hace ya más de 12 años que empecé a recorrer este camino que ahora estoy cerrando, en el que, además de la formación académica, coseché muchísimos tesoros más. Cuando miro hacia atrás me encuentro con una interminable colección de recuerdos y todos los que me conocen saben que tengo una especial capacidad para traerlos al presente y describirlos con lujo de detalle.

Como decía, el camino comenzó allá por el año 99, cuando empecé el CBC para ingresar a la carrera de Licenciado en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Por eso, mi primer reconocimiento y agradecimiento es para mi querida facultad, que me vió llegar como uno de esos pibes que no sabía del todo bien en lo que se metía. Ahí, recibí una formación académica que considero de excelencia, de la mano de muchos docentes cuyas palabras todavía recuerdo con claridad. Pero además pude formar casi un segundo hogar. Mi facultad era mi segunda casa: un lugar donde pasaba largas horas semanales, un lugar donde me sentía realmente cómodo y a gusto, donde pude disfrutar de muchas cosas más además del estudio. Si tuviera que conjugar esos sentimientos en una palabra, esa sería IDENTIDAD. E inspirado en las palabras de Lara, mi pareja, aprovecho el momento y hago extensivo este agradecimiento a todas las universidades nacionales y públicas, que defienden a capa y espada ese derecho a la educación gratuita que debería ser una garantía para todos los habitantes de este suelo.

El siguiente agradecimiento es para mi director. Además de ser un excelente profesional, Norberto es una excelente persona y eso no es pavada en este ámbito. Un tipo verdaderamente humilde, de una paciencia y una calidad docente ejemplar para formar a sus becarios, con el que siempre pude contar para lo que fuera en el laboratorio. Jamás incurrió en maltratos ni presiones innecesarias, supo darme el espacio para aprender a pipetear, a formar mi propio criterio y mis propias ideas, las que siempre pude discutir abiertamente con él. Y siempre supo respetar el hecho de que fuera de este laboratorio, también hay una vida privada y que esas dos cosas no se mezclan. GRACIAS por haberme abierto las puertas de tu grupo de investigación y por haberme dado esta oportunidad.

Ahí nomás, pegados a Norberto, vienen mis compañeros de grupo. Primero estuvieron Mer, Caro y Viqui ("la vieja guardia"). Ustedes me enseñaron a pipetear en el laboratorio Satz y a trabajar en equipo, siendo solidario, y nunca me hicieron pagar derecho de piso por ser el nuevo o el menos

experimentado. Hoy, 7 años después de ese 9 de marzo de 2005 en el que comencé mi concurrencia al Satz, ya no solo son mis compañeras sino mis amigas entrañables. Después llegaron los más pequeños ("la nueva escuela"): Damián, Germán, Andre y Xime. Junto a ustedes armamos de nuevo ese equipo, que había quedado un poco desperdigado por esas vueltas de la vida (pequeños "retoños", postdocs en el extranjero, etc), pero por suerte eso fue transitorio. Ahora estamos todos juntos nuevamente . Me aguantaron en la etapa más fastidiosa de mi doctorado y eso solo ya es digno de enorme reconocimiento. Siempre estuvieron "al pie del cañón", con la mejor predisposición para trabajar juntos. Esta tesis difícilmente hubiera sido posible sin su ayuda. Por eso, por haberme recibido e integrado, y por su amistad, GRACIAS.

Los galectinos, los de antes y los de ahora: Marta, Yoni, Naty, Leo, Panza, Marian, Sebas, Tomy, Viqui S., Toti, Pelado, Rambo, Verito, Claudia, Tucu-man. El vínculo con cada uno es único, pero el denominador común es el mismo: desde el Satz y hasta hoy, generamos y mantuvimos entre todos el mejor ambiente de trabajo al que se puede aspirar. Camaradería, solidaridad y el mejor humor. Que buenos momentos que pasamos juntos! Lamentablemente, es imposible plasmar todos en el papel sin que esto se haga demasiado largo para un agradecimiento. Espero que esos momentos, además de perdurar en la memoria, se continúen en el futuro. GRACIAS.

Las contribuciones experimentales del Panza y de Lara para el paper fueron esenciales.Las artistas gráficas Marta y Lara contribuyeron a mejorar sustancialmente la calidad de esta tesis (y el Panza, casi…una pena de verdad). La compilación final…otra vez, Lara al rescate. GRACIAS.

Agradezco al Dr. Rabinovich por habernos invitado a formar parte del Laboratorio de Inmunopatología del IBYME.

El laboratorio Satz, ese lugar medio perdido en los recovecos del enorme Hospital de Clínicas, fue donde comenzó la historia del mi doctorado. Allá todavía trabajan Guille Giambartolomei, Juli Cassataro y sus respectivos grupos: Astrid, Kari, Clarita, Lorena y los nuevos integrantes que se incorporaron más recientemente, cuando ya nos habíamos mudado al IBYME. En el Satz también estuvieron Rochy y Vero García y su grupo: Vir, Gus y Flor. Todos ellos también fueron partícipes de esta historia. Me integraron y conociéndolos me enriquecí en lo académico y en lo personal, porque también siento que me llevé sus amistades y recuerdos muy divertidos. GRACIAS.

A mi amiga Paulita Barrionuevo le reservo un agradecimiento especial, porque además de todos estos años de amistad, vos me ayudaste a encontrarme con Norberto y con un ambiente de trabajo realmente amigable y libre de hostilidades. GRACIAS.

El laboratorio de Inmunogenética, el hermano mayor del Satz, también fue testigo de multitudinarios y muy divertidos almuerzos. A todos ellos: Ana, Vero, Grace, los Chulus. GRACIAS.

En el laboratorio de Inmunología de la Academia Nacional de Medicina di mis primeros pasos en esta disciplina. No puedo decir que todos los momentos ahí vividos hayan sido gratos, pero aprendí mucho y por sobre todo, conocí a personas valiosísimas por quienes tengo mucho cariño, como Martín Isturiz, Macarena Beigier-Bompadre, Maricarmen Sasiaín, Sonia Gómez, Silvia de La Barrera, Gaby Fernández, Jorge Geffner, Analía Trevani. Y también pude generar vínculos con becarios como yo, que con el mejor humor llevaban adelante proyectos maravillosos. Hoy en día son doctores/as e investigadores/as: Pablito Schierloh y Vero Landoni. GRACIAS.

El IBYME representó para mí una nueva arena en la que pude conocer gente nueva y desarrollarme libremente como profesional, en un clima realmente muy agradable. Somos una generación de varios becarios que, cada uno con sus propias dificultades y triunfos, está terminando su doctorado. Tampoco me quiero olvidar de los chicos de seguridad (José, Dani, Aldo y compañía), los de mantenimiento (Héctor, Fernando, Rubén y Luis), la gente del lavadero (Hilda, Teresa y Dani), Flavia, Gabriela y Marcela en la biblioteca, Mala corriendo por las escaleras. Todas personas cuyo aporte es esencial para que nuestro trabajo se haga posible en el día a día y con quienes además he compartido momentos muy gratos. En la biblioteca, las compañeras de escritura Fátima, Ana, Carla, Vale y Vani supieron amenizar esta tarea que por momentos se puso tediosa. Y el ritual futbolístico de los Martes sigue absolutamente vigente: entre patadas, puteadas, gritos, sudor y goles, junto al "plantel masculino" del Complejo Obligado descargo energías y me divierto a lo loco. GRACIAS.

Luego de dos sesiones con Juan Carlos Bolnovich, que fueron casi como charlas en familia, me contacté con Silvia Yankelevich. Ella, desde su sillón, sentada frente a mí, en charlas semanales me ayudó a decidir que caminos seguir. GRACIAS.

A Ana, la Colo y Leti las conocí durante la carrera. Desde julio del 2007, tuve además la buena suerte de poder compartir el mismo ámbito de trabajo con mis amigas. Y nuestra amistad se siguió cultivando entre mates, almuerzos y "pasilleadas". GRACIAS.

Para mis amigos de la facultad, no hay palabras que describan mejor mi agradecimiento que cuando entre sonrisas y carcajadas evocamos vivencias compartidas. Son el mejor regalo que me dió Exactas. Nos encontramos, nos juntó el destino, nos juntó el viento, llámenlo como quieran. La cuestión es que en ese segundo hogar, ustedes fueron mi familia. Los quiero mucho a todos. GRACIAS por tantos años de hermosos momentos.

Mi familia sanguínea es muy grande, pero quiero hacer un reconocimiento especial a cuatro de sus miembros. En primer lugar, a mis tíos Héctor y Cristina, ambos referentes científicos en mi vida. Fueron los primeros en enseñarme una disciplina verdaderamente compleja, la física, y fueron los mejores docentes que jamás tuve en el área. Siempre encontraron la manera de transmitir los conceptos de forma absolutamente clara, con el mayor de los afectos y sacrificando su propio tiempo para ayudarme cada vez que lo necesité. Mi tío Negro, que desde su lugar de excelencia como médico siempre se preocupó por saber cómo me estaba yendo en el doctorado y por discutir conmigo actualizaciones en el área de inmunología. Mi primo el Oso. Vos sabés que de todos los primos que tengo guardo un especial afecto por tu persona, siempre preocupado por como andaba mi trabajo con los ratones (jaja!). A pesar de la distancia, siempre estás cerca. Por la compañía en estos años, a todos, GRACIAS.

Y hace ya unos tres años, mi familia se agrandó. Allá en Carlos Casares, en ese pueblo que aprendí a querer como si hubiera vivido ahí, siempre que vamos de visita nos espera Anaí, la mamá de Lara. Y entre mates en la quintita, picadas con salames de lo de Sánchez y quesos de La Mamona, pasamos buenos momentos juntos en un lugar de una tranquilidad especial. Con algo de "timing", coincidimos con la presencia de Iván, el hermano de Lara, con quien preparamos algún rico asadito o vamos a probar suerte con la pesca en el Canal Mercante. GRACIAS por haberme aceptado.

Las mascotas son parte de la familia y nuestros gatitos Ramón, Beto y Ciro nos dibujan sonrisas diariamente con sus picardías. Tomás, mi querido perro, ya no está. Pero fue mi amigo y me

siguió de cerca, con su espíritu vigoroso y juguetón y su hociquito al viento, durante la mitad de mi vida. GRACIAS por ese cariño incondicional.

Melina es mi hermana. Cada tanto, hay una "tirada de pelos" (figurativamente hablando), pero por detrás de eso hay un vínculo de mutua admiración y respeto. Somos muy distintos en algunas cosas, pero compartimos la misma sangre y los mismos pensamientos en lo esencial de esta vida. Y ella sabe que su hermano va a estar presente, para ayudarla y cuidarla como siempre lo hizo. GRACIAS.

Papá y Mamá. Quisieron lo mejor para mí y para Melina, y nos dieron todo lo que estuvo a su alcance (que fue muchísimo…). Y aún nos lo siguen dando, con el mayor de los amores. Nos acompañaron en todas las nuevas etapas de nuestras vidas, brindándonos todo el apoyo necesario. Esta tesis que sostienen ahora en sus manos es gracias a ustedes y para ustedes. GRACIAS.

Había una vez una chica, que desde la ventana de su laboratorio del IBYME miraba pasar a un chico alto y se preguntaba "¿quién será ese malhumorado que siempre pasa refunfuñando?". Poco tiempo después, esas dos personas se conocieron y yo me encontré finalmente con esos ojos que siempre me miran con dulzura y que nunca quiero dejar de mirar. Lara, me cambiaste la vida para siempre. Y vos también sabés…GRACIAS…

Mis abuelos ya no están físicamente presentes, pero siguen vivos en mi memoria. Lamentablemente, me tuve que despedir de tres de ellos cuando era muy chico. Mi abuelo paterno, Giordano, estuvo junto a nosotros hasta que el cuerpo ya no le aguantó. Se lamentaba de que probablemente no iba a poder verme recibido. Hoy estoy acá también gracias a ellos. Nada más que con un martillo, un yunque, una fragua o aguja e hilo en sus manos, se deshicieron para que sus hijos, mis padres, pudieran llegar a la universidad. Mis papás fueron la primera generación de universitarios de nuestra familia. Después seguimos Melina y yo, cumpliendo el que fue su anhelo y por segunda vez, el sueño de mis abuelos. Este logro también es suyo. GRACIAS.

A papá y mamá

En memoria de mis abuelos

“Pertenezco al grupo de los impacientes, al grupo de los inconformes y al de los que siempre presionan para que las cosas se hagan bien”

Fidel

“I will make my way through, one more day…

I will hold the candle, till it burns up my arm
I´ll keep taking punches, till their will grows tired
I will stare the sundown, until my eyes go blind
I won´t change direction, and I won´t change my mind…”

Eddie Vedder

"Hoy, nuestra capacidad tecnológica es muy insuficiente, como resultado de un histórico proceso de dependencia. Así, nuestras investigaciones siguen modelos teóricos del mundo industrializado. Se inspiran más en las realidades y necesidades de este último que en las nuestras. Y, cada vez con mayor frecuencia, miles de científicos y profesionales abondonan sus patrias para servir en los países opulentos; exportamos ideas y personas capacitadas; importamos tecnología y dependencia."

Salvador Allende, III UNCTAD, 13 de abril de 1972

Los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral forman parte de la siguiente publicación:

"Histone deacetylase inhibitors impair NK cell viability and effector functions through inhibition of activation and receptor expression"

Lucas E. Rossi, Damán E. Avila, Raúll G. Spallanzani, Andrea Ziblat, Mercedes B. Fuertes, Lara Lapyckyj, Diego O. Croci, Gabriel A. Rabinovich, Carolina I. Domaica, and Norberto W. Zwirner

Journal of Leukocyte Biology, Vol 91: 321-331 (2012).

Indice

Abreviaturas 15

Introducción 17

1. Células NK 17

2. Receptores de células NK humanas 20

2.1. Receptores específicos de moléculas clase I del HLA 21

2.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC) 22

2.1.1.a. Receptores KIR 22

2.1.1.b. Receptores ILT (o LIR) 22

2.1.2. Complejo de receptores de citotoxicidad natural (NKC): CD94/NKG2 23

2.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA 24

2.2.1. Receptores asociados a ITAM 24

2.2.1.a. CD16 (FcγRIII) 24

2.2.1.b. Natural cytotoxicity receptors (NCR) 24

2.2.2. Receptores no asociados a ITAM 25

2.2.2.a. NKp80 25

2.2.2.b. NKG2D 25

3. Receptores para quemoquinas, receptores tipo Toll (TLR) y receptores para citoquinas 26

4. Células NK de ratón 28

5. Ligandos de NKG2D (NKG2DL) 29

6. Tumores 30

7. Sistema inmune y cáncer 31

8. Remodelación de la cromatina 37

8.1. Remodelación de la cromatina 37

8.2. Remodelación de la cromatina en cáncer 39

9. Inhibidores de HDAC (iHDAC) 42

9.1. Una nueva generación de drogas con potencial aplicación en la clínica 42

9.2. iHDAC como drogas anti-tumorales 44

9.3. Combinación de iHDAC con otras terapias anti-tumorales 46

9.4. Los iHDAC en la clínica 47

Objetivo 50
Materiales y Métodos 52
1. Líneas celulares 52
2. Anticuerpos 52
3. Reactivos 53
4. Experimentos *in vivo* 53
5. Aislamiento de células T $CD4^+$ y células NK humanas 54
6. Muestras de pacientes 55
7. Citometría de flujo (CF) 55
7.1. Inmunomarcación directa de superficie 55
7.2. Inmunomarcación indirecta de superficie 56
7.3. Inmunomarcación intracitoplasmática directa 56
7.4. Ensayo "single cell assay" 56
7.5. Apoptosis 57
7.6. Ensayo de citotoxicidad con Anexina V 58
7.7. Ensayo de citotoxicidad redirigida o "redirected killing assay" 58
8. ELISA para IFN-γ 59
9. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal 59
10. Extracción de RNA y PCR en tiempo real (*Real time PCR*) 60
11. Análisis estadístico 61
Resultados 63
1. Expresión de NKG2DL en líneas celulares tratadas con iHDAC 63
2. Impacto de los iHDAC sobre las funciones efectoras de las células NK 64
2.1. Impacto de los iHDAC en la producción de IFN-γ de células NK 64
2.2. Impacto de los iHDAC sobre la degranulación y capacidad citotóxica de las células NK 66
3. Mecanismo de acción de los iHDAC sobre las células NK 69
3.1. Toxicidad de los iHDAC sobre las células NK 69
3.2. Modulación de la actividad del factor de transcripción STAT4 71
3.3. Modulación de la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB 71
3.4. Modulación de la expresión de receptores de citoquinas 72
3.5. Modulación de la expresión de receptores activadores de células NK 73
4. Duración del efecto de los iHDAC 78
5. Impacto de los iHDAC sobre células NK activadas 80
6. iHDAC y rol de CD25 82

7. Consecuencias funcionales de la modulación de la expresión de receptores activadores por iHDAC 83
8. Impacto de los iHDAC sobre células NK *in vivo* 84
8.1. Impacto de los iHDAC sobre células NK murinas in vitro 84
8.2. Efecto *in vivo* de la TSA sobre la producción de IFN-γ por células NK 85
8.3. Efecto *in vivo* de la TSA sobre la expresión de receptores activadores en células NK 86
9. Impacto *in vivo* del VPA sobre la funcionalidad de células NK en humanos 87
Discusión 93
Conclusiones 103
Bibliografía 106

Abreviaturas

HDAC: deacetilasa de histonas

iHDAC: inhibidor de deacetilasas de histonas

TSA: Tricostatina A

VPA: ácido valproico o valproato de sodio

NaB: butirato de sodio

Ac: Anticuerpo

AcMo: Anticuerpo monoclonal

CI: Control de isotipo

AV: Anexina V

IP. Ioduro de Propidio

CF: Citometría de flujo

CD: Célula dendrítica

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

NK: Natural Killer

MICA/B: MHC class I chain related A y B

NKG2DL: Ligando de NKG2D

ULPBs: UL16 binding proteins

CMSP: Células Mononucleares de Sangre Periférica

Introducción

Introducción

1. Células NK

Las células citotóxicas naturales (*natural killer* o NK) comprenden aproximadamente de un 5 a un 15⁄ de las células linfoides circulantes en sangre periférica. Se originan en médula ósea a partir de un precursor $CD34^{+}$, aunque hoy en día se sabe que pueden madurar a partir de precursores presentes en otros sitios tales como el hígado fetal o neonatal, el bazo, los ganglios linfáticos y el timo. Para su maduración requieren de varias citoquinas, entre las cuales la IL-15 liberada por células estromales de la médula ósea, parece tener un papel crucial en la diferenciación hacia el linaje de células NK [1]. Otras citoquinas tales como la IL-7, el SCF (*stem cell factor*) y el Flt3-L (*Flt3 ligand*) jugarían además un papel relevante en las etapas tempranas de su maduración [1, 2]. Esta maduración puede ocurrir en ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones [3]. Sin embargo, las células NK comparten un precursor común con los linfocitos T (diferente del que da lugar a los linfocitos B y a los granulocitos/macrófagos) que sufre diferenciación hacia un linaje T o NK en función del microambiente [4]. Evidencias recientes en modelos murinos indican que el factor de transcripción E4BP4 (también conocido como NFIL3) es esencial para la generación del linaje de células NK [5, 6]. Este factor de transcripción constituye el primer factor de transcripción especifico del linaje de células NK que se ha descripto.

Las células NK fueron descriptas hace más de 30 años por su capacidad de lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH). Este concepto le permitió a Klas Kärre proponer la hipótesis del m*issing self*, en la que se planteaba que las células NK monitoreaban los niveles de expresión de moléculas de clase I del CMH sobre la célula y destruían a aquéllas células que por diversos mecanismos habían dejado de expresar niveles normales de estas moléculas [2], generalmente células tumorales o infectadas con virus, a través de uno o más receptores inhibitorios. Aunque se las asoció inmediatamente con el fenómeno de vigilancia inmunológica, el reconocimiento de células con niveles bajos o nulos de moléculas de clase I del CMH implicaba necesariamente la existencia de receptores activadores de citotoxicidad que dispararan su actividad biológica. En este sentido, las moléculas de clase I del CMH no son siempre necesarias para proteger de la lisis por parte de las células NK. Por ejemplo, las células NK son incapaces de rechazar tejidos no hematopoyéticos deficientes en moléculas de clase I del CMH e *in vitro* no pueden lisar fibroblastos de ratones

deficientes en β2-microglobulina (que no expresan moléculas de clase I del CMH) [7]. Por otro lado, la expresión de moléculas de clase I del CMH en células que son "sensadas" por las células NK no siempre es suficiente para prevenir la citotoxicidad. Algunas células infectadas con virus que mantienen la expresión de moléculas de clase I del CMH en superficie son lisadas eficientemente por células NK autólogas [8], y células NK activadas con Interleuquina (IL)-2 aumentan la actividad citotóxica comparada con células NK no estimuladas y adquieren así la capacidad de lisar células blanco resistentes [9]. Estas observaciones apuntan a la existencia y rol crucial de los receptores activadores en la regulación de la función efectora de las células NK.

La unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco no sólo desencadena la citotoxicidad sino que también promueve la producción de citoquinas, la migración de las células NK, su activación y su proliferación. Cada célula NK parece expresar su propio repertorio de receptores activadores e inhibidores (usualmente entre 3 y 4 de cada tipo) de manera que la citotoxicidad se encuentra finalmente regulada por un balance de señales provenientes de receptores inhibidores que interactúan con las moléculas de clase I del CMH y de receptores activadores algunos de los cuales reconocen moléculas relacionadas con la molécula de clase I del CMH en las células blanco [10].

Por otro lado, el rol de las células NK como "citotóxicas naturales" está siendo revisado ya que existe una gran proporción de células NK en sangre periférica fenotípicamente maduras pero con una muy baja actividad citotóxica contra células blanco susceptibles [11]. Se ha comprobado que las células NK requieren distintos pasos de activación, regulados por distintos receptores y citoquinas con el fin de adquirir la capacidad citotóxica en respuesta al reconocimiento de las células blanco [12-14]. Tanto los sitios anatómicos done ocurren estas etapas de maduración final como así también las células que proveen las señales de maduración no son totalmente conocidas. Existen evidencias que indican que las células dendríticas (CDs) y/o los monocitos y macrófagos serían los responsables de promover tales señales. Este "diálogo" no sólo tiene consecuencias sobre las células NK, sino que se trata de una interacción bidireccional que también resulta en la maduración, activación o apoptosis de las CDs dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares [15, 16]. Se ha demostrado que la interacción *in vivo* entre CDs y células NK juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune eficiente contra células infectadas con virus y células tumorales [17-22].

Como consecuencia de este diálogo recíproco establecido entre las CDs y las células NK se produce una estimulación bidireccional a lo largo de la cual las CDs adquieren capacidad de actuar como CPA (células presentadoras de antígeno) profesionales. Simultáneamente, en un proceso que involucra la *trans*-presentación de IL-15 por las CDs [23], las células NK adquieren la capacidad de ejercer funciones efectoras citotóxicas contra distintas células tumorales y la capacidad de secretar citoquinas inmunorregulatorias (principalmente, IFN-γ). Las células NK se convierten así en una

fuente temprana de IFN-γ necesaria para la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1. Este programa de diferenciación es iniciado por la IL-12 liberada por CDs maduras y requiere del factor de transcripción T-bet [24]. El IFN-γ tiene un papel doble en la polarización hacia el perfil Th1, ya que por un lado induce un aumento en la producción de IL-12 por CDs y por otra parte sinergiza con las señales transducidas a través del TCR en linfocitos T con el objeto de maximizar la expresión de T-bet y consecuentemente la expresión del receptor de IL-12 en células T vírgenes inmunocompetentes.

En humanos se han identificado dos subpoblaciones de células NK que se caracterizan por poseer funciones especializadas diferentes. La subpoblación mayoritaria (90⁄) expresa bajos niveles de CD56 ($CD56^{dim}$) y altos niveles del receptor de tipo IIIA para la porción Fc de la inmunoglobulina G CD16 ($CD16^{bright}$). Estas células son las responsables de la citotoxicidad natural que las hace capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo* [2, 25] y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) [2]. No expresan CCR7 ni L-selectina (CD62L) pero expresan altos niveles de LFA-1 y otras moléculas de adhesión, por lo que se supone que son capaces de migrar a tejidos periféricos donde ejercen su actividad [26]. Por el contrario, la subpoblación minoritaria de células NK de sangre periférica (10⁄) expresan altos niveles de CD56 ($CD56^{bright}$) y niveles bajos o nulos de CD16 ($CD16^{dim}$ o $CD16^{-}$). Esta población constituye una fuente importante de citoquinas inmunorregulatorias tales como IFN-γ, TNF-α (*Tumor Necrosis Factor* α), TNF-β, IL-10, IL-13 y GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor*), las que juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la respuesta inmune innata y el disparo de la respuesta inmune adaptativa. Esta subpoblación de células NK expresa altos niveles de CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y anidar en órganos linfáticos secundarios, donde liberan las citoquinas que regularían la respuesta adaptativa de linfocitos T y B [26]. Se ha demostrado que las células NK de la población $CD56^{bright}$ son precursores que dan lugar a las células $CD56^{dim}$ luego de la activación por citoquinas en sangre periférica [27]. Aunque hasta hace poco se consideraba a las células NK $CD56^{dim}CD16^{bright}$ como la subpoblación de células NK que ejercían la actividad citotóxica pero con una baja o nula capacidad de producir IFN-γ, en un trabajo publicado muy recientemente se demostró que la subpoblación $CD56^{dim}$ responde rápidamente frente a determinados estímulos gatillados a través de los receptores activadores o frente a citoquinas. Sin embargo, dicha producción de IFN-γ disminuye rápidamente luego de 16 h de estímulo. En contraste, la subpoblación $CD56^{bright}$ secreta IFN-γ a tiempos más tardíos (superiores a 16 h post-estímulo), por lo que las $CD56^{dim}$ serían las encargadas de la respuesta inicial y la rápida producción de IFN-γ, mientras que las $CD56^{bright}$ serían las encargadas de sostener la producción de IFN-γ en el tiempo [28].

Se ha demostrado que las CDs co-localizan con las células NK en las áreas T de los ganglios linfáticos [29]. En ensayos realizados *in vitro*, se ha observado que CDs fueron capaces de estimular la subpoblación de células NK $CD56^{bright}CD16^{dim}$ [29]. Por otro lado, el bloqueo de IL-12 suprimió la producción de IFN-γ mediada por células NK e inducida por CDs, mientras que IL-15 unida a la membrana de CDs fue esencial para la proliferación y la sobrevida de estas células NK [29]. Por lo tanto, los resultados indican que los órganos linfáticos secundarios son un sitio crucial donde se establece la interacción entre CDs y células NK, y que las citoquinas IL-12 e IL-15 producidas por CDs ejercerían un rol importante en la activación de células NK *in vivo*.

Debido a las características descriptas, las células NK se han considerado tradicionalmente como células de la inmunidad innata. Sin embargo, descubrimientos recientes han puesto en duda esta clasificación [30]. En un modelo de hipersensibilidad inducida por contacto a un hapteno químico [31], y en un modelo de infección con citomegalovirus murino (CMVM) [32] se demostró la existencia de células NK de "memoria" [32]. Usando un sistema de transferencia adoptiva de células NK en el que podía realizarse su seguimiento con un marcador congénito, se observó que una subpoblación de células NK (caracterizadas por la expresión del receptor activador de ratón Ly49H) experimenta una fuerte expansión celular, lo que conduce a células NK de "memoria" que permanecen en el hospedador hasta varios meses después de la infección primaria. Estas células NK, luego de una re-estimulación con el antígeno viral, pasan por una fuerte expansión, degranulan y producen citoquinas rápidamente y en mayor cantidad que células NK vírgenes [32]. Es importante destacar que si bien todos estos hallazgos se realizaron en un modelo de infección viral, es posible pensar también en la existencia de células NK de "memoria" durante el crecimiento tumoral, en particular debido al estímulo sostenido producido por las células tumorales. Otros investigadores observaron que cuando se transferían células NK activadas con citoquinas a ratones $Rag^{-/-}$ vírgenes de tratamiento, estas células NK eran detectables entre 7 y 22 días después de su transferencia adoptiva y que no producían IFN-γ [33]. Sin embargo, cuando se re-estimularon las células NK transferidas empleando citoquinas se observó una producción de IFN-γ significativamente mayor en comparación a la cantidad de IFN-γ producido por células NK que no habrían recibido el estímulo con citoquinas [33]. En su conjunto, estos experimentos demuestran la existencia células NK de "memoria" capaces de responder más eficientemente a desafío o estímulo de activación.

2. Receptores de células NK humanas

A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos T y B, las células NK no emplean un único receptor para el reconocimiento de las células blanco. Por el contrario, expresan un conjunto de

receptores asociados a cascadas de señalización intracelular específicas. Durante los últimos años se ha caracterizado un número importante de estos receptores, todos los cuales son proteínas integrales de membrana asociados a subunidades transductoras de señales específicas.

Funcionalmente, los receptores de células NK se dividen en inhibidores y activadores [34, 35]. Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática uno o más de un dominio ITIM (I*mmunereceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif,* cuya secuencia es V/IxYxxL/V), que luego de fosforilarse reclutan fosfatasas de la familia SHP-1 que previenen el desarrollo de las funciones efectoras de las células NK. Por el contrario, los receptores activadores poseen una cola citoplasmática corta que carece del dominio ITIM [25, 36]. Para llevar a cabo la señalización se asocian con diferentes moléculas adaptadoras, tales como CD3ζ, FcεRIγ y DAP12, que poseen motivos ITAM (I*mmunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*, cuya secuencia es YxxLx$_{6\text{-}8}$YxxL/I) o DAP10, que contiene un motivo YxxM. La unión de estos receptores a sus ligandos resulta en la activación de una cascada de fosforilación, mediada por tirosín-quinasas intracelulares que en última instancia llevan a la producción de citoquinas y la movilización de gránulos secretorios que contienen perforina y granzimas [37].

Como se mencionara, la actividad citotóxica de las células NK se encuentra finamente regulada por la integración de señales de activación e inhibición que reciben a través de los receptores respectivos. En condiciones normales, prevalecen las señales desencadenadas por los receptores inhibitorios, que mayoritariamente reconocen moléculas de clase I del CMH. En situaciones patológicas (principalmente en células tumorales o infectadas con virus) en las que se produce una disminución en la expresión de ligandos de receptores inhibitorios de células NK o en situaciones en las que se produce un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores de células NK, se genera un balance en la señalización intracelular en favor del desarrollo de las funciones efectoras [10, 38]. Sin embargo, en el caso de las células tumorales, en las que se produce a menudo tanto una disminución en los niveles de expresión de moléculas de clase I del CMH como un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores, suele observarse crecimiento y metástasis, lo que sugiere la existencia de mecanismos de escape de la inmunidad anti-tumoral y/o el desarrollo de una inmunidad anti-tumoral deficiente para el control y erradicación de las células cancerosas que comprometen no sólo a las CDs, monocitos y linfocitos [39] sino también a las células NK [40].

2.1. Receptores específicos de moléculas clase I del HLA

Desde el punto de vista de la organización de los genes, existen 2 grandes grupos de receptores de células NK:

1) el complejo de receptores leucocitarios o LRC (*leukocyte receptor complex*)

2) el complejo de receptores de citotoxicidad natural o NKC (*natural killer complex*).

El grupo de los LRCs comprende 2 familias de genes que se encuentran en el cromosoma 19 humano: los receptores de tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) y los receptores ILT (*immunoglobulin-like transcripts*) o LIR (*leukocyte inhibitory receptors*). Por otra parte, los genes del NKC mapean en el cromosoma 12 humano y comprenden mayoritariamente a miembros de la familia de genes NKG2 [41].

2.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC)

2.1.1.a. Receptores KIR

En las células NK humanas, el reconocimiento de diferentes alelos de clase I del HLA (*human leukocyte antigen*) -A, -B y -C está mediado por miembros de la familia KIR (CD158), codificados dentro del complejo LRC. Estos receptores son glicoproteínas de membrana de tipo I. Se pueden identificar dos subfamilias de receptores KIR, basadas en el número de dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas en su región extracelular [42]. La subfamilia KIR3D contiene tres dominios, mientras que la subfamilia KIR2D contiene dos. A su vez, los dominios citoplasmáticos de los KIR pueden ser largos (L) o cortos (S), lo que se corresponde con su función como receptores inhibitorios o activadores, respectivamente. Los KIRs inhibitorios contienen dos secuencias ITIM en sus dominios citoplasmáticos [43]. Por otra parte, los receptores activadores no señalizan directamente, sino que se asocian no covalentemente con otras moléculas adaptadoras con motivos ITAM que sirven como unidades de transducción de señales [42]. Existe una excepción, el receptor KIR2DL4, que aunque posee dominio citoplasmático largo con una secuencia ITIM, puede tener función activadora o inhibitoria [44].

En general, los KIR3D reconocen alelos HLA-A y –B, mientras que los receptores KIR2D reconocen alelos HLA-C [45-47]. Los KIR inhibitorios se expresan además en linfocitos T activados donde modulan sus funciones [36, 42, 43].

2.1.1.b. Receptores ILT (o LIR)

La familia ILT/LIR se compone de 13 genes relacionados que codifican proteínas con 2 o 4 dominios extracelulares de la superfamilia de las inmunoglobulinas [42]. Estos receptores están ampliamente distribuidos en las células del sistema inmune. Se los encuentra expresados en monocitos, macrófagos, CDs y algunas subpoblaciones de linfocitos B y células NK. La presencia de

secuencias ITIM en las regiones citoplasmáticas de ILT2, 4, 5 y 8 sugiere que actuarían como receptores inhibitorios en una forma análoga a los KIRs.

Un miembro de esta familia, ILT2 (LIR-1), es un receptor inhibitorio que se une a distintas moléculas clase I del CMH, incluyendo la molécula no clásica HLA-G. ILT2 se expresa en monocitos, macrófagos, células B, CDs, células NK y en una subpoblación de células T, donde actúa como modulador negativo de sus funciones efectoras [36, 47].

2.1.2. Complejo de receptores de citotoxicidad natural (NKC): CD94/NKG2

Los receptores pertenecientes a la familia CD94/NKG2 pertenecen al grupo de las lectinas de tipo C y son heterodímeros (excepto NKG2D) unidos por puentes disulfuro, expresados como proteínas de membrana de tipo II en células NK y subpoblaciones de células T. Los genes que codifican para CD94 y NKG2 están localizados dentro del complejo NKC. La subunidad CD94 del receptor es invariante y está codificada por un solo gen. Por otro lado, NKG2 es una familia multigénica de al menos 5 miembros, designados NKG2A (y su variante generada por *splicing* alternativo, NKG2B), NKG2C, NKG2D y NKG2E [48, 49]. Los dominios extracelulares de unión al ligando de NKG2A/B, -C y -E comparten un alto grado de homología. Los dominios citoplasmáticos pueden ser tanto largos (NKG2A/B) o cortos (NKG2C y E), correspondientes a isoformas CD94/NKG2 inhibitorias o activadoras respectivamente [42, 50]. Los heterodímeros CD94/NKG2A o B, como todos los receptores inhibitorios, poseen motivos ITIM en su cola citoplasmática. El heterodímero CD94/NKG2C se asocia a través de su cola citoplasmática con la proteína adaptadora DAP12 [51], que señaliza en forma similar a la cadena CD3ζ, mediante la activación de tirosín-quinasas luego de la fosforilación del motivo ITAM presente en su porción citoplasmática [52]. Por otra parte, las formas inhibitorias se unen a sus ligandos con mayor afinidad que su contraparte activadora.

Los heterodímeros CD94/NKG2A, B y C son receptores para la molécula no clásica de clase I del CMH HLA-E [53]. La expresión de HLA-E en superficie celular requiere de un péptido que deriva de la secuencia líder de cadenas α de las otras moléculas de clase I del CMH (HLA-A, -B, -C y -G). La disminución en la síntesis de estas moléculas de clase I del HLA coordinadamente reducen la expresión de HLA-E a causa de una menor disponibilidad del péptido necesario para el ensamblaje, estabilización y transporte a superficie celular de HLA-E [54]. Por lo tanto, la expresión de niveles normales de HLA-E es un indicador de la biosíntesis normal de moléculas de clase I del CMH. De esta manera, los receptores CD94/NKG2 fueron seleccionados con el objeto de monitorear la integridad de la vía de síntesis de moléculas de clase I del HLA y detectar alteraciones inducidas entre otros por proteínas codificadas en el genoma de diferentes tipos de virus [36].

2.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA

La mayoría de los receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA son receptores activadores. Entre estos receptores se encuentra un grupo asociado a proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM, tales como CD16 y los receptores de citotoxicidad natural ((*Natural Cytotoxicity* Receptors o NCR). Otro grupo de receptores está compuesto por moléculas asociadas a proteínas adaptadoras sin motivos ITAM. Entre éstos se encuentran los miembros de la familia de CD2, CD2 [55], CD244 (2B4) [56] y CRACC [57], NTB-A [58], CD226 (DNAM-1) [59], NKp80 [60] y el receptor NKG2D, que es el más estudiado [61].

2.2.1. Receptores asociados a ITAM

2.2.1.a. CD16 (FcγRIII)

Es un receptor que une las porciones Fc de la IgG. De esta manera media la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de células blanco. Señaliza a través de las cadenas CD3ζ y FcεRIγ. Si bien CD16 es uno de los receptores activadores más importantes en la jerarquía de receptores de las células NK [62], para ejercer su acción requiere de anticuerpos específicos (IgG) contra antígenos de superficie de las células tumorales o infectadas. Sin embargo, debido a que durante las etapas tempranas de la respuesta inmune adaptativa hay una limitada disponibilidad de estos anticuerpos, los otros receptores jugarían un papel más preponderante en la actividad de las células NK. La importancia del receptor CD16 como mediador de la CCDA es particularmente relevante como mecanismo efector del Rituximab, un anticuerpo monoclonal (AcMo) anti-CD20 humanizado empleado como tratamiento en determinados pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) [63, 64].

2.2.1.b. Natural cytotoxicity receptors (NCR)

A esta familia de receptores pertenecen tres receptores activadores de citotoxicidad cuya expresión se encuentra restringida a células NK. Estas tres moléculas, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, fueron denominadas NKp46 (CD335) [65], NKp44 (CD336) [66] y NKp30 (CD337) [67]. Son glicoproteínas transmembrana de 46, 44 y 30 kDa respectivamente, involucrados en el reconocimiento y la lisis de células tumorales humanas y células infectadas con virus [37].

El receptor NKp46 es expresado por todas las células NK (en reposo y activadas) por lo que hace unos años se sugirió que sería un excelente marcador de la población NK [12]. Su porción citoplasmática no contiene ningún motivo ITAM. En cambio la región transmembrana contiene un

aminoácido cargado positivamente (R), que estaría involucrado en la estabilización de la interacción con las proteínas adaptadoras CD3ζ y FcεRIγ necesarias para su función activadora [65].

El receptor NKp44 tiene una expresión restringida a células NK activadas, mientras que está ausente en células NK no activadas de sangre periférica. Al igual que NKp46, su región transmembrana posee un aminoácido cargado positivamente (K), que le permite asociarse a DAP12 [66].

El receptor NKp30 se expresa selectivamente en todas las células NK. Se asocia con cadenas CD3ζ, probablemente a través de un aminoácido cargado positivamente (R), presente en la región transmembrana [67].

Los receptores NKp44 y NKp46 son sialilados, lo que les permite unirse a la hemaglutinina del virus de la influenza y de esta manera reconocer células infectadas con este virus y activar la función citotóxica de las células NK [68, 69]. NKp30 está involucrado en el reconocimiento de CDs [70]. Además, NKp30, NKp44 y NKp46 son importantes para el reconocimiento y lisis de células tumorales [71]. Aunque recientemente se ha demostrado que proteoglicanos de heparán-sulfato en la superficie de las células blanco están involucrados en este reconocimiento, los ligandos reconocidos sobre estas células por los receptores NKp30, 44 y 46 son aún desconocidos [72, 73].

2.2.2. Receptores no asociados a ITAM

2.2.2.a. NKp80

NKp80 [60] pertenece a la familia de las lectinas de tipo C y se expresa como homodímero sólo en la superficie de células NK. Reconoce como ligando a la lectina de tipo C inducida por activación (AICL o CLEC-2B), que se expresa específicamente en células mieloides, monocitos, macrófagos y granulocitos. Asimismo, hay evidencias experimentales que muestran que la interacción entre NKp80 y AICL es importante para la activación mutua entre las células NK y monocitos/macrófagos [14], lo que puede influir en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune.

2.2.2.b. NKG2D

NKG2D (CD314) fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y col, como un cDNA expresado por células NK humanas [49]. El rol de esta molécula fue ignorado hasta 1999, cuando NKG2D fue identificado como receptor de una molécula relacionada con el CMH de clase I, denominada MICA (*MHC class I chain-related gene A*) [74]. Desde entonces, NKG2D y sus ligandos fueron objeto de intensa investigación.

NKG2D se expresa en forma constitutiva como homodímero en superficie celular en todas las células NK y linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ $CD8^+$. Este homodímero se une a la proteína adaptadora DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones [75, 76]. La proteína DAP10 no contiene motivos ITAM, pero tiene un motivo YxxM que está implicado en la unión a la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K, [75]) y a Grb [77], mientras que DAP12 contiene un motivo ITAM citoplasmático que recluta y activa a las tirosin-quinasas Syc o ZAP-70, las que disparan una cascada de eventos que desembocan en el desarrollo de la citotoxicidad. Por otra parte, su expresión aumenta por efecto de IL-12 e IFN-α en células NK y por IL-15 en LT $CD8^+$ [35, 75, 78, 79]. NKG2D puede actuar como molécula coestimulatoria en células NK cuando éstas reciben señales de activación a través de NKp30, NKp44, NKp46 o NKp80, o como estructura primaria de reconocimiento de ligandos sobre células blanco [62]. Esta función dual hace que NKG2D sea una molécula muy versátil [76, 80, 81], clave durante respuestas inmunes innatas y adaptativas. La estimulación de células NK a través de NKG2D gatilla una señal tan intensa que es capaz de sobrepasar a la señal inhibitoria disparada por el reconocimiento de moléculas de clase I del CMH por parte de los receptores inhibitorios KIR, conduciendo a la lisis de la célula blanco.

3. Receptores para quemoquinas, receptores tipo Toll (TLR) y receptores para citoquinas

Las células NK también expresan receptores para quemoquinas. Específicamente, la subpoblación $CD56^{bright}$ expresa los receptores CCR5, CXCR3 y CXCR4, lo que les permite migrar en respuesta a las quemoquinas RANTES (CCL5), MIP-1β (CCL4), ITAC (CXCL11) e IP-10 (CXCl10), mientras que la subpoblación $CD56^{dim}$ expresa los receptores CXCR1 y CX3CR1, respondiendo a IL-8 (CXCL8) y Fraktalquina (CX3CL1) [82]. Consecuentemente, ambas poblaciones poseen el potencial de migrar hacia tejidos inflamados donde luego podrán ser estimuladas mediante moléculas asociadas a membrana, citoquinas secretadas localmente y otros factores solubles.

Las funciones efectoras de las células NK no se encuentran reguladas únicamente por receptores activadores e inhibitorios. Estas células expresan un abanico de receptores entre los que también se cuentan algunos receptores de tipo Toll (*Toll Like Receptors* o TLR) y receptores para citoquinas (**Figura 1**). Entre los TLR que expresan las células NK, se encuentran los receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 [83, 84]. Esto les permite reconocer diversos patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) tales como ARN doble cadena, ARN simple cadena, imidazoquinolinas y motivos CpG no metilados, lo que desemboca en la activación de las células NK.

Por otro lado, las células NK también poseen la capacidad de responder a diversas citoquinas (**Figura 1**) [85]. Algunos ejemplos de relevancia son la IL-2, que promueve la sobrevida a través de la

inducción de Bcl-2 (*B cell lymphoma 2*) y desata la producción de IFN-γ, actividad citotóxica y proliferación en células NK [86-88]. La IL-15, al igual que la IL-2, actúa como factor de supervivencia a través de la inducción de Bcl-2 y también promueve la proliferación [89-92]. La IL-12 promueve la producción de citoquinas y la actividad citotóxica [88, 93, 94], y también modula positivamente la expresión del receptor NKp46 [95]. La IL-18 regula el potencial migratorio de las células NK, facilitando su migración a ganglios linfáticos y favoreciendo la cooperación entre estas últimas y las CDs [96]. Sin embargo, es importante destacar que estas citoquinas, individualmente, no suelen ser un estímulo suficiente para promover activación, proliferación, sobrevida y puesta en marcha de las funciones efectoras de las células NK. Se ha observado que los mejores estímulos para lograr una adecuada activación suelen ser una combinación de estas citoquinas entre sí, o la combinación de las mismas con otros estímulos (ligandos de TLR o estímulos para receptores activadores) [97].

El tipo de estímulo o citoquina que actúe sobre las células NK también puede definir un determinado perfil funcional: células NK en reposo cultivadas en presencia de IL-12 se diferencian a un perfil de células NK productoras de IL-10 e IFN-γ (células NK1), mientras que células NK en reposo cultivadas en presencia de IL-4 se diferencian a un perfil de células NK productoras de IL-5 e IL-13 (células NK2), aunque ambos perfiles no difieren en su capacidad citotóxica [98, 99].

Existe también una regulación negativa por citoquinas sobre las células NK (**Figura 1**). El TGF-β (*Transforming Growth Factor β*), una citoquina inmunosupresora, posee un efecto antagónico a las citoquinas IL-2 e IL-12, reduciendo la producción de IFN-γ por células NK estimuladas [100, 101]. A pesar de que la IL-10, otra citoquina con actividad inmunosupresora, no posee efectos directos sobre las células NK, puede ejercer efectos inhibitorios sobre las mismas de manera indirecta reduciendo la secreción de IL-12, IL-15 e IL-18 por CDs y macrófagos [102].

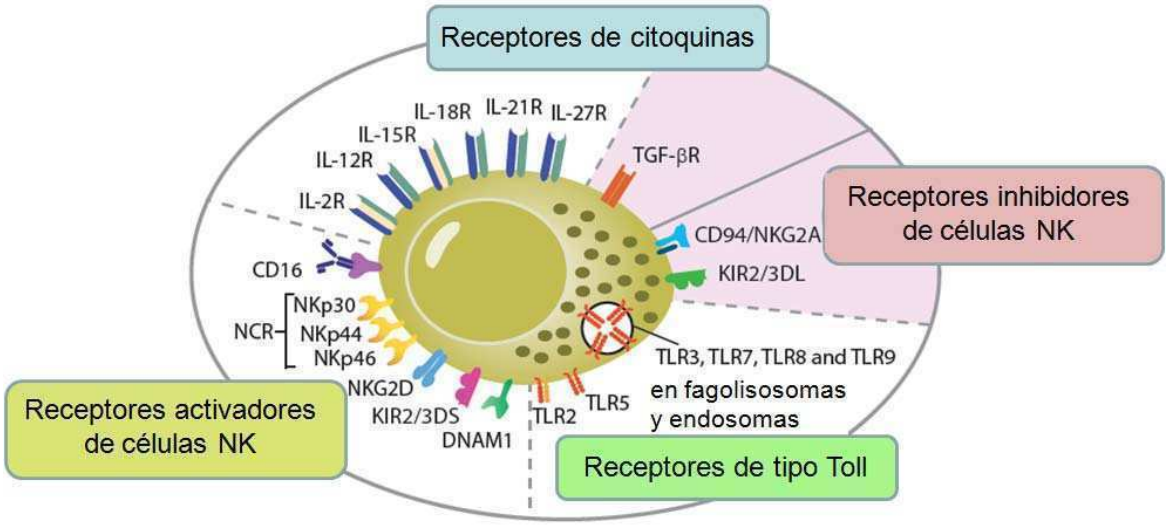

Figura 1. ***Receptores de células NK.*** Las células NK expresan receptores activadores (fondo blanco) y receptores inhibitorios (fondo rosa). Los receptores activadores se pueden subdividir en tres categorías: receptores activadores que reconocen moléculas asociadas a membrana de células blanco, receptores para citoquinas y receptores TLR (muchos de estos se encuentran en fagolisosomas o endosomas). Por otro lado, los receptores inhibitorios que regulan negativamente las funciones de las células NK, se pueden subdividir en receptores que reconocen moléculas de CMH de clase I y el receptor para TGF-β (tomado de[85]).

4. Células NK de ratón

Las células NK de ratón constituyen del 1-3⁄ de las células de bazo y el 6-10⁄ de células de sangre periférica, aunque también se las puede encontrar en hígado y pulmón, y en menor medida en médula ósea, ganglios linfáticos y timo. Se caracterizan por ser negativas para la expresión del marcador CD3.

Al igual que las células NK humanas, las células NK de ratón se originan a partir de un precursor de médula ósea $CD34^+$ [103] que da origen a una célula NK inmadura, la cual se caracteriza por la expresión en superficie de los marcadores CD122 (subunidad β del receptor de IL-2), CD16 (RFcγIII), receptores de la familia Ly49 y CD161 o NK1.1 (con excepción de la cepa BALB/c). Células NK en este estadío no muestran actividad citotóxica frente a la línea celular YAC-1 ni tampoco son capaces de producir IFN-γ [104].

Las células NK de ratón, al igual que en el humano, expresan receptores activadores e inhibitorios, que pueden reconocer ligandos solubles (citoquinas) o bien moléculas asociadas a membrana celular. Entre los receptores inhibitorios se encuentran algunos miembros de la familia Ly49, que son lectinas de tipo C con motivos ITIM en su cola intracitoplasmática [105, 106]. Los receptores Ly49 son un caso de evolución convergente con los receptores KIR de células NK

humanas, ya que a pesar de que difieren en su estructura, cumplen la misma función: ambos grupos de receptores reconocen moléculas de clase I del CMH [106]. Los receptores Ly49 y los receptores KIR participan del proceso de educación de células NK conocido como "licenciamiento" [107, 108], a lo largo del cual se establece tolerancia frente a células del organismo como también el ajuste del umbral de activación de células NK maduras. La célula NK luego de la etapa de licenciamiento, se convierte en una célula NK madura que expresa en superficie los marcadores CD49b, CD122, CD161, NKG2D, NKp46 y también altos niveles de CD11b y CD43. Estas células NK, a diferencia de células NK de fenotipo inmaduro, son capaces de lisar a la línea YAC-1 y de producir citoquinas (IFN-γ y TNF-α) luego de una estimulación con células blanco o con una combinación de IL-12 e IL-18 [109].

En ratón, las células NK también son relevantes en la inmunovigilancia contra tumores y, al igual que en el humano, los receptores activadores NKG2D y NKp46 juegan un papel importante. Se ha demostrado que en un modelo de carcinoma de próstata, los tumores se desarrollan más rápidamente en animales *knock out* (*K.O.*) para el receptor NKG2D que en animales tipo salvaje (control), y que los tumores formados expresan altos niveles de NKG2DLs debido a la ausencia de presión de selección por parte de células $NKG2D^+$ [110]. Asimismo, Smyth y colaboradores demostraron que la neutralización *in vivo* de células $NKG2D^+$ mediante un AcMo incrementa la sensibilidad de animales de las cepas C57BL/6 y BALB/c al desarrollo de fibrosarcomas inducidos por el tratamiento con el carcinógeno químico metil-colantreno (MCA) [111].

También se ha demostrado que el tratamiento de animales *K.O.* para el receptor NKp46 con MCA promueve la formación de tumores que, no obstante, aparecen en una proporción similar a tumores desarrollados en animales tipo salvaje tratados con MCA. Sin embargo, al no contar con la presión de selección de células que expresen este receptor, los tumores expresan el ligando de NKp46 [112]. Asimismo, se ha demostrado que animales deficientes para NKp46 que fueron inoculados con el linfoma PD1.6 desarrollan tumores de mayor tamaño que animales de tipo salvaje que también fueron inoculados con la misma línea PD1.6 [113].

Estos hallazgos demuestran la relevancia de las células NK en el rechazo tumoral en ratones y destacan la importancia en este proceso de los receptores activadores NKG2D y NKp46.

5. Ligandos de NKG2D (NKG2DL)

NKG2D reconoce en ratón a las proteínas Rae1 [114], H60 [114] y MULT1 (*Mouse UL16-binding protein-Like Transcript 1*) [115]. Aunque MULT1 se expresa en diversos tejidos normales, Rae1 y H60 se expresan principalmente en tumores de diversos fenotipos. En humanos, NKG2D reconoce a las moléculas denominadas *UL16 binding proteins* (ULBP)-1, ULBP-2 y ULBP-3 [116, 117].

Este grupo de moléculas de superficie (ancladas a glucofosfatidilinositol, GPI) se expresan en algunos tejidos normales, pero se ha observado que se expresan en mayores niveles en tumores de diversos fenotipos [116, 117]. Del mismo modo, se ha detectado la expresión de las proteínas integrales de membrana ULBP-4 o RAET1E (*Retinoic Acid Early Trancript 1E*) y RAET1G en diferentes líneas tumorales [118, 119]. En humanos, así como en varias especies de mamíferos pero no en ratón, existe otro grupo de NKG2DL que son las proteínas integrales de membrana denominadas MICA (*MHC class I chain-related gene A*) y MICB (*MHC class I chain-related gene B*), [74]). En la **Figura 2** se muestra una representación esquemática de los NKG2DL.

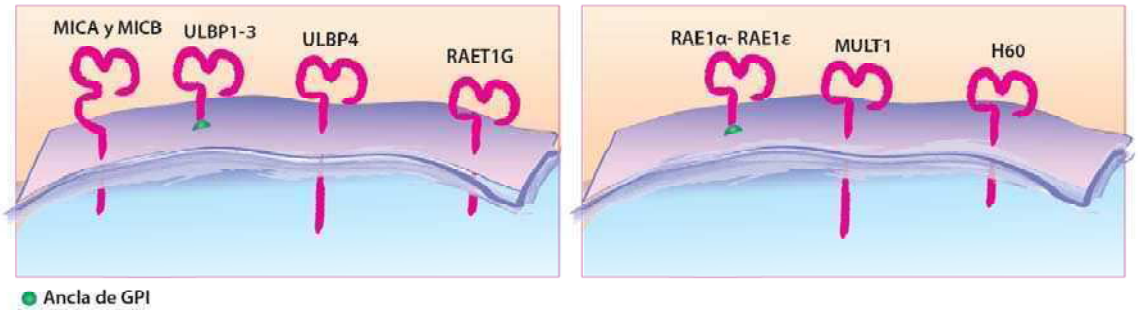

Figura 2. ***Representación esquemática de los ligandos de NKG2D.*** Tanto en humanos (izquierda) como en ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios transmembrana (adaptado de [120]).

6. Tumores

Diversas líneas de evidencia indican que la tumorigénesis es un proceso que involucra múltiples pasos. Cada uno de estos pasos se produce como consecuencia de un cambio genético que conduce a la transformación progresiva de una célula normal en una célula neoplásica. Durante este proceso darwiniano las células normales adquieren una seria de cambios genéticos que les confieren algún tipo de ventajas que facilitan el crecimiento celular, lo cual finalmente conduce al desarrollo de los tumores y eventualmente el establecimiento de metástasis [121].

Se ha sugerido que existen 6 alteraciones esenciales en la fisiología de las células que colectivamente permiten la transformación tumoral. Estas alteraciones provocan:

- Autosuficiencia en la producción de factores de crecimiento
- Pérdida de respuesta a señales inhibitorias del crecimiento celular
- Evasión de o resistencia a la apoptosis
- Adquisición de potencial replicativo ilimitado

- Promoción de angiogénesis sostenida
- Invasión de tejidos (capacidad metastásica)

Los defectos genéticos que llevan al desarrollo de estos fenotipos involucran la pérdida de función de genes supresores de tumores y/o la activación o adquisición de función de genes que promueven el crecimiento tumoral u oncogenes.

Más recientemente, se ha publicado una revisión de las alteraciones que permiten la transformación tumoral [122]. A las 6 alteraciones previamente descriptas se suman fenómenos tales como:

- Inestabilidad genética, lo cual permite la generación de mutaciones al azar y rearreglos cromosómicos
- Procesos inflamatorios en lesiones premalignas o malignas, provocado por células del sistema inmune que en muchas ocasiones favorecen la progresión tumoral.
- Reprogramación del metabolismo celular
- Evasión de la respuesta inmune contra el tumor.

7. Sistema inmune y cáncer

Aunque los tumores derivan de células propias, generalmente la neotransformación se asocia también a la expresión de neoantígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del organismo. A través del reconocimiento de estos antígenos tumorales el sistema inmune es capaz de atacar a las células transformadas, destruyéndolas antes de que el tumor se transforme en una masa celular de un tamaño tal que genere sintomatología en el paciente. Este rol del sistema inmune fue originalmente propuesto por Paul Erlich a comienzos del siglo XX. Luego la hipótesis fue expandida por Sir Macfarlane Burnet y Lewis Thomas en la década del ´50 y el fenómeno recibió el nombre de "vigilancia inmunológica del cáncer".

Sin embargo, a pesar del rol del sistema inmune como efector de una respuesta inmune anti-tumoral, los tumores crecen en huéspedes inmunocompetentes debido a una gran variedad de mecanismos de escape y contra-ataque tumoral que les permite evadir la respuesta inmune montada por el organismo. Por este motivo, una vez que un tumor está establecido y es clínicamente detectable, la regresión espontánea es un evento infrecuente [123].

Existen evidencias que indican que el sistema inmune selecciona, durante la formación del tumor, variantes que están mejor adaptadas para sobrevivir en un ambiente inmunológicamente intacto de una manera muy parecida a lo que hace con virus, bacterias y parásitos. Por ejemplo, los tumores que se forman en huéspedes inmunocompetentes son menos inmunogénicos que los

tumores que se desarrollan en ausencia de un sistema inmune intacto [124, 125]. De esta manera en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune se seleccionan células más resistentes a los mecanismos efectores citotóxicos y predominan variantes tumorales con inmunogenicidad reducida o que adquirieron otros mecanismos que les permiten evadir o suprimir el ataque inmune, con más probabilidades de sobrevivir en el hospedador inmunocompetente [125].

En base a los hallazgos descriptos, Robert Schreiber postuló la hipótesis de inmunoedición del cáncer, un refinamiento de la vigilancia inmunológica que tiene una visión más amplia de las interacciones entre el sistema inmune y el tumor [124]. De acuerdo con esta hipótesis, el proceso de inmunoedición del cáncer puede dividirse en tres fases denominadas **eliminación, equilibrio y escape**.

La fase de **eliminación** abarca el concepto original de la vigilancia inmunológica. En la primera fase del proceso de eliminación, una vez que los tumores sólidos alcanzan cierto tamaño, éstos comienzan a crecer invasivamente y requieren una mayor provisión de sangre, que llega como consecuencia de la producción de proteínas del estroma tisular y factores angiogénicos por parte del tumor. El crecimiento invasivo causa alteraciones menores en el tejido circundante e induce señales inflamatorias que llevan al reclutamiento de células de la inmunidad innata (células NK, células NKT, linfocitos T$\gamma\delta$, macrófagos y CDs). Ciertas moléculas en las células transformadas (tanto expresadas como resultado del proceso de neotransformación en sí mismo o inducidas por la limitada respuesta inflamatoria) son reconocidas por las células linfoides infiltrantes, algunas de las cuales (en particular las células NK) son estimuladas para producir IFN-γ y desplegar actividad citotóxica. Este fenómeno puede provocar la muerte tumoral por arresto del ciclo celular y por mecanismos apoptóticos [126, 127]. Asimismo, las células tumorales y la reacción inflamatoria desencadenada inducen la producción local de quimoquinas tales como CXCL10 (proteína inducible por interferón-10, IP-10), CXCL9 (monoquina inducida por IFN-γ, MIG) y CXC L 11α (quemoatractante de células T inducible por IFN, I-TAC). Estas quimoquinas contribuyen al reclutamiento de células linfoides con actividad citotóxica anti-tumoral. Algunas ejercen además efectos anti-angiogénicos, contribuyendo a los mecanismos de eliminación del tumor [128-130]. Los restos de células tumorales apoptóticas generadas por mecanismos citotóxicos ejercidos por células NK o por macrófagos M1 [131] o bien generados como consecuencia directa del IFN-γ sobre el tumor, pueden ser fagocitados por CDs locales, que luego migrarán a ganglios linfáticos drenantes y darán inicio a una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. Existen evidencias que sugieren que la expresión en superficie del complejo de proteínas calreticulina (CRT)/ERp57 antes de que la célula manifieste señales de apoptosis, ejercería un impacto sobre el sistema inmune estimulando una fuerte respuesta inmune anti-tumoral [132]. Asimismo, la liberación de la proteína HMGB1 (H*igh Mobility Group Box 1 Protein*) durante

etapas tardías de la apoptosis tumoral promueve la activación de CDs [133]. Se presume que en este contexto, las CDs podrían endocitar cuerpos apoptóticos, procesando y presentando antígenos en el contexto de moléculas de clase I del CMH (proceso conocido como presentación cruzada) a linfocitos T citotóxicos (LTCs), activándolos. En este sentido, las evidencias sugieren que el conjunto de señales generadas durante la apoptosis podrían desencadenar una respuesta inmune eficiente contra células tumorales [132-134]. Por otra parte, las quimoquinas producidas durante la progresión del proceso inflamatorio reclutan más células NK y macrófagos. En la fase siguiente, los macrófagos y las células NK que infiltran el tumor se activan mutuamente por producción recíproca de IL-12 e IFN-γ, y destruyen más células tumorales por mecanismos que involucran perforina, TRAIL (*Tumor Related Apoptosis Inducing Ligand*), e intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno [124]. Las CDs que migraron a los ganglios linfáticos drenantes inducen, mediante presentación cruzada de antígenos tumorales, la activación y diferenciación de las células T (LT) $CD4^+$ específicas de tumor hacia un perfil Th1 productor de IFN-γ, que a su vez facilita la activación y diferenciación de células T (LT) $CD8^+$ citotóxicas específicas del tumor. Estos LT $CD4^+$ y $CD8^+$ migran al foco tumoral, donde los LTCs destruyen a las células tumorales que expresan los antígenos tumorales específicamente reconocidos [125]. Cuando el proceso de eliminación es exitoso para destruir el tumor en desarrollo, se completa el proceso de edición, sin progresión a las fases siguientes. Sin embargo, y debido a la existencia de numerosos mecanismos de escape tumoral [39, 123, 135], la eliminación es ineficiente en muchos casos.

En la fase de **equilibrio**, el sistema inmune y cualquier variante de las células tumorales que haya sobrevivido al proceso de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En esta fase, las células T y el IFN-γ ejercen una potente presión de selección sobre las células tumorales, la que es suficiente para contener pero no para eliminar totalmente a un nicho tumoral que posee células inestables genéticamente y con alta tasa de mutación. Durante este período de selección darwiniana, muchas de las variantes originales de las células tumorales son destruidas y sobreviven selectivamente aquellas variantes que llevan mutaciones que les proporcionan una ventaja adaptativa, es decir, un aumento en la resistencia al ataque inmune. Se ha postulado que esta fase de equilibrio es la más larga de los tres procesos, pudiendo extenderse a lo largo de un período de muchos años [124, 136].

En la tercera fase, denominada **escape**, las variantes tumorales que sobrevivieron, comienzan a expandirse de forma descontrolada. Esto resulta en una enfermedad maligna observable clínicamente que, si se deja avanzar, resulta en la muerte del portador del tumor. En los últimos años se han estudiado y descripto numerosas estrategias inmunosupresoras utilizadas por las células tumorales, las que han sido reseñadas en un artículo de Rabinovich y colaboradores [39]. Estos mecanismos incluyen defectos en la señalización luego de la estimulación del TCR, defectos en la maquinaria de presentación de antígenos, activación de señales coestimulatorias negativas en el

microambiente tumoral tales como CTLA-4 y B7 o PD-1 y PD-L1, secreción de factores inmunosupresores tales como IL-10, TGF-β, galectina-1, gangliósidos y prostaglandina E2, la activación de vías proapoptóticas en las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral a través de las moléculas FasL (*Fas ligand*), TRAIL y RCAS1, e inhibición de la diferenciación y maduración de las CDs a través de factores reguladores negativos como galectina-1 e IL-10 y a través de vías de señalización intracelular como la de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) y SOCS1 (*Suppressor Of Cytokine Signaling 1*). Además, distintas poblaciones de células regulatorias reclutadas o inducidas por los tumores contribuyen a esta red inmunosupresora, las que incluyen a las células T regulatorias naturales $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (nTregs), células T regulatorias inducibles productoras de IL-10 (Tr1), células NKT productoras de IL-13 y distintas subpoblaciones de CDs mieloides y plasmacitoides [39].

Las poblaciones celulares linfocitarias efectoras de una respuesta citotóxica anti-tumoral son los LTCs (con TCR αβ o TCR γδ) y las células NK, las que forman parte de linfocitos que infiltran tumores o TILs (T*umor Infiltrating Lymphocytes*).Se ha demostrado que los TILs de pacientes con melanomas expresan NKG2D y que este receptor es importante para el reconocimiento del tumor por parte de los TILs [137], reforzando la idea de que NKG2D es importante en la inmunidad anti-tumoral. Pese a la expresión de NKG2D en TILs y de NKG2DL en diversos tumores humanos, éstos progresan en su desarrollo lo que se debe a la existencia de mecanismos de escape que afectan a las células NK y más específicamente a NKG2D. Dentro de los diferentes mecanismos de escape tumoral que involucran al sistema NKG2DL-NKG2D se demostró que el ectodominio de la proteína MICA puede ser secretado *in vitro* al medio de cultivo y detectado *in vivo* en suero de pacientes con cáncer, lo que afecta la funcionalidad de células citotóxicas por inducción de una expresión reducida del receptor NKG2D [138, 139]. El clivaje involucra la acción de metaloproteasas (MMPs) [139] y recientemente se ha demostrado que MICA se asocia en la superficie celular con la proteína ERp5 y que esta interacción es requerida para el clivaje de MICA y la secreción del ectodominio soluble [140]. Este clivaje no solo genera variantes tumorales con baja expresión de MICA sino que induce una modulación negativa e internalización de NKG2D en células NK y LT $CD8^+$ y, consecuentemente una disminución de su expresión en superficie. De esta manera las células citotóxicas se ven impedidas de reconocer a las células tumorales. Otro mecanismo de escape que involucra al sistema NKG2DL-NKG2D es mediado por TGF-β. Esta citoquina inmunosupresora [141] tiene un doble efecto sobre el sistema NKG2DL-NKG2D. Por un lado regula negativamente la expresión de MICA y otros NKG2DL en la superficie de células tumorales [142] y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en LT $CD8^+$ y células NK, lo que dificulta el reconocimiento y destrucción de distintos tipos de tumores [143-146] sin afectar la expresión de perforina y FasL [147]. El TGF-β además de ser secretado por los tumores, es expresado en la superficie de las células Treg, que en el

microambiente tumoral inducen una disminución de NKG2D en las células NK [143]. Por otra parte, en nuestro laboratorio, demostramos la existencia de otro mecanismo de escape que involucra al sistema MICA-NKG2D y que consiste en la retención intracelular de formas inmaduras de MICA en el retículo endoplásmico de células de melanoma, lo que confiere resistencia *in vitro* e *in vivo* a la actividad tumoricida de las células NK [148]. Algunos de los diferentes mecanismos de escape tumoral mencionados anteriormente se esquematizan en la **Figura 3**.

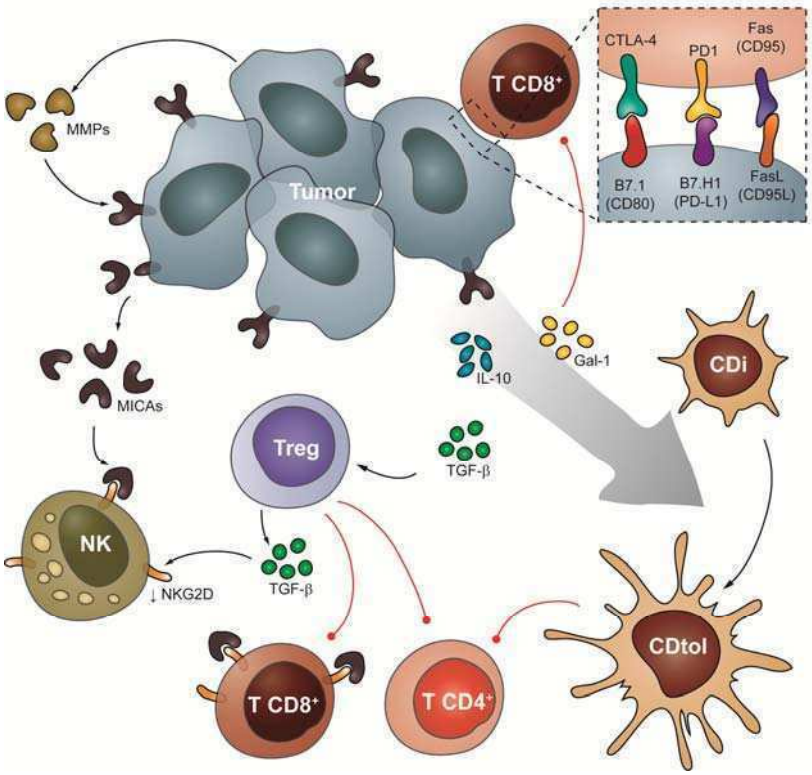

Figura 3. ***Mecanismos de escape tumoral.*** Se muestran los mecanismos de escape tumoral más relevantes que involucran secreción de moléculas solubles por parte del tumor y células del sistema inmune. MICA es clivada de la superficie de ciertos tumores por metaloproteasas (MMPs) y junto con el TFG-β (secretado por el tumor y/o por Treg) induce una disminución en la expresión de NKG2D en LT $CD8^+$ y en células NK. Los tumores que expresan bajos niveles de NKG2DL son entonces deficientemente reconocidos por las células citotóxicas que además muestran baja expresión de NKG2D. Por otro lado, la interacción establecida entre células tumorales y $LTCD8^+$ va a estar mediada por moléculas coestimulatorias negativas (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1), al mismo tiempo que se induce la activación de vías pro-apoptóticas en las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral por la interacción de las moléculas Fas-FasL. El tumor también secreta factores inmunosupresores (IL-10, TGF-β y galectina-1) los cuales van a inhibir la diferenciación y maduración de las CDs, generando CDs tolerogénicas (CDtol) capaces de regular negativamente la funcionalidad de LT $CD4^+$ y LT $CD8^+$. Distintas poblaciones de células regulatorias reclutadas o inducidas por los tumores contribuyen a esta red inmunosupresora actuando directamente sobre LT $CD4^+$ y $CD8^+$. Además, galectina-1 secretada por el tumor induce apoptosis en células Th1 [149]. En su conjunto, todos estos mecanismos van a contribuir al silenciamiento de la respuesta inmune.

Como se mencionara más arriba, uno de los mecanismos efectores más efectivos de la respuesta inmune anti-tumoral es la activación de células citotóxicas (LT $CD8^+$ y células NK). Ambas inducen la muerte de las células blanco por apoptosis mediada por dos tipos de mecanismos. En el primero, denominado mecanismo secretorio, las células citotóxicas establecen la sinapsis inmunológica con la célula tumoral lo que moviliza sus gránulos secretorios hacia el sitio de contacto con las células blanco. Estos gránulos contienen diferentes componentes que participan en el mecanismo citotóxico. Los de mayor relevancia son la granzima B, una serinoproteasa capaz de activar caspasas, y la perforina, una proteína desestabilizante de membranas [150]. En los gránulos secretorios la granzima B forma un complejo con la perforina y una tercera proteína de alto peso molecular denominada serglicina que actúa como proteína transportadora o *carrier*. Este complejo se libera en la sinapsis inmunológica donde es endocitado por la célula tumoral, principalmente a través del receptor de manosa 3-fosfato (MPR, [151]). La internalización conduce a la formación de una vacuola de pH ácido que induce la activación de las perforinas que ejercen efectos desestabilizantes sobre la membrana de la vacuola endocítica permitiendo que la granzima B acceda al citosol de la célula blanco activando al sistema de caspasas que inducen la muerte por apoptosis [152]. En el segundo proceso, denominado mecanismo no secretorio participan miembros de la familia del TNF-α tales como FasL y en forma secundaria en las células NK, TRAIL [153]. Una vez activadas, las células citotóxicas comienzan a expresar FasL en su superficie, lo que les permite unirse a diversas células que expresan su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y FasL induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo la activación de una cascada de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco.

Hasta hace unos pocos años se creía que la principal respuesta biológica desencadenada por células NK contra células infectadas con virus o células neoplásicas era su actividad citotóxica. Sin embargo, en la actualidad sabemos que la función más importante de las células NK es la secreción de citoquinas, en particular el IFN-γ [12, 154]. De hecho, las células NK constituyen la primera fuente de IFN-γ detectado luego de la infección con diferentes patógenos, proceso que se observa unas pocas horas o durante los primeros días de producida la infección. Este IFN-γ resulta crítico para perfilar la respuesta inmune innata y adaptativa, por lo que las células NK son realmente reguladores de la respuesta inmune contra una gran variedad de patógenos [13]. Por otro lado y como se mencionara antes, se sabe que las células NK son capaces de establecer un diálogo recíproco con CDs lo que también le permite regular la respuesta inmune adaptativa tanto en forma cualitativa como cuantitativa [13, 27]. Esto las hace doblemente atractivas para estudios tendientes al desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, ya que por un lado son capaces de

destruir células transformadas y por otro tienen la habilidad de perfilar la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral hacia un perfil Th1 y citotóxico mediado por LT $CD8^+$.

8. Remodelación de la cromatina

8.1. Remodelación de la cromatina

La remodelación de la cromatina o epigénesis es uno de los mecanismos de regulación de la expresión génica. Entre los factores que regulan el remodelado de la cromatina (factores epigenéticos) se destacan las metilaciones del ADN y las acetilaciones de histonas. La metilación del ADN ocurre en el contexto de dinucleótidos CpG y dicha modificación es catalizada por metil-transferasas (*DNA-methyltranferases* o DNMT). Un 40-60⁄ de los genes humanos contienen regiones ricas en dinucleótidos CpG (más generalmente conocidos como "islas CpG") en los promotores. Las islas CpG son mucho menos frecuentes en otras regiones del genoma [155, 156]. En células normales, las islas CpG habitualmente se encuentran no metiladas permitiendo así la expresión de los genes que las contienen. Sin embargo, se han observado excepciones tales como la hipermetilación del ADN en uno de los dos alelos parentales, lo que resulta en la expresión génica monoalélica (proceso también conocido como "impronta génica")[157], y la hipermetilación de genes en el cromosoma X inactivo en las hembras [158, 159]. También se cree que la metilación del ADN participa en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica [160, 161].

Por otro lado y como se mencionó en el párrafo anterior, otro de los factores importantes que regulan el remodelado de la cromatina son las acetilaciones de histonas. Los ciclos de acetilación-deacetilación son catalizados por acetil-transferasas (*histone acetyltransferases* o HAT) y **deacetilasas de histonas (*histone deacetylases* o HDAC)**, respectivamente. La acetilación de histonas (en residuos de lisina) mediada por HAT permite a la cromatina adquirir una conformación más laxa o abierta, lo cual facilita el acceso a factores de transcripción y la consiguiente transcripción. La remoción de grupos acetilo de las histonas mediada por HDAC induce una conformación de la cromatina más compacta o cerrada, lo cual inhabilita el acceso de factores de transcripción y trae como consecuencia la inhibición de la transcripción [162-164].

La familia de HDAC de mamíferos está compuesta de 18 miembros clasificados en cuatro clases según la homología de secuencia respecto de sus ortólogos en levaduras. Las HDAC de clases I (HDAC1, HDAC2, HDAC3 y HDAC8), II (HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 y HDAC10) y IV (HDAC11) se conocen como "HDAC clásicas" e incluyen 11 miembros, mientras que las HDAC de clase III (SIRT1-7) son las conocidas como "Sirtuinas" e incluyen 7 miembros (**Tabla 1**)[165]. Las HDAC

clásicas dependen del ion Zn^{+} como cofactor, mientras que las Sirtuinas requieren NAD^{+} para su función [166, 167].

Clase	*Tipo*	*Cofactor*
I	HDAC1	Zn^{2+}
	HDAC2	
	HDAC3	
	HDAC8	
IIa	HDAC4	
	HDAC5	
	HDAC7	
	HDAC9	
IIb	HDAC6	
	HDAC10	
III (Sirtuinas)	SIRT1	NAD^{+}
	SIRT2	
	SIRT3	
	SIRT4	
	SIRT5	
	SIRT6	
	SIRT7	
IV	HDAC11	Zn^{+}

Tabla1. ***Clasificación de las HDAC de mamíferos.***

Por lo general, una alta actividad de HDAC clásicas se asocia a una cromatina condensada, muy poco accesible para factores de transcripción y por ende, transcripcionalmente inactiva. Por otro lado, desde hace unos años se ha acumulado evidencia experimental que indica que las HDAC poseen otros sustratos además de las histonas, tales como proteínas citoplasmáticas y numerosos factores de transcripción [168]. En base a estos descubrimientos, se ha propuesto re-denominar a las HDAC como "deacetilasas de lisinas", un término más preciso para indicar que sus sustratos no se restringen únicamente a las histonas [169].

Existen diversos ejemplos de cómo las HDAC pueden regular las funciones de otras proteínas no-histonas. Uno de los sustratos destacados es el factor supresor de tumores p53 [170, 171]. Su deacetilación resulta en una pérdida de actividad transcripcional debida a la pérdida de capacidad de unión al ADN [172]. Contrariamente a lo que ocurre con p53, la deacetilación mediada por HDAC3 de la subunidad p65 del factor de transcripción NF-κB (*Nuclear Factor κB*) permite su unión al ADN y consecuente función transcripcional, mientras que la acetilación del mismo facilita su remoción del ADN, la unión a IκBα y su exportación fuera del núcleo, lo que inhibe sus funciones transcripcionales [173]. Alguno de los miembros de la familia de factores de transcripción STAT se acetilan frente a determinados estímulos [174-176]. Se ha sugerido que STAT3 actúa como un factor de transcripción

oncogénico y se ha descripto que se encuentra activado en diversos tipos de tumores, como cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer de próstata y enfermedades neoplásicas hematológicas [177]. De hecho, se ha demostrado que la expresión constitutiva de STAT3 contribuye a la transformación celular *in vitro* y a la formación de tumores *in vivo* [178]. En contraste, diversas citoquinas activan la vía de señalización de STAT1, induciendo apoptosis e inhibición del crecimiento [179] y se considera a este factor de transcripción como un regulador negativo de la transformación y la proliferación [180, 181]. Por otra parte, se ha observado en muchos tumores una activación constitutiva de STAT3 y una represión de STAT1 [182]. Como se mencionara antes, la funcionalidad de STAT1 y STAT3 se regula mediante acetilación, pero de manera antagónica. En el caso particular de STAT3, las citoquinas no solo inducen su fosforilación sino también su acetilación, lo que permite su activación y se ha observado que la sobreexpresión de HDAC de clase I inhibe la activación de STAT3. Paradójicamente, HDAC1, HDAC2 y HDAC3 son necesarias para la activación de STAT1 y la expresión de genes dependientes de este factor. Además, la sobre expresión de HDACs incrementa la expresión de genes dependientes de STAT1 [176, 183].

Las HDAC también son capaces de regular la actividad de proteínas citoplasmáticas que no son factores de transcripción. La deacetilación de α-tubulina mediada por HDAC6 regula la motilidad celular ya que la sobreexpresión de HDAC6 promueve la migración frente a estímulos quimiotácticos [184]. Por otro lado, se ha descripto a Hsp90 (H*eat Shock Protein 90*) como otro de los blancos de HDAC6. En una célula normal, la inhibición de HDAC6 lleva a la hiperacetilación de Hsp90, su disociación de la co-chaperona p23 y la consecuente pérdida de actividad chaperona[185].

8.2. Remodelación de la cromatina en cáncer

Recientemente se ha establecido que el remodelado de la cromatina juega un rol importante en el desarrollo y progresión tumoral. Se ha demostrado que las células tumorales poseen alteraciones en la estructura de su cromatina, lo que lleva a alteraciones en la expresión génica [186].

Las DNMT juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión tumoral. Se ha establecido que las células tumorales poseen un 20-60⁄ menos de sitios CpG metilados que una célula normal [187]. Este estado general de hipometilación podría contribuir a la tumorigénesis mediante la activación de oncogenes que en condiciones normales de metilación estarían silenciados. Por otro lado, se encontraron elevados niveles de metilación (hipermetilación) en genes supresores de tumores, lo cual bloquea su transcripción normal. El gen de la proteína asociada retinoblastoma (Rb) fue el primer gen de supresión tumoral sobre el cual se observó este fenómeno [188]. Otros ejemplos son los genes supresores de tumores MLH1 (*MutL homolog 1*) en cáncer de colon [189, 190], CDKN2a (*Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2a*) o $p16^{INK4a}$ en cáncer de pulmón [191,

192], BRCA1 (*Breast Cancer 1*) en cáncer de mama [193] y MGMT (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) en glioblastomas [194], los que también se encuentran hipermetilados y como consecuencia no se transcriben normalmente.

Existen numerosos reportes que también demuestran que las HDAC son relevantes en el desarrollo del cáncer [165] y esto se ha documentado para prácticamente todas las HDAC clásicas (clases I, II y IV) en diversos tipos de tumores (**Figura 4**). Dentro de las alteraciones funcionales encontradas en HDAC de clase I, varios estudios demuestran que HDAC1 cumple una función importante en el control de la proliferación celular y que la inhibición parcial de la expresión de HDAC1 y HDAC3 resulta en la inhibición de la proliferación celular en la línea celular HeLa [195], mientras que la sobre expresión de HDAC1 en células de tumor de próstata lleva a un aumento en la proliferación celular [196]. En cuanto a las HDAC de clase IIa, se ha demostrado que el silenciamiento de HDAC7 en células endoteliales altera su morfología, migración y capacidad de formar estructuras tubulares *in vitro*, sin afectar la adhesión celular, proliferación o apoptosis, sugiriendo que esta HDAC podría representar un blanco para terapias anti-angiogénicas en cáncer [197]. En las HDAC de clase IIb, se observó que la sobre expresión de HDAC6 incrementa la proliferación celular de fibroblastos embriónicos [198]. HDAC6 también juega un rol en la localización nuclear de β-catenina inducida por EGF (*Epidermal Growth Factor*) y la subsecuente activación de c-myc en células de carcinoma de colon [199]. Recientemente se demostró que HDAC6 está involucrada en la transición epitelio-mesenquimal, influenciando la cascada TGF-β/SMAD3 [200].

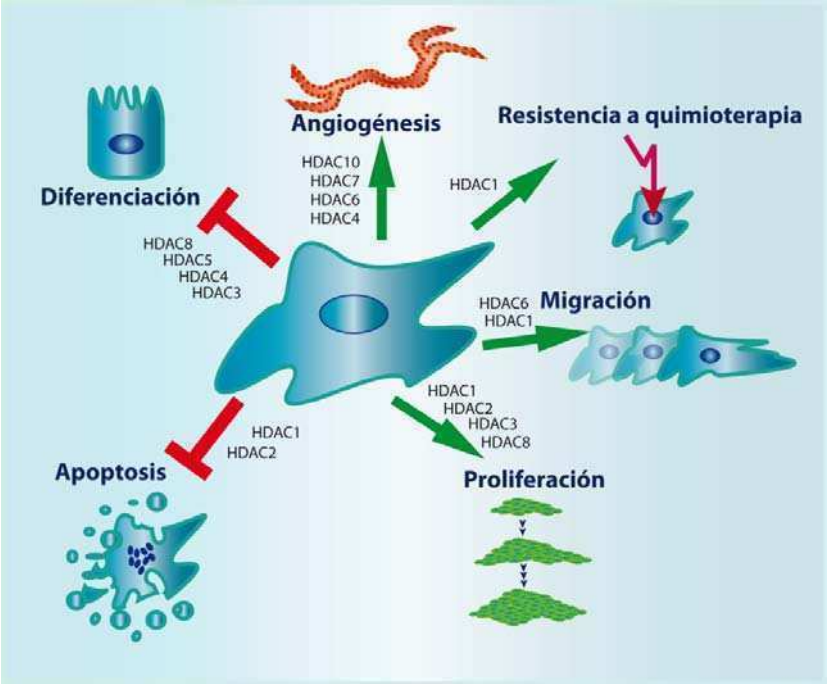

Figura 4. Rol de las HDAC en el cáncer. En cáncer, las distintas HDAC favorecen la proliferación celular, la migración, la resistencia a la apoptosis, la inhibición de la diferenciación celular, la resistencia a la quimioterapia y más recientemente se ha demostrado que también intervienen en la angiogénesis (adaptado de [165]).

En estudios realizados con muestras provenientes de pacientes con cáncer, se encontró que la expresión de las HDAC se encuentra alterada. Para HDAC de clase I, un primer estudio realizado con muestras de pacientes con cáncer gástrico demostró una mayor expresión de HDAC1 en el 60⁄ de los casos respecto de muestras de tejido normal [201], mientras que se ha demostrado que en cáncer de páncreas, una alta expresión de HDAC1 junto con HIF1α (*Hipoxia Inducible Factor 1* α) está asociada a un mal pronóstico [202]. En carcinoma colorectal, se encontró una expresión aumentada de HDAC1, HDAC2 y HDAC3, la cual estuvo asociada a una sobrevida significativamente menor de los pacientes [203]. En contraste, en un estudio realizado con 200 muestras de cáncer de mama se encontró una correlación entre la expresión de HDAC1 y HDAC3 con la expresión de los receptores de estrógeno y progesterona y en este caso la expresión de HDAC1 se asoció a un mejor pronóstico [204]. En otro estudio realizado con 162 muestras de pacientes con cáncer de mama, se encontró una correlación entre una alta expresión de HDAC1 y una mayor sobrevida, nódulos linfáticos libres de metástasis y un menor volumen tumoral [205] . En cuanto a las HDAC de clase IIa, se observó una alta expresión de HDAC7 en cáncer colorectal en contraste con lo encontrado en cáncer de vejiga, de riñón y de mama [206]. Para las HDAC de clase IIb, se encontró que en carcinoma escamoso oral la

expresión de HDAC6 está significativamente aumentada en comparación a tejido escamoso oral normal y en un estudio realizado con 90 muestras de estos tumores, la expresión de HDAC6 fue mayor en cáncer en etapas más avanzadas que en cáncer en etapas más tempranas [207]. Además, en una serie de 135 muestras de cáncer de mama la expresión de HDAC6 correlacionó con una mejor sobrevida y fue mayor en tumores más pequeños y en tumores que expresaban los receptores para estrógeno y para progesterona [208]. Los resultados al momento acumulados indicarían que, con la excepción del carcinoma mamario, una expresión aumentada de las HDAC está asociada a una mayor agresividad del tumor, una menor sobrevida y un peor pronóstico.

9. Inhibidores de HDAC (iHDAC)

9.1. Una nueva generación de drogas con potencial aplicación en la clínica

En la actualidad, la radioterapia, la quimioterapia y la cirugía son las estrategias terapéuticas más efectivas para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas en seres humanos, aunque no están exentas de efectos secundarios indeseables y de recidivas. Esto ha movilizado el desarrollo de nuevas y mejores drogas anti-tumorales, muchas de las cuales han mostrado resultados promisorios. Debido a que las evidencias experimentales acumuladas demuestran una clara participación de las HDAC en el cáncer, se ha movilizado el desarrollo de **inhibidores de HDAC (iHDAC)** con el objeto de aplicarlos en terapias anti-tumorales complementarias a las terapias clásicas [209].

Algunos iHDAC son productos naturales y otros son obtenidos por biosíntesis. Todos inhiben a las HDAC con distinta eficiencia y se clasifican en 6 clases en base a su estructura química: *1)* los ácidos grasos de cadena corta, tales como el Valproato de sodio (VPA); *2)* los hidroxamatos, tales como la Tricostatina A (TSA); *3)* las benzamidas, tales como el MS-275; *4)* los tetrapéptidos cíclicos, tales como el depsipéptido; *5)* las cetonas electrofílicas, tales como la trifluorometil cetona; y *6)* otros sin una clasificación química común, tales como la depudecina (**Tabla 2**) [209].

Clase	*Compuesto*	*Rango de concentración al que actúan*
Ácidos grasos de cadena corta	Butirato de sodio (NaB)	mM
	Valproato de sodio (VPA)	mM
	AN-9	µM
Hidroxamatos	Tricostatin A (TSA)	nM
	SAHA (Vorinostat)	µM
	PXD101	µM
	Oxamflatina	µM
	LAQ824	nM
	LBH589	nM
	CBHA	µM
	Scriptaid	µM
	Piroxiamida	µM
	SBHA	µM
	ABHA	µM
	SK-7041	nM
	SK-7068	nM
	CG-1521	µM
	Tubacina	µM
Benzamidas	MS-275	µM
	CI-994	µM
Tetrapéptidos cíclicos	Depsipéptido	nM
	Trapoxina A	nM
	Apicidina	nM
	CHAPs	nM
Cetonas electrofílicas	Trifluorometil cetona	µM
Otros (misceláneos)	Depudecina	µM
	MGCD-0103	

Tabla 2. ***Clasificación de iHDAC según su estructura química***

Más recientemente ha surgido una nomenclatura que agrupa a los iHDAC en 3 clases según su espectro de acción. Según este criterio, los iHDAC se clasifican en: *1)* inhibidores de amplio espectro o *"pan- inhibitors"*, que inhiben a los miembros de las 4 clases de HDAC, tales como la TSA o el Vorinostat (SAHA) *2)* inhibidores de clase I, que inhiben las HDAC de clase I y II tales como el VPA o el NaB, y *3)* inhibidores de clase II, que inhiben específicamente a algunas HDAC de clase I y a HDAC6 (clase IIB), tales como la Tubacina o la mercaptoacetamida [165]. En la **Tabla 3** se citan algunos ejemplos.

Familia	HDAC	HDACi
Clase I	HDAC1	MS-275, VPA, NaB, Trapoxina, TSA, SAHA, LBH589, LAQ824,
	HDAC2	
	HDAC3	
	HDAC8	
Clase IIa	HDAC4	
	HDAC5	
	HDAC7	
	HDAC9	
Clase IIb	HDAC6	Tubacina, Mercapto acetamida
	HDAC10	
Clase IV	HDAC11	

Tabla 3. ***Clasificación de los iHDAC según su espectro de acción***

La gran mayoría de los iHDAC interfieren con el dominio catalítico de las HDAC. Como se explicó anteriormente, la evidencia experimental demuestra que distintos tipos de tumores poseen una expresión alterada de distintas HDAC, motivo por el cual el desafío actual es lograr diseñar y sintetizar iHDAC cada vez más específicos, capaces de actuar sobre un único tipo de HDAC, lo cual no es sencillo ya que los aproximadamente 400 residuos que conforman el domino catalítico de las HDAC de clases I, II y IV están muy conservados [210]. La mayor parte de los iHDAC descriptos hasta el momento sólo afectan a las HDAC de clase I y II, cuyo co-factor es el ion Zn^{2+}. Por lo tanto, también es importante diseñar iHDAC que no afecten las funciones de muchas otras proteínas dependientes de Zn^{2+} que cumplen otras funciones metabólicas [211].

9.2. iHDAC como drogas anti-tumorales

Las evidencias acumuladas a la fecha indican que los iHDAC poseen actividad anti-tumoral. Dicha actividad anti-tumoral radica mayormente en su capacidad selectiva de inducir apoptosis en células tumorales, aunque se han demostrado otros efectos a través de los cuales también ejercerían actividad anti-tumoral [209].

La actividad anti-tumoral de los iHDAC se manifiesta de manera muy marcada ya en dosis muy bajas que son mínimamente tóxicas para el huésped [212-214]. Existen estudios *in vitro* que demuestran que células transformadas serían hasta 10 veces más sensibles que las células normales a los efectos de los iHDAC [213]. Sin embargo, aún no se conocen en su totalidad las vías involucradas en la inducción de muerte celular mediada por estas drogas. Es poco probable que este fenómeno se produzca a través de una única vía común a todos los iHDAC. De hecho, la evidencia acumulada parecería indicar que el efecto de los iHDAC depende del tipo celular sobre el que actúan y se piensa que diferentes iHDAC podrían tener distintos efectos sobre el mismo tipo celular.

Respecto de las distintas vías involucradas en la inducción de apoptosis por parte de los iHDAC, muchos estudios han demostrado que la expresión de varios miembros de la superfamilia de receptores TNF y sus ligandos se activa por el tratamiento con iHDAC [215].Otra serie de estudios demuestra que existe una correlación entre la inducción de apoptosis por iHDAC y la inducción de la expresión de uno o más receptores y/o ligandos de dicha superfamilia [216, 217]. En el trabajo de Insinga y colaboradores se utilizaron animales transgénicos para PML-RAR (*Promyelocytic Leukaemia-Retinoic Acid Receptor* α) los que desarrollan espontáneamente leucemia mielocítica aguda (LMA) y se observó un aumento en la expresión de TRAIL y Fas en células de LMA luego de tratar a los animales con VPA. La vía mitocondrial de muerte celular también estaría involucrada en el efecto pro-apoptótico de los iHDAC. Existen datos de distintos grupos que demuestran que la sobre expresión de Bcl-2 o Bcl-xl (*B-cell lymphoma-extra large*), moléculas que bloquean la vía apoptótica mitocondrial o intrínseca, inhibe la apoptosis mediada por distintos iHDAC independientemente del tipo celular [218-220]. Esta vía de inducción de apoptosis se debe a que los iHDAC probablemente alteran el equilibrio en la expresión de genes pro/anti-apoptóticos en favor de una respuesta pro-apoptótica. En otra serie de trabajos se ha observado un aumento en la formación de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) en cultivos celulares luego del tratamiento con estas drogas [218, 221, 222], lo que precede a cambios en el potencial de la membrana mitocondrial [221].

Los efectos pro-apoptóticos de los iHDAC también se deben a su capacidad de inhibir la deacetilación de proteínas no-histonas cuya actividad se encuentra regulada por acetilación. Los iHDAC promueven la hiperacetilación de p53, induciendo su activación y el consecuente aumento en la expresión de genes blanco de esta proteína (tales como el gen pro-apoptótico Noxa), desencadenando así una respuesta pro-apoptótica [223, 224]. En distintos tipos de cáncer, la sobre expresión de Hsp90 (*Heat shock protein 90*) correlaciona con una resistencia a la quimioterapia y un mal pronóstico [225]. En células tumorales, Hsp90 puede formar un complejo multiproteico que incluye a Hsp70, el cual estabiliza y previene la degradación por proteasoma de proteínas oncogénicas y anti-apoptóticas. HDAC6 deacetila a Hsp90 y promueve su activación [185]. Los iHDAC inhiben a HDAC6 y favorecen la hiperacetilación y consecuente inhibición de las funciones de Hsp90,

llevando a la degradación de proteínas que favorecen el desarrollo tumoral tales como Her2/neu, BCR-ABL (*Breakpoint Cluster Region-Abelson*), ERBB1 (*Epidermal Growth Factor Receptor 1*), ERBB2 (*Epidermal Growth Factor Receptor 2)* y c-Raf [226-228].

Originalmente, los iHDAC fueron descubiertos gracias a su capacidad de inducir el arresto del ciclo celular, función que se suma a la lista de sus actividades anti-tumorales. Todos los iHDAC estudiados hasta la fecha, con la sola excepción de la tubacina, poseen la capacidad de inducir arresto en el ciclo celular en la fase G1/S [229-231], aunque también se ha observado que poseen la capacidad de inducir arresto en la fase G2/M, pero este es un fenómeno mucho menos frecuente [232, 233].

Más recientemente, se han descripto propiedades anti-angiogénicas de los iHDAC que radican en su capacidad de modular negativamente la expresión de genes pro-angiogénicos. La mayoría de los iHDAC modulan negativamente la expresión de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), HIF1α, angiopoyetina, TIE-2 (*Angiopoietin Receptor 2*) y eNOS (*endothelial Nitric Oxide Synthase*), todos genes involucrados en diferentes mecanismos de angiogénesis, lo cual está íntimamente vinculado a su capacidad de inhibir la neo-angiogénesis *in vitro* e *in vivo* [234-239]. Además de afectar el abastecimiento de nutrientes a la célula tumoral mediante la inhibición de la angiogénesis, se cree que los iHDAC también podrían inhibir la capacidad metastásica mediante la supresión de la expresión MMPs [240, 241].

A las propiedades anti-tumorales de los iHDAC, también se suman propiedades inmunomodulatorias. Los iHDAC incrementan la expresión de moléculas de clase II del CMH, de las moléculas co-estimulatorias CD40, CD80 y CD86 y de la molécula de adhesión ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) [242]. También aumentan la inmunogenicidad de los tumores induciendo la expresión de CMH de clase I y de las moléculas MICA, MICB y las proteínas ULBP, todos NKG2DLs. Esto "sensibilizaría" a las células tumorales a la detección y destrucción por células del sistema inmune [243-247].

9.3. Combinación de iHDAC con otras terapias anti-tumorales

A pesar de que los iHDAC son muy prometedores como drogas anti-tumorales, su combinación con otras terapias existentes podría resultar aún más efectiva que un tratamiento monodroga. De hecho, se ha demostrado que los iHDAC sinergizan con otros compuestos estructural y funcionalmente distintos [212, 248, 249].

Una alternativa interesante que ha surgido en los últimos años es la combinación de iHDAC con inhibidores de DNMT. Esto permitiría la desmetilación de genes supresores de tumores, que en células tumorales están habitualmente hipermetilados (su expresión está reprimida), junto con la

hiperacetilación de histonas, lo cual conduciría a la expresión de dichos genes con el consiguiente bloqueo del desarrollo del tumor [250].

Otra alternativa es la combinación de iHDAC con agentes quimioterapéuticos convencionales. La combinación de LAQ284 o SAHA con gemcitabina, o con agentes que previenen la formación de microtúbulos como docetaxel y epothilone B mostraron un incremento en la destrucción de líneas celulares de carcinoma de mama [226, 251]. Asimismo, la combinación del iHDAC LAQ284 con dexametasona, droga habitualmente utilizada para el tratamiento en las recidivas de mieloma, resultó en un efecto sinérgico [252].

La aplicación conjunta de iHDAC y reguladores de la actividad de proteínas involucradas en el plegamiento proteico también parece una alternativa promisoria. Asimismo, la combinación de iHDAC con 17-AAG, un inhibidor de Hsp90 que lleva a la degradación de muchas de sus proteínas clientes, resultó en un efecto sinérgico anti-tumoral [253, 254]. En otros trabajos, se observó un efecto sinérgico entre iHDAC y el inhibidor de proteasoma Bortezomib [255, 256]. A pesar de que no se logró identificar un mecanismo específico para explicar el efecto sinérgico observado entre los iHDAC y el Bortezomib, se observó un marcado aumento en la producción de ROS en células tratadas con esta combinación (K562, LAMA84 y células de mieloma múltiple), lo cual podría explicar en parte los mayores niveles de apoptosis observados [256, 257].

Por último, todos los iHDAC ensayados hasta el momento sinergizan con la radioterapia γ [258-261]. Es importante destacar que estos estudios se han extendido a modelos animales, en los que se demostró que el MS-275 y el VPA aumentan la sensibilidad de xenoinjertos de carcinoma de próstata y de cerebro a la radiación y que la combinación resultó en una eficacia terapéutica mayor que la de los tratamientos individuales [260, 262].

9.4. Los iHDAC en la clínica

Desde hace unos años, varios iHDAC están siendo analizados como drogas anti-tumorales en ensayos clínicos [215, 263-266] (**Tabla 4**).

Nombre del compuesto	*Estatus clínico*
Fenilbutirato de sodio	Fases I y II
Butirato de sodio	Fases I y II
Ácido valproico	Fases I y II
Tricostatin A	No se encuentra en ensayo
Vorinostat (SAHA)	Aprobado (fases I, II y III)
MS-275	Fase I
PXD101	Fase I
Belinostat	Fases I y II
Panobinostat	Fases I, II y III
LAQ284	Fase I

Tabla 4. ***iHDAC en estudios clínicos***

Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos generalmente confirman los resultados obtenidos en estudios preclínicos en relación a la baja toxicidad y la buena tolerancia frente a los iHDAC. Los efectos tóxicos observados, los cuales pueden variar de acuerdo al iHDAC utilizado, podrían deberse a efectos secundarios no específicos más que a las consecuencias directas de la inhibición de las HDAC. De hecho, muchos de estos compuestos son eficaces sólo a altas concentraciones, a las que la interferencia con blancos adicionales no HDAC dependientes del ion Zn^{2+} podría ser probablemente la causa de su toxicidad. Sin embargo, en algunos casos la máxima dosis tolerada nunca se alcanzó en los ensayos clínicos, indicando que iHDAC más selectivos tienen una toxicidad mínima y una amplia ventana terapéutica.

Se ha obtenido un resultado especialmente promisorio en casos de linfoma T cutáneo. En muchos casos se observó una respuesta duradera [267, 268]. De hecho, la FDA (*Food and Drug Administration*) de Estados Unidos aprobó el uso del SAHA o Vorinostat en el año 2006 y del FK228 o Romidepsina en el año 2009 para su empleo en el tratamiento de pacientes con linfoma T cutáneo y actualmente se comercializan con los nombres de Zolinza (Merck) e Istodax (Celgene), respectivamente [269, 270]. También se ha observado regresión tumoral (en ocasiones, de forma muy marcada) en casos de tumores sólidos [214, 271].

Actualmente existen ensayos clínicos en curso tendientes a investigar la terapia combinada de iHDAC con ácido trans-retinoico en pacientes con leucemia, sobre todo en individuos de edad avanzada [272]. La combinación de iHDAC con inhibidores de DNMT ha arrojado muy buenos resultados *in vitro* [250], tal como se explicó en la sección **9.3**, por lo que esta estrategia está siendo probada en ensayos clínicos.

Por último, el iHDAC VPA hace ya más de 10 años que se emplea en el tratamiento de pacientes epilépticos [273-279].

Objetivo

Objetivo

Los antecedentes descriptos indican que la expresión y funcionalidad de las HDAC se encuentran alteradas en células tumorales y que las mismas juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión tumoral. En virtud de estos hallazgos, se han desarrollado iHDAC para su utilización como drogas anti-tumorales y se han obtenido resultados promisorios en algunos ensayos clínicos.

Como se explicó en la sección **9.2**, entre las propiedades anti-tumorales de los iHDAC, también se encuentra su propiedad inmunomodulatoria, específicamente su capacidad de inducir la expresión de NKG2DLs en superficie de células tumorales [243-247], sensibilizando a las mismas a la detección y eventual destrucción por parte de células del sistema inmune que expresan NKG2D. Sin embargo, en los experimentos realizados se emplearon modelos experimentales que se alejan de la situación que se presenta en un paciente ya que los efectos de los iHDAC sobre la expresión de NKG2DLs y la actividad de las células NK se realizaron tratando *in vitro* diversas líneas tumorales con los iHDAC para luego enfrentar a estas células tumorales con células NK que no habían sido expuestas a las drogas. Aunque existen estudios *in vitro* que demuestran que células transformadas serían hasta 10 veces más sensibles que las células normales a los efectos de los iHDAC [280], los experimentos realizados se limitaron a la utilización de fibroblastos humanos y la evaluación de los efectos pro-apoptóticos. Sin embargo, es posible que existan efectos desconocidos sobre células del sistema inmune responsables de la inmunovigilancia contra tumores. Si bien el uso de iHDAC podría ser una terapia efectiva para la erradicación de tumores, el tratamiento implica que tanto las células tumorales como el sistema inmune del paciente tratado se hallarán expuestos a la droga. Considerando el papel fundamental del sistema inmune y en particular el de las células NK en el control del crecimiento tumoral, resulta indispensable realizar estudios acerca de los efectos de este tipo de compuestos sobre distintas células del sistema inmune.

En este contexto, el objetivo central de esta tesis **fue investigar el efecto de diversos iHDAC sobre la funcionalidad de las células NK y los mecanismos involucrados**.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Líneas celulares

Se utilizaron las siguientes líneas celulares humanas adherentes: HCT116 (adenocarcinoma de colon, ATCC CCL-247), M8 (melanoma), T47D (carcinoma de ducto de glándula mamaria, ATCC HTB-133), K562 (leucemia mielocítica crónica, ATCC CCL-243), **P815** (mastocitoma de ratón, ATCC TIB-64). La línea M8 fue gentilmente provista por el Dr. E. Carosella, Hôpital Saint Louis, París, Francia.

Los carcinomas fueron cultivados en medio DMEM (Hyclone) suplementado con 10⁄ de suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, 50 U/ml de penicilina sódica y 50 mg/ml de estreptomicina (todos de Invitrogen) (DMEM completo).

Las líneas celulares K562 y P815 fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Hyclone), también suplementado con 10⁄ de SFB, piruvato, glutamina, penicilina sódica y estreptomicina (RPMI completo).

2. Anticuerpos

Se utilizaron los siguientes AcMo contra moléculas humanas: anticuerpo anti-MICA/B (clon D7, [281]), anti-ULBPs (clones 170818, 165903 and 166510, respectivamente, R&D), anti-NKG2D (clon 1D11, e-Bioscience), anti-NKp30 (clon AZ20), anti-NKp44 (clon Z231) y anti-NKp46 (clon BAB281) (gentilmente provistos por el Dr. Alessandro Moretta, Laboratorio de Inmunología Molecular, Depto. de Medicina Experimental, Universidad de Génova, Italia), anti-NF-κB p50 (clon E-10, Santa Cruz Biotech), control de isotipo (CI, eBioscience) conjugado a FITC, PE, SPRD, anti-CD3 conjugado a FITC, PE y SPRD (clon UCHT-1, Southern Biotech), anti-CD3 conjugado a PE/Cy7 (clon UCHT-1, eBioscience), anti-CD56 conjugado a PE/Cy5 (clon N901, Beckman Coulter), anti-CD107a conjugado a FITC (clon 1D4B, BD), anti-IFN-γ (clon 4S.B3, eBioscience), anti-CD226 conjugado a Alexa Fluor 488 (DNAM-1, clon DX11, Biolegend), anti-CD244 (2B4, clon C1.7, Biolegend), anti-CD25 conjugado a PE (clon BC96, eBioscience), anti-CD69 conjugado a FITC (clon FN50, BD), anti-pSTAT4 conjugado a PE (clone py693, BD).

Se utilizaron los siguientes AcMo contra moléculas de ratón: anti-NKG2D conjugado a APC (clon CX5, eBioscience), anti-NK1.1 conjugado a PE (clon PK136, eBioscience), anti-CD49b conjugado a PE (clon DX5, eBioscience), anti-NKp46 conjugado a Alexa fluor 647 (clon 29A1.4, eBioscience), anti-CD3 conjugado a FITC (clon 17A2, Biolegend).

Para inmunomarcaciones indirectas y citometría de flujo (CF) se utilizó IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a PE (DAKO, Dakocytomation). Para microscopía confocal, se utilizó IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugado a FITC (BD Pharmingen).

3. Reactivos

Se utilizaron las citoquinas recombinantes de humano y de ratón IL-2, IL-12, IL-15 (Peprotech) e IL-18 (MBL International.

Se utilizaron las siguientes drogas: Tricostatina A (TSA, Sigma, utilizada en experimentos *in vitro*), TSA (Enzo Life Sciences, utilizada en experimentos *in vivo*), valproato de sodio (VPA, Enzo Life Sciences), butirato de sodio (NaB, Enzo Life Sciences). La TSA y el NaB fueron disueltos en DMSO, mientras que el VPA fue disuelto en agua. La TSA se utilizó a 0,1, 1 y 3 μM, el VPA y el NaB se utilizaron a 2 y 10 mM.

4. Experimentos *in vivo*

Se utilizaron animales de la cepa C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata.

Se trabajó con dos grupos de animales: el primero fue inoculado por vía intraperitoneal de una dosis de 2 mg/Kg de TSA (disuelta en DMSO) diariamente durante 4 días. El segundo grupo (control), fue inoculado con un volumen equivalente del vehículo de la droga (DMSO), también durante 4 días.

Al día 5, se sacrificaron los animales, se obtuvieron sus esplenocitos y se aislaron células NK por selección positiva (mediante marcación con anti-CD49b), utilizando el kit de separación inmunomagnético de Miltenyi. La pureza de las células NK obtenidas se evaluó mediante marcación con AcMo y citometría de flujo (detección de células $CD3^{-}NK1.1^{+}$) y fue siempre superior al 75⁄ . Las células NK obtenidas, fueron lavadas con solución fisiológica y resuspendidas en RPMI completo.

Los estudios realizados con animales de laboratorio contaron con la aprobación de comités de ética pertinentes (UBA, IBYME-CONICET).

5. Aislamiento de células T $CD4^+$ y células NK humanas

Se aislaron células NK y células T $CD4^+$ a partir de muestras de sangre de donantes sanos (provistos por el Servicio de Hemoterapia del Hospital Carlos G. Durand, Buenos Aires, Argentina) mediante el kit de purificación Rossette Sep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) y un gradiente de Ficoll-Paque™ (Amersham Biosciences). La pureza de las células se evaluó mediante marcación con AcMo y citometría de flujo (detección de células $CD3^-CD56^+$ para células NK y $CD3^+CD4^+$ para linfocitos T) y la misma fue siempre superior al 90⁄ .

Las células NK se incubaron en ausencia o en presencia de los distintos iHDAC por 24 h como se indica en cada figura y en ausencia o en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 a 20 ng/ml de cada citoquina, o en presencia de 20 ng/ml de IL-15 solamente, en RPMI-completo.

En algunos experimentos las células NK fueron cultivadas en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 a 10 ng/ml cada una o en presencia de 10 ng/ml de IL-15 solamente, y en presencia de TSA durante 24 h. Luego, la células fueron lavadas con el objeto de eliminar la TSA y puestas nuevamente en cultivo en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml de cada una) o en presencia de IL-15 (10 ng/ml) solamente por un período de 24 a 72 h.

En otra serie de experimentos, las células NK fueron incubadas durante 4 días en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml de cada una) con el objeto de obtener células NK activadas. Luego, se agregó TSA y las células NK se mantuvieron en cultivo durante otras 24 h, también en presencia de citoquinas. Al término de esta segunda incubación, las células NK fueron lavadas e incubadas durante otras 24 h en presencia de 5 ng/ml de IL-2 con el objeto de analizar la funcionalidad de CD25.

Las células NK tratadas y no tratadas se utilizaron para analizar apoptosis, producción de IFN-γ, degranulación, citotoxicidad, expresión de receptores activadores, expresión de marcadores de activación y expresión de mRNA de receptores de citoquinas.

Se utilizaron citoquinas humanas recombinantes en los experimentos realizados con células NK humanas, mientras que se utilizaron citoquinas recombinantes de ratón en los experimentos que involucraron células NK de ratón.

Las células T $CD4^+$ se incubaron en ausencia o en presencia de TSA durante 24 h, según se indica en las figuras y se emplearon para analizar porcentaje de células apoptóticas.

Los estudios realizados con muestras de sangre de donantes sanos contaron con la aprobación de comités de ética pertinentes (IBYME-CONICET).

6. Muestras de pacientes

Se aislaron CMSPs y células NK a partir de muestras de sangre de pacientes epilépticos tratados con VPA con dosis mayores a 500 mg diarios (provistos por el Departamente de Epilepsia del Instituto FLENI, Buenos Aires, Argentina) mediante un gradiente de Ficoll-Paque^{TM} (Amersham Biosciences) y el kit de purificación Rossette Sep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada).

Las CMSPs se resuspendieron en RPMI completo. Las células NK se resuspendieron en RPMI completo y se incubaron en presencia de 1 ng/ml de IL-15 o en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 en concentraciones de 10, 1 y 10 ng/ml respectivamente durante 18 h, o bien se co-cultivaron con la línea celular K562 durante 4 h.

Los CMSPs se utilizaron para analizar porcentajes de células NK por citometría de flujo. Las células NK se utilizaron para analizar expresión de receptores activadores, producción de IFN-γ y degranulación por citometría de flujo.

Los estudios realizados con muestras de sangre de donantes sanos cuentan con la aprobación de comités de ética pertinentes (IBYME-CONICET).

7. Citometría de flujo (CF)

7.1. Inmunomarcación directa de superficie

Se utilizaron 200.000 células por tubo. Las células se lavaron con PBS con 1⁄ de suero fetal bovino y 0,1⁄ de NaN_3 (PSA), se incubaron 15 min a 37 ºC en PBS y 10⁄ de suero normal de cabra, de rata o de ratón (según corresponda en función de la especie en la cual había sido producido el AcMo que se utilizaba como Ac para la inmunomarcación) con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se centrifugaron a 1000 g durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 10 µl de la dilución correspondiente de cada AcMo. Se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad, y se centrifugaron y lavaron con 200 µl de PSA. Se resuspendieron en 90 µl de PSA y se fijaron mediante el agregado de 30 µl de para-formaldehído (PFA) al 4⁄ .

En el caso de las marcaciones intracitoplasmáticas para IFN-γ y pSTAT4, las células se fijaron con PFA 4⁄ ., se permeabilizaron utilizando el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD) durante 10 min en hielo y se emplearon para la marcación con el AcMo específico o el CI tal como se describe en el párrafo anterior.

Para adquirir las muestras en el citómetro, las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 min y se resuspendieron en 200 µl de PBS con 0,1⁄ de NaN_3. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y los datos obtenidos se

analizaron con los programas WinMDI 2.9 o FlowJo (TreeStar). Se calculó el porcentaje de células positivas para la expresión del marcador mediante un cuadrante cuya posición se definió en base al CI o bien se calculó el índice de fluorescencia específica (*specific fluorescente index* o SFI) como la relación entre la intensidad de fluorescencia de la media geométrica (MFI) del AcMo específico y la MFI del CI.

7.2. Inmunomarcación indirecta de superficie

En el caso de las inmunomarcaciones indirectas, se realizó el mismo protocolo que se describió en el punto **7.1**, con la salvedad de que luego de la incubación con el AcMo primario, las células se centrifugaron y lavaron con 200 μl de PSA (1000 g durante 5 min), se resuspendieron en 20 μl de una dilución 1/40 del Ac secundario conjugado a PE, se incubaron durante 30 min en hielo y en oscuridad, se centrifugaron y lavaron con 200 μl de PSA (1000 g durante 5 min), se resuspendieron en 90 μl de PSA y se fijaron mediante el agregado de 30 μl de para-formaldehído (PFA) al 4⁄ como se describió más arriba.

Previo a la adquisición de las muestras en el citómetro, las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 min y se resuspendieron en 200 μl de PSA sin suero. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria, obtenidos se analizaron con los programas WinMDI 2.9 o FlowJo y se calculó el porcentaje de células positivas para el marcador o el SFI

7.3. Inmunomarcación intracitoplasmática directa

Se utilizaron 200.000 células por tubo. Las células se lavaron con PSA, se incubaron 15 min a 37 ºC en PBS y 10⁄ de suero normal de cabra, de rata o de ratón (según corresponda en función de la especie en la cual había sido producido el AcMo que se utilizaba) con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se fijaron con 75 μl de PSA y 25 μl de PFA 4⁄ , durante 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaron y lavaron con 200 μl de PSA (1000 g durante 5 min), se permeabilizaron utilizando el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD) durante 10 min a temperatura ambiente, se lavaron nuevamente y se emplearon para realizar una marcación intracitoplasmática con anti-pSTAT4, anti-IFN-γ o sus correspondientes CI, durante 30 min a temperatura ambiente. Al término, las células se lavaron y se fijaron nuevamente con el fin de preservar la marcación intracitoplasmática.

7.4. Ensayo “single cell assay”

Se utilizó una modificación del ensayo descripto por Anfossi y colaboradores [282]. Se utilizaron $3x10^5$ células NK, las que se cultivaron durante 18 h a 37°C en ausencia o presencia de 20

ng/ml de IL-12, IL-15 e IL-18 o la línea celular K562, en ausencia o en presencia de TSA (1 μM). Durante las últimas 4 h de cultivo, se agregaron al cultivo el AcMo CI o el AcMo anti-CD107a junto con el reactivo Golgi Plug (BD). Luego, se levantaron las células, se centrifugaron y lavaron con 200 μl de PSA (1000 g durante 5 min) y se incubaron 15 min a 37 ºC en PBS y 10⁄ de suero normal de ratón. Seguidamente, las células se incubaron con anti-CD3 y anti-CD56 durante 30 min en hielo, se lavaron, se resuspendieron en 75 μl de PSA y se fijaron en 25 μl de PFA 4⁄ , durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, las células se centrifugaron y lavaron con 200 μl de PSA (1000 g durante 5 min) y se permeabilizaron utilizando el reactivo Cytofix/Cytoperm (BD) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se volvieron a lavar y se realizó una marcación intracitoplasmática con anti-IFN-γ o su correspondiente CI durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron y se fijaron nuevamente con el fin de preservar la marcación intracitoplasmática.

Previo a la adquisición de las muestras en el citómetro, las células se centrifugaron a 1000 g durante 5 min y se resuspendieron en 200 μl de PSA sin suero. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria, los datos obtenidos se analizaron con los programas WinMDI 2.9 o FlowJo y se calcularon los porcentajes de células IFN-γ^+CD107a$^-$, IFN-γ^+CD107a$^+$ o IFN-γ^-CD107a$^+$ dentro de la población CD3$^-$CD56$^+$.

7.5. Apoptosis

Con el objeto de evaluar apoptosis en células NK, se realizaron marcaciones con Anexina V (AV)-FITC. Las células se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en 100 μl de buffer de unión de Anexina V (buffer AV). Se agregó 1 μl de Anexina V (AV)-FITC a cada tubo, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 100 μl de buffer AV y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo. Se calculó el porcentaje de células AV$^+$.

Con el objeto de evaluar la apoptosis y necrosis en células NK y células T CD4$^+$, se utilizó el kit de detección de apoptosis de BD. Las células se lavaron en PBS frío y se resuspendieron en 100 μl de buffer AV. Se agregó 1 μl de AV-FITC y 3 μl de ioduro de propidio (IP) a cada tubo, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, se agregaron 100 μl de buffer AV y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo. Se calculó el porcentaje de células AV$^+$IP$^-$ (apoptosis temprana), AV$^+$IP$^+$ (apoptosis tardía) y AV$^-$IP$^+$ (necrosis) empleando los programas WinMDI 2.9 o FlowJo.

7.6. Ensayo de citotoxicidad con Anexina V

Con el objeto de evaluar el efecto de los iHDAC sobre la capacidad citotóxica de células NK, células NK que habían sido previamente incubadas en presencia de los iHDAC durante 24 h, se lavaron 2 veces con 1000 μl de PSA a 1000 g durante 5 min con el objeto de eliminar los inhibidores. Luego, se co-cultivaron con la línea celular K562 en una relación 1:1 durante 18 h, se cosecharon las células y se realizó una marcación con anti-CD56 durante 30 min en hielo. Luego, las células se lavaron a 1000 g durante 5 min, se resuspendieron en 100 μl de buffer AV y se llevó a cabo una marcación con AV-APC (eBioscience) durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se lavaron a 1000 g durante 5 min, se resuspendieron en 200 μl de buffer AV y se adquirieron las muestras en el citómetro de flujo. Los datos obtenidos se analizaron con los programas WinMDI 2.9 o FlowJo y se calcularon los porcentajes de células AV^+ en la población $CD56^-$ (K562).

7.7. Ensayo de citotoxicidad redirigida o "redirected killing assay"

A los efectos de determinar la funcionalidad de los receptores activadores de células NK tratadas con los iHDAC, se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad redirigida conla línea celular P815, que posee una alta expresión de receptores para Fcγ (porción Fc de IgG). Se llevó a cabo una sensibilización de estas células con AcMo anti-NKG2D, anti-NKp46 o el CI durante 30 min en hielo. Luego, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron en RPMI completo.

Paralelamente, células NK incubadas en ausencia o en presencia de los iHDAC surante 24 h se lavaron con PBS para remover los iHDAC, se resuspendieron en RPMI completo y se co-cultivaron con las células P815 sensibilizadas con los distintos AcMo durante 18 h. Luego, las células se lavaron, se realizó un bloqueo de 15 min a 37°C con el objeto de evitar las uniones inespecíficas y se marcaron con anti-CD56 durante 30 min en hielo y en oscuridad. Luego, las células se lavaron, se resuspendieron en 100 μl de buffer AV y se marcaron con 1 μl de AV-FITC durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se agregaron 100 μl de buffer AV y las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo. Se calcularon los porcentajes de células AV^+ en la población de células $CD56^-$ (P815).

8. ELISA para IFN-γ

Se determinó la concentración de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo de células NK incubadas en presencia de 20 ng/ml o 10 ng/ml de IL-12, IL-15 e IL-18 (según el experimento) y en ausencia o presencia de los iHDAC, mediante un ELISA de captura. Para esto se empleó un AcMo anti-IFN-γ (clon 2G1, Pierce) como Ac de captura pegado a placas NUNC. El IFN-γ capturado fue detectado usando un AcMo anti-IFN-γ biotinilado (clon B133.5, Pierce) y avidina marcada con HRP (Pierce). La curva de calibración utilizada para la cuantificación del IFN-γ en las muestras se armó realizando diluciones seriadas al medio de una solución de 2500 pg/ml preparada con IFN-γ recombinante (eBioscience). Luego, se reveló con tetra-metil bencidina (TMB) y se realizó la lectura en un lector de ELISA (Thermo) utilizando el filtro de 450 nm.

9. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Se sembraron células NK sobre portaobjetos previamente tratados con polilisina. Las células NK se estimularon durante 2 h con 20 ng/ml de IL-12, IL-15 e IL-18 en ausencia o presencia de 1 μM de TSA, se lavaron 3 veces con 50 μl PBS y se fijaron con 50 μl de PFA 4⁄ durante 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron con PBS y se incubaron con 50 μl de suero normal de cabra al 5⁄ y saponina al 0,03⁄ en PBS, durante 15 minutos a temperatura ambiente con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas. Luego, las células se marcaron con el Ac anti-p50 (subunidad de NF-κB) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron 3 veces con PBS y incubaron con el Ac secundario (IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado a FITC) durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, las células se lavaron 3 veces con PBS, se montaron con el reactivo *antifade* Fluormont-G (Southern Biotech) e IP (con el objeto de teñir núcleos) y se observaron en un microscopio confocal láser Eclipse E800 Nikon C1, con el objetivo de inmersión Nikon Plan Apo 60x/1.4. Para cuantificar la fluorescencia, se utilizó el programa Image J (NIH). Una vez adquiridas las imágenes, se separaron en canales RGB (verde, rojo y azul) y se trabajó con la imagen correspondiente al verde. Se trazó un área del tamaño del núcleo de las células NK y se realizó la cuantificación de la media de la intensidad de fluorescencia (*mean fluorescence intensity*) en áreas igual, en núcleos de más de 100 células. Luego, se calculó la fluorescencia (la cual se expresó en unidades arbitrarias,U.A.) multiplicando el área por la media de la intensidad de fluorescencia.

10. Extracción de RNA y PCR en tiempo real (*Real time PCR*)

Se extrajo RNA total de células NK o de líneas celulares tratadas con iHDAC, utilizando el reactivo Trizol (Invitrogen), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Luego, se sintetizó ADN copia (ADNc) a partir del ARN total utilizando oligo-dT y la transcriptasa reversa Superscript™ III (Invitrogen Life Technologies). Los oligonucleótidos cebadores (*primers*) para la amplificación de ligandos de NKG2D, de receptores de citoquinas y de GAPDH (gen de expresión endógena o constitutiva, *housekeeping gene*), se muestran en la **Tabla 5.** Se llevó a cabo una amplificación de cada ARNm mediante PCR en tiempo real, utilizando el equipo 7500 Real time PCR de Applied Biosystems y master mix con SYBR Green® (Applied Biosystems, Foster City, CA). Todas las muestras se corrieron por duplicado y en todos los casos se incluyeron controles negativos (sin templado). Con el objeto de confirmar la especificidad de la señal detectada por el equipo se construyeron curvas de disociación, las cuales fueron analizadas en cada corrida. Los niveles de expresión de cada templado se calcularon utilizando curvas preparadas mediante diluciones seriadas de ADNc. Los datos obtenidos se analizaron con el programa 7500 System Software (Applied Biosystems). Se normalizaron los valores contra los niveles de expresión de GAPDH y los mismos se expresaron en unidades arbitrarias (U.A.).

Gen	Oligonucleótidos cebadores	Secuencia
MICA	Sentido	AACGGAAAGGACCTCAGGAT
	Anti-sentido	AGCTCCTGGTGCTGTTGTCT
ULBP-2	Sentido	GTGCAGGAGCACCACTCGCC
	Anti-sentido	AGGACTCTCCTCAGATGCCAGGGA
IL-12Rβ1	Sentido	CGGACACCCAGCAGCCCATG
	Anti-sentido	GGGGTTTTCAGGGGGAACGCA
IL-12Rβ2	Sentido	GGCAGGCGACACGTGGAAGAAT
	Anti-sentido	ACATCGCCTCTCTTGCACGCA
IL-15Rα	Sentido	GGGAGTCCAGCGGTGTCCTG
	Anti-sentido	CGTGATGCCCCGCGTCG
IL-15Rβ	Sentido	CCTGAGGGTGCTGTGCCGTG
	Anti-sentido	GGGGCCATCAGGCGAAGGTT
IL-2Rγ (γ_c)	Sentido	GGAACGGACGATGCCCCGAA
	Anti-sentido	AGACACACCACTCCAGGCCGAA
IL-18R	Sentido	GCTGTGGAGATTTTGCCCAGGGTG
	Anti-sentido	ACAACAGCTCCTCCAGGCACTACAT
GAPDH	Sentido	TGCACCACCAACTGCTTAGC
	Anti-sentido	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

Tabla 5. Listado de oligonucleótidos cebadores utilizados en PCR en tiempo real

11. Análisis estadístico

Se utilizó un test de *t* de Student pareado con el objeto de comparar los porcentajes de células IFN-γ^+CD107a$^-$, IFN-γ^+CD107a$^+$ o IFN-γ^-CD107a$^+$, con el objeto de comparar la expresión ARNm de receptores de citoquinas en células NK humanas tratadas con una dosis única de iHDAC y con el objeto de comparar la expresión de ARNm de MICA y ULBP-2 en líneas celulares tumorales también tratadas con una dosis única de iHDAC. En ambos casos, se aplicó a los datos una transformación logarítmica (log_{10}) previo al test estadístico, con el objeto de homogeneizar las varianzas.

Se utilizó un test *t* de Student no apareado y con corrección de Welch con el objeto de comparar viabilidad, expresión de receptores y secreción de IFN-γ en células NK murinas provenientes de animales tratados con TSA *vs.* animales tratados con DMSO.

Se utilizó un análisis ANOVA de un factor con test post-hoc de Dunnett con el objeto de comparar secreción de IFN-γ y expresión de receptores en células NK, en presencia de diferentes concentraciones de iHDAC.

Se utilizó un análisis ANOVA de un factor con corrección de Bonferroni con el objeto de comparar el porcentaje de células NK humanas productoras de IFN-γ, el porcentaje de células NK apoptóticas en ausencia o presencia de diferentes iHDAC y el porcentaje de citotoxicidad sobre K562 en ensayos con células NK que habían sido tratadas con iHDAC.

Resultados

Resultados

1. Expresión de NKG2DL en líneas celulares tratadas con iHDAC

Debido a que diversos reportes demuestran que los iHDAC modulan positivamente la expresión de NKG2DL en líneas celulares tumorales [243-247], decidimos comenzar nuestro trabajo confirmando los datos bibliográficos existentes. Para esto, analizamos la expresión de los ligandos MICA/B, ULBP-1 y ULBP-2 en superficie de distintas líneas celulares tumorales que fueron tratados con TSA, un iHDAC de amplio espectro, durante 24 h (**Figura 5**). Los resultados obtenidos mostraron que la TSA aumentó la expresión de MICA/B y ULBP-2 en las líneas celulares tumorales HCT116, M8 y T47D, mientras que la expresión de ULBP-1 solo aumentó levemente en la línea celular T47D.

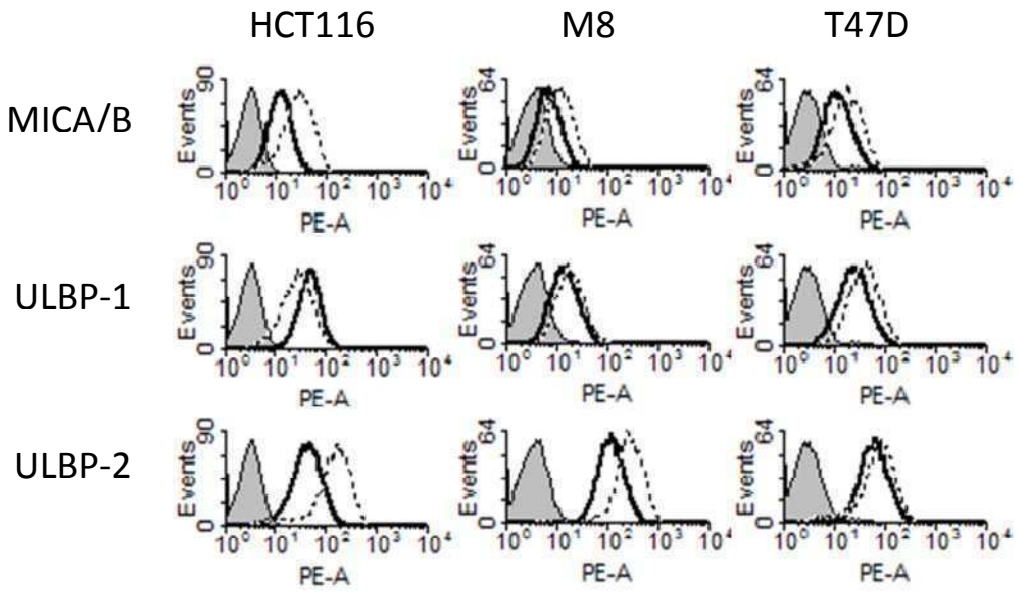

Figura 5. ***La TSA moduló positivamente la expresión de NKG2DL en superficie de líneas celulares tumorales.*** Las líneas celulares tumorales HCT116, M8 y T47D fueron cultivadas en ausencia (línea contínua negra) o en presencia de 1 μM de TSA (línea punteada) durante 24 h. La expresión en superficie de MICA/B, ULBP-1 y ULBP-2 se analizó por CF. Histograma gris: control de isotipo. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Con el objeto de confirmar los resultados obtenidos, evaluamos los niveles de expresión de ARNm de dichos ligandos mediante PCR en tiempo real. Observamos que los niveles de ARNm tanto

de MICA como de ULBP-2 aumentaron significativamente en las tres líneas celulares luego del tratamiento con TSA (**Figura 6**), sugiriendo que los iHDAC ejercen un efecto regulatorio a nivel transcripcional.

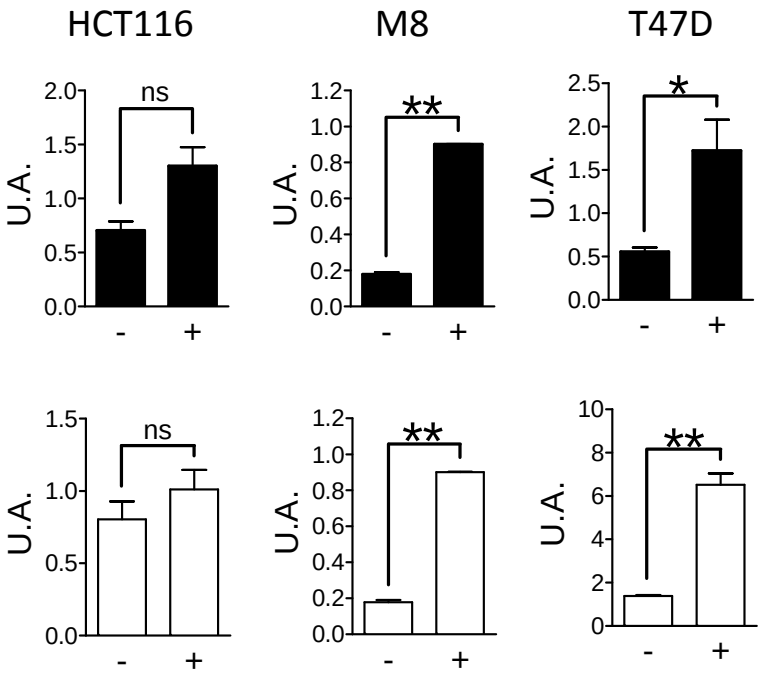

Figura 6. ***La TSA aumentó los niveles de expresión de los ARNm de MICA y ULBP-2 en líneas celulares tumorales.*** Las líneas celulares tumorales HCT116, M8 y T47D fueron cultivadas en ausencia (**-**) o en presencia de 1 μM de TSA (**+**) durante 24 h. Luego, se analizaron los niveles de expresión de los ARNm de MICA (barras negras) y ULBP-2 (barras blancas) mediante PCR en tiempo real según se explica en *Materiales y métodos*. Los resultados corresponden a la media ± SEM de 3 experimentos independientes. ns: no significativo; * p<0,05; ** p<0,01.

2. Impacto de los iHDAC sobre las funciones efectoras de las células NK

2.1. Impacto de los iHDAC en la producción de IFN-γ de células NK

Con el objeto de investigar si los iHDAC ejercen efectos deletéreos sobre la funcionalidad de células NK, analizamos el impacto *in vitro* de los iHDAC TSA, VPA, NaB sobre la producción de IFN-γ por células NK estimuladas con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 7**). Observamos una marcada inhibición de la producción de IFN-γ por células NK a cualquiera de las dosis ensayadas de los 3 iHDAC.

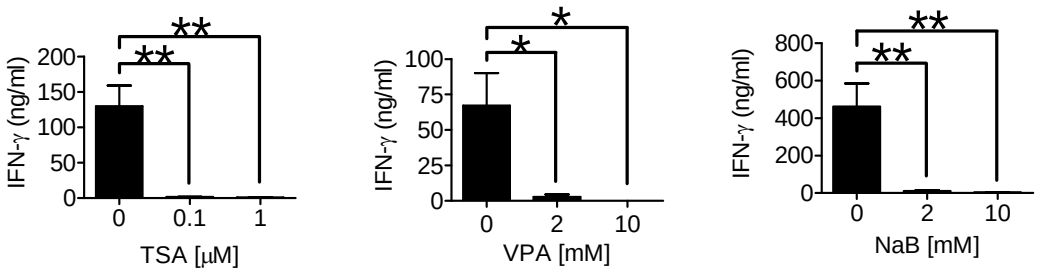

Figura 7. ***Los iHDAC TSA, VPA y NaB inhibieron la producción de IFN-γ en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18.*** Se incubaron células NK humanas con IL-12, IL-15, e IL-18 durante 24 h en ausencia (**0**) o en presencia de distintas dosis de TSA, VPA o NaB según se indica en cada gráfico. La determinación de la concentración de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivo se realizó por ELISA. Los gráficos mostrados corresponden a la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK de 4 donantes independientes. * p<0,05; ** p<0,01.

Seguidamente, se decidió evaluar si los iHDAC ejercen un efecto diferencial sobre las subpoblaciones CD56^{dim} y CD56^{bright}. Para esto, se evaluó la producción de IFN-γ por CF en células NK tratadas con una dosis única de cada droga (**Figura 8)**. Los resultados indicaron que los iHDAC inhibieron significativamente la capacidad de producción de IFN-γ tanto en células NK CD56^{dim} como en la población CD56^{bright}.

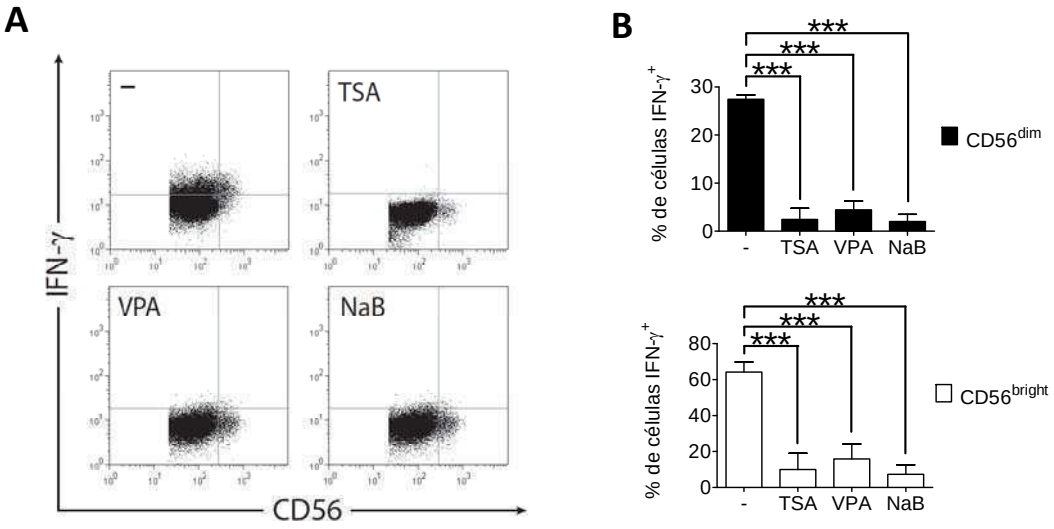

Figura 8. ***Los iHDAC ejercieron un efecto inhibitorio sobre la producción de IFN-γ en las subpoblaciones de células NK CD56^{dim} y CD56^{bright}.*** Se incubaron células NK humanas con IL-12, IL-15, e IL-18 (20 ng/ml cada una) durante 24 h en ausencia (-) o en presencia de 1μM de TSA, 2 mM de VPA o 2 mM de NaB. Luego, se realizaron inmunomarcaciones de superficie para CD56 e intracitoplasmática para IFN-γ y las células se analizaron por CF. **A)** Dot plots de un experimento representativo. **B)** Gráficos correspondientes a la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 donantes independientes. ***, p<0,001.

Con el objeto de estudiar si los iHDAC también inhiben la capacidad de producción de IFN-γ de las células NK estimuladas con células tumorales, realizamos co-cultivos de células NK previamente incubadas en presencia de iHDAC con la línea celular K562 y evaluamos la producción de IFN-γ por ELISA (**Figura 9**). Observamos que la TSA, el VPA y el NaB inhibieron significativamente la producción de IFN-γ por células NK estimuladas con la línea K562.

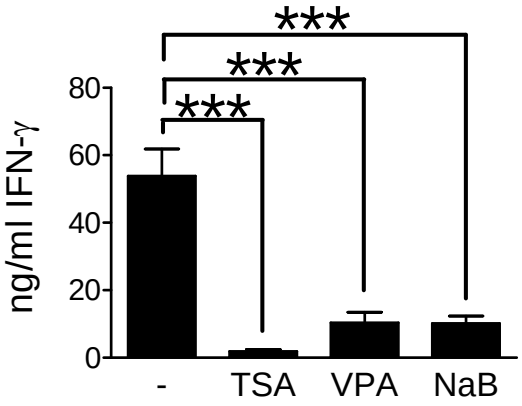

Figura 9. ***Los iHDAC inhibieron la producción de IFN-γ por células NK co-cultivadas con la línea celular K562.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 en ausencia (-) o en presencia de 1 μM de TSA, 2 mM de VPA o 2 mM de NaB durante 24 h. Seguidamente, se lavaron exhaustivamente y se co-cultivaron con la línea celular K562 en una relación 1:3 (células NK: células K562) durante 18 h más, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se determinó producción de IFN-γ por ELISA. Los gráficos mostrados corresponden a la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK de 4 donantes independientes. *** p<0,001.

2.2. Impacto de los iHDAC sobre la degranulación y capacidad citotóxica de las células NK

La capacidad de degranulación y la actividad citotóxica de las células NK son altamente relevantes en el rechazo tumoral. Por ello, nos propusimos investigar si los iHDAC (en particular, la TSA) afectan su capacidad de degranulación empleando células NK estimuladas con factores solubles (citoquinas) o células tumorales. Para ello, realizamos un ensayo que permite evaluar simultáneamente la producción de IFN-γ y la capacidad de degranulación, analizando la expresión del marcador CD107a, molécula asociada a gránulos de granzimas y perforinas que queda expuesta en superficie cuando estos se liberan [282] (**Figura 10**). Observamos que la estimulación de células NK con IL -12, IL-15 e IL-18 indujo la aparición de un 8,8 ± 2,7⁄ de células IFN-γ^+CD107a$^-$; 9,5 ± 4,8⁄ de células IFN-γ^+CD107a$^+$ y 2,5 ± 1,0⁄ de células IFN-γ^-CD107a$^+$. Sin embargo, luego del tratamiento con TSA estos porcentajes se redujeron a 0,2 ± 0,1⁄ ; 0,2 ± 0,1⁄ y 1,3 ± 1,0⁄ , respectivamente (**Figura 10A**). La TSA también inhibió la respuesta contra células tumorales ya que el co-cultivo con la línea celular K562 indujo un 3,3 ± 2,0⁄ de células IFN-γ^+CD107a$^-$; 3,7 ± 3,0⁄ de células IFN-γ^+CD107a$^+$ y

12,0 ± 5,1⁄ de células IFN-γ^-CD107a$^+$, mientras que la TSA redujo estos porcentajes a 1,6 ± 0,9⁄ ; 0,6 ± 0,4⁄ y 6,2 ± 4,3⁄ , respectivamente (**Figura 10A**). Las reducciones observadas en los porcentajes de células IFN-γ^+CD107a$^-$, IFN-γ^+CD107a$^+$ y IFN-γ^-CD107a$^+$ inducidas por TSA en células NK estimuladas con citoquinas y la reducción en el porcentaje de células IFN-γ^-CD107a$^+$ inducidas por TSA en células NK estimuladas con la línea celular K562 fueron estadísticamente significativas (**Figura 10B**).

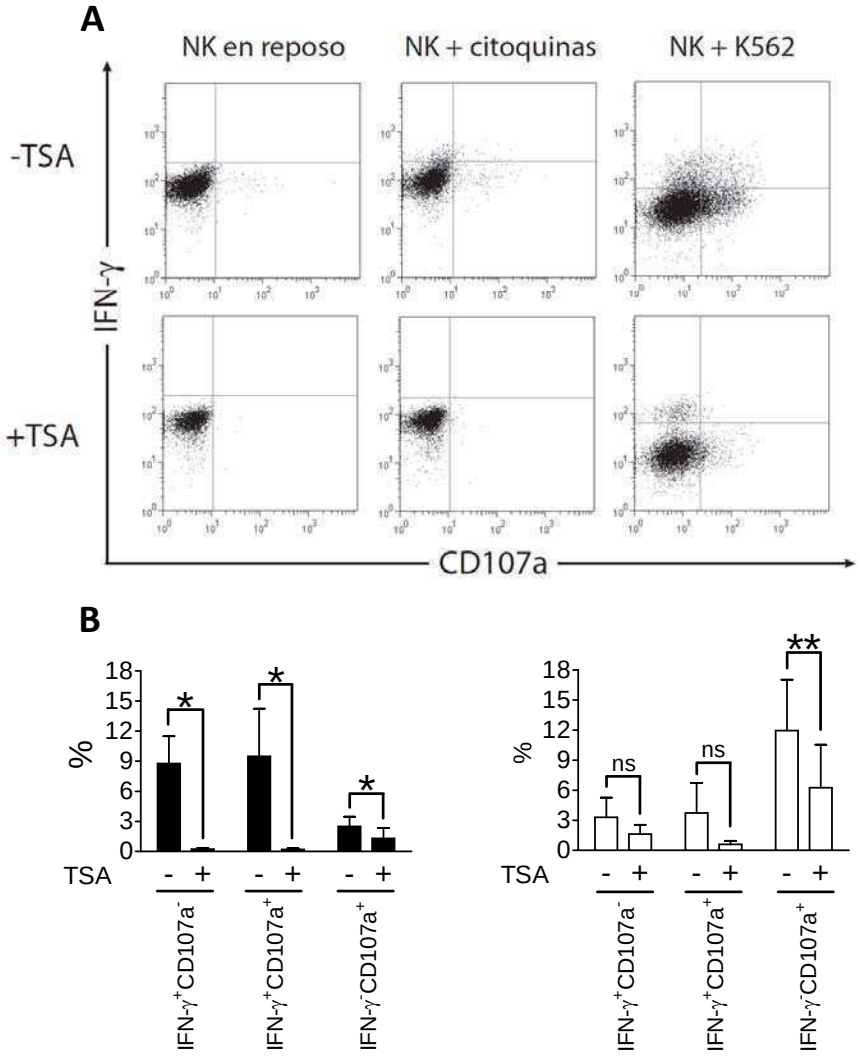

Figura 10. ***La TSA inhibió la degranulación en células NK estimuladas con citoquinas o con la línea celular K562.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15, e IL-18 (20 ng/ml cada una, "NK + citoquinas") durante 24 h en ausencia (-) o en presencia de 1μM de TSA (+), o bien se incubaron células NK con 20 ng/ml de IL-15 durante 18 h en ausencia o presencia de 1 μM de TSA y se co-cultivaron durante 18 h mas con la línea celular K562 en una relación 1:1 (células NK: células K562; "NK + K562"). A continuación, se evaluó el porcentaje de células productoras de IFN-γ y/o degranuladas por CF. **A)** Dot plots de un experimento representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 donantes independientes incubadas con citoquinas (barras negras) o con la línea K562 (barras blancas). ns: no significativo; * p<0,05.

Seguidamente, estudiamos si los iHDAC comprometen la capacidad citotóxica de células NK. Para ello, realizamos co-cultivos de células NK previamente incubadas con iHDAC con la línea celular K562 y luego evaluamos citotoxicidad por CF (**Figura 11**). Los resultados obtenidos indicaron que los tres iHDAC ensayados (TSA, VPA y NaB) inhibieron significativamente la capacidad citotóxica de células NK ya que detectamos un menor porcentaje de células K562 AV^+ luego del co-cultivo (**Figura 11B**).

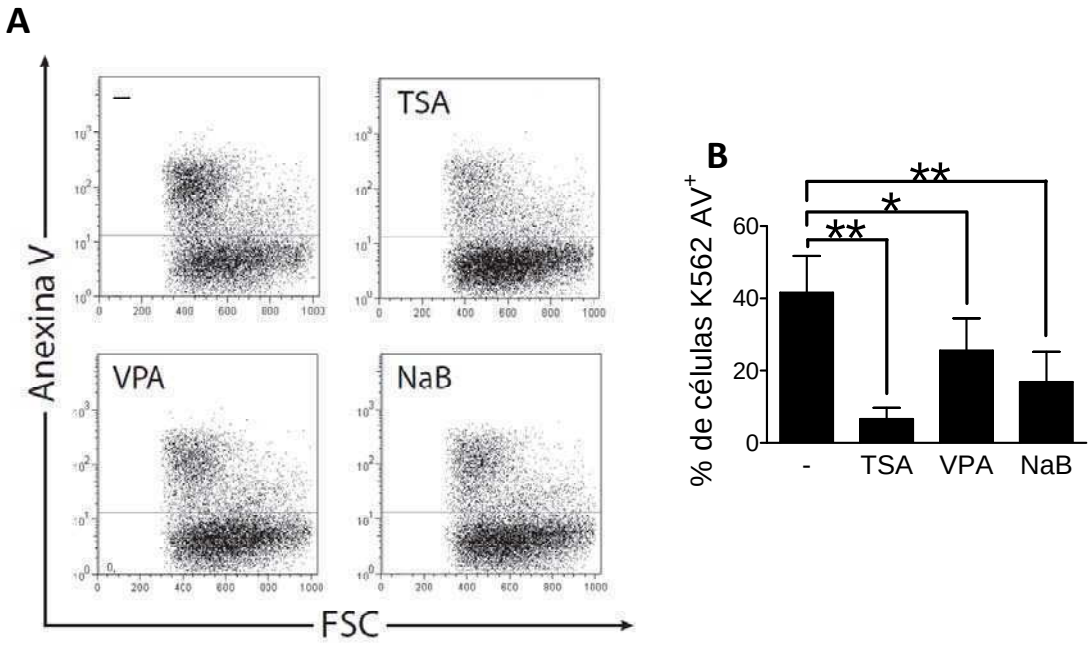

Figura 11. ***Los iHDAC inhibieron la citotoxicidad de las células NK contra la línea celular K562.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 en ausencia (-) o en presencia de 1 μM de TSA, 2 mM de VPA o 2 mM de NaB durante 24 h y se co-cultivaron con la línea celular K562 en una relación 1:1 (células NK: células K562) durante 18 h. Seguidamente, se evaluó el porcentaje de células K562 apoptóticas (AV^+) en la población $CD56^-$ por CF. **A)** Dot plots de un experimento representativo. **B)** Gráfico de la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK de 4 donantes independientes. *, p<0,05; **, p<0,01.

Del conjunto de resultados presentados en esta sección, concluimos que los iHDAC inhiben la producción de IFN-γ, la degranulación y la actividad citotóxica de las células NK humanas

3. Mecanismo de acción de los iHDAC sobre las células NK

3.1. Toxicidad de los iHDAC sobre las células NK

Considerando que él/los mecanismos mediante los cuales los iHDAC inhiben la funcionalidad de las células NK podrían involucrar la inducción de muerte celular, estudiamos su efecto sobre la apoptosis de células NK (**Figura 12**). Sin embargo, observamos que aunque los tres iHDAC indujeron porcentajes significativos de apoptosis en células NK, un alto porcentaje de las células permaneció viable en nuestro sistema experimental luego del tratamiento (**Figura 12B**).

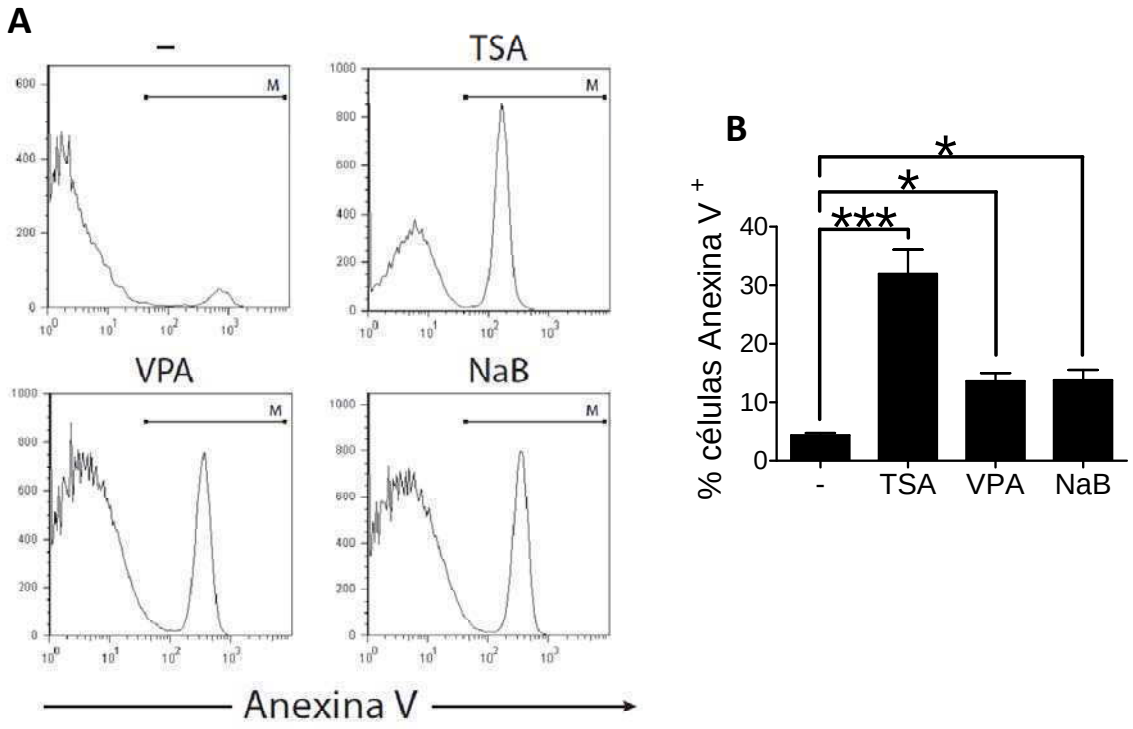

Figura 12. ***Los iHDAC indujeron apoptosis en un porcentaje de las células NK.*** Se evaluó el porcentaje de células apoptóticas (AV^+) en células NK humanas cultivadas en ausencia (-) o en presencia de 1 μM de TSA, 2 mM de VPA o 2 mM de NaB durante 24 h por CF. **A)** Histogramas de un experimento representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK de 4 donantes independientes. *, p<0,05; ***, p<0,001.

Existen publicaciones en las que se investigaron los efectos tóxicos de los iHDAC sobre CMSPs [264, 265, 283], en las cuales se ha observado que inducen bajos niveles de apoptosis. Sin embargo, en esos trabajos no se analizó la apoptosis sobre las diferentes subpoblaciones celulares que conforman los CMSP. Debido a que en general se concluye de esos trabajos que las CMSP son

resistentes a la apoptosis, decidimos evaluar si existe una susceptibilidad diferencial a la muerte celular programada mediada por los iHDAC en células NK y en células T $CD4^+$ (población mayoritaria de las CMSP). Para ello, células NK y células T $CD4^+$ fueron incubadas en presencia de distintas dosis de TSA y empleadas para evaluar apoptosis temprana, apoptosis tardía y necrosis mediante marcación con AV e IP, por CF (**Figura 13**). Observamos que los porcentajes de apoptosis temprana y apoptosis tardía aumentaron en células NK en reposo y en células NK estimuladas con citoquinas, mientras que las células T $CD4^+$ fueron mucho más resistentes a la inducción de apoptosis por TSA.

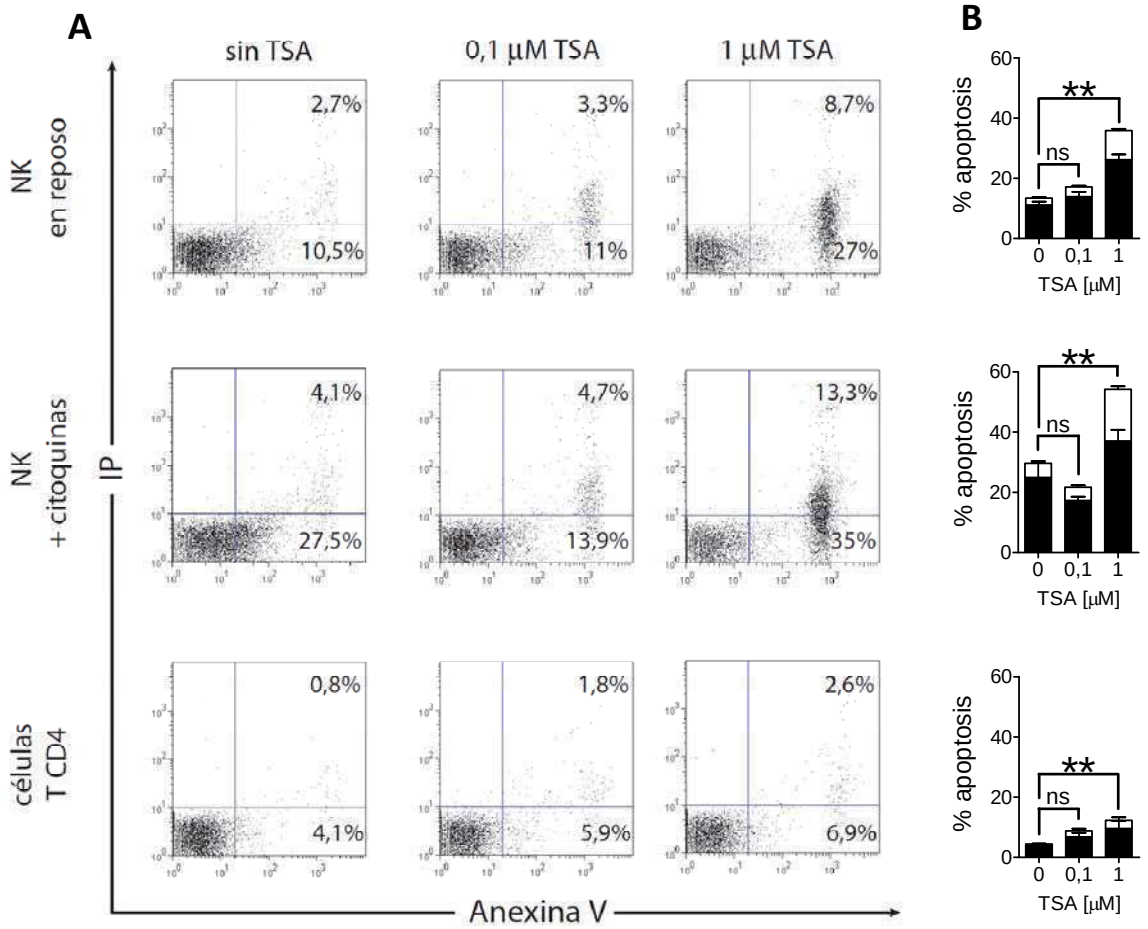

Figura 13. ***Los iHDAC indujeron mayores niveles de apoptosis en células NK que en células T CD4⁺.*** Se incubaron células NK sin estímulo ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15, e IL-18 (20 ng/ml cada una, "NK + citoquinas") o células T $CD4^+$ en ausencia ("sin TSA") o en presencia de 0,1 µM o 1µM de TSA durante 24 h. y se evaluaron los porcentajes de apoptosis temprana (células AV^+IP^-), apoptosis tardía (células AV^+IP^+)y necrosis (AV^-IP^+)mediante marcación con AV e IP y CF. **A)** Dot plots de un experimentos representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK de 4 donantes independientes. Barras negras: apoptosis temprana; barras blancas: apoptosis tardía. ns: no significativo; **, p<0,01.

Si bien los iHDAC indujeron niveles significativos de apoptosis en células NK, cerca del 65⁄ de las células permaneció viable luego del tratamiento con TSA y cerca del 85⁄ permaneció viable luego del tratamiento con VPA o NaB (**Figura 12**). Por lo tanto, la marcada inhibición de las funciones efectoras inducida por los iHDAC no puede ser explicada únicamente por un efecto tóxico de las drogas.

3.2. Modulación de la actividad del factor de transcripción STAT4

Una de las vías transduccionales activadas por IL-12 es la del factor de transcripción STAT4 [85], que se fosforila y se convierte a su forma activa. Con el objeto de continuar elucidando los mecanismos mediante los cuales los iHDAC inhiben la funcionalidad de las células NK, estudiamos el efecto de los iHDAC sobre la formación de pSTAT4. Los resultados obtenidos mostraron que IL-12 promovió la fosforilación de STAT4 pero que la TSA no afectó dicha fosforilación (no mostrado).

3.3. Modulación de la translocación nuclear del factor de transcripción NF-κB

El factor de transcripción NF-κB es un modulador muy importante en las funciones efectoras de células del sistema inmune[284]. Dado que una de las vías transduccionales mas importantes disparadas por IL-12, IL-15 e IL-18 es la del factor de transcripción NF-κB [285-287], analizamos si estos compuestos alteran la activación de ese factor de transcripción evaluando el efecto sobre la translocación al núcleo de la subunidad p50 (**Figura 14**). Observamos que la TSA inhibió de forma significativa la translocación de p50 al núcleo de células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 14B**).

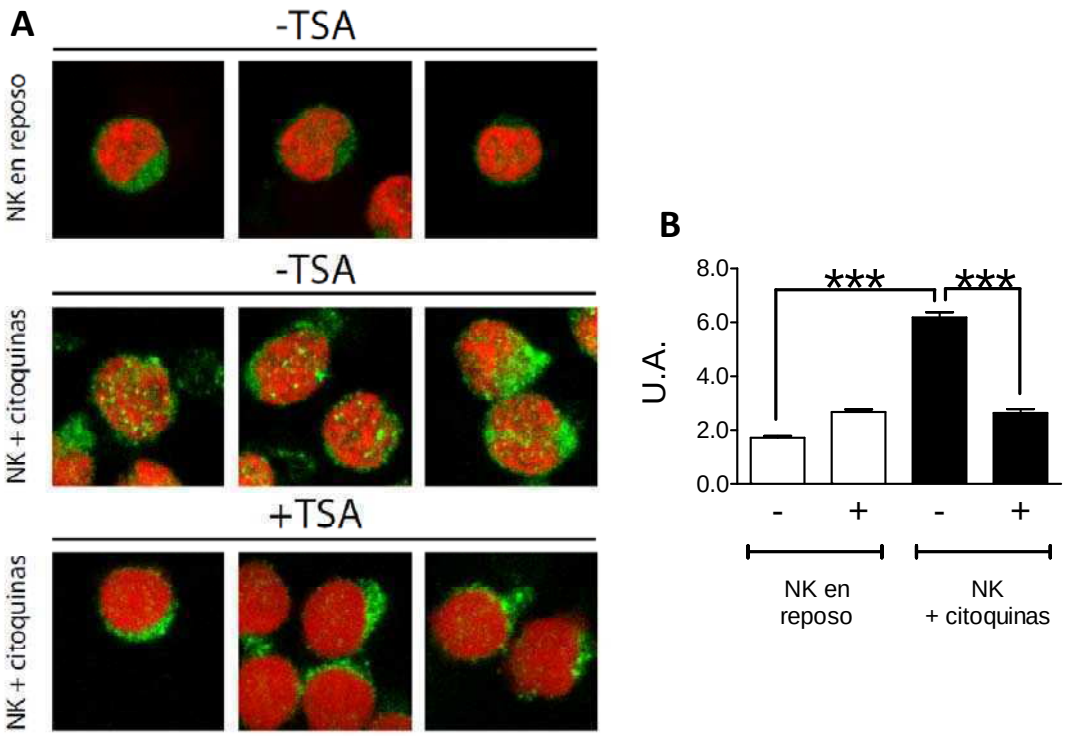

Figura 14. ***La TSA inhibió la translocación al núcleo de la subunidad p50 de NF-κB.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia (-TSA) o en presencia de 1 μM de TSA (+TSA) durante 2 h. Luego, se realizó una marcación de la subunidad p50 de NF-κB (verde) y de los núcleos de las células con IP (rojo), y se analizaron las imágenes mediante microscopía confocal. **A)** Imágenes de un experimento representativo. **B)** media ± SEM de los datos obtenidos a partir de la cuantificación de la fluorescencia nuclear de las células NK de 3 donantes independientes (-: sin TSA; +: 1 μM de TSA). ***, p<0,001.

3.4. Modulación de la expresión de receptores de citoquinas

Con el fin de continuar investigando los mecanismos responsables de la actividad biológica deficiente de las células NK expuestas a iHDAC, evaluamos el efecto de estos compuestos sobre la expresión de receptores para las citoquinas empleadas mediante PCR en tiempo real (**Figura 15**). Observamos que la TSA redujo significativamente la expresión de IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2Rγ (γ_c) e IL-18R. A pesar de que también investigamos la expresión de los receptores IL-12Rβ2 y IL-15Rα, no obtuvimos señal en los ensayos de PCR en tiempo real (no mostrado).

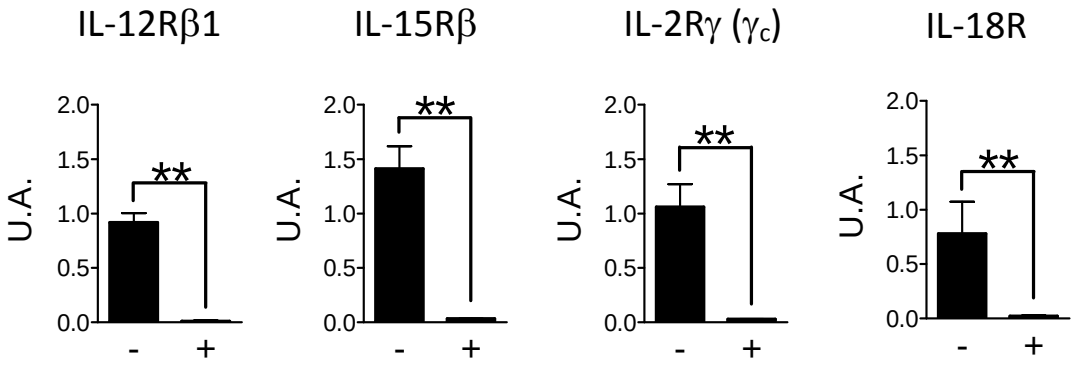

Figura 15. ***La TSA inhibió la expresión de los receptores de citoquinas IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2γR (γc) e IL-18R.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 en ausencia (**-**) o en presencia de 1μM de TSA (**+**) durante 24 h y se analizaron los niveles de expresión de los ARNm de IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2Rγ (γ_c) e IL-18R por PCR en tiempo real según se explica en *Materiales y métodos*. Los gráficos mostrados corresponden a la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 donantes independientes. **, p<0,01.

3.5. Modulación de la expresión de receptores activadores de células NK

Nuestros resultados indican que células NK expuestas a los iHDAC exhiben una citotoxicidad deficiente contra células tumorales. Considerando que este fenómeno podría deberse a un efecto de estos compuestos sobre la expresión y funcionalidad de receptores activadores, investigamos el impacto de los iHDAC sobre la expresión de los receptores NKG2D, NKp30 y NKp46 en células NK en reposo y en células NK estimuladas con citoquinas (**Figura 16**). Los resultados obtenidos mostraron que la TSA moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D y NKp46 tanto en células NK en reposo como en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 16A**) y que esta modulación fue dosis dependiente y estadísticamente significativa (**Figura 16B**).

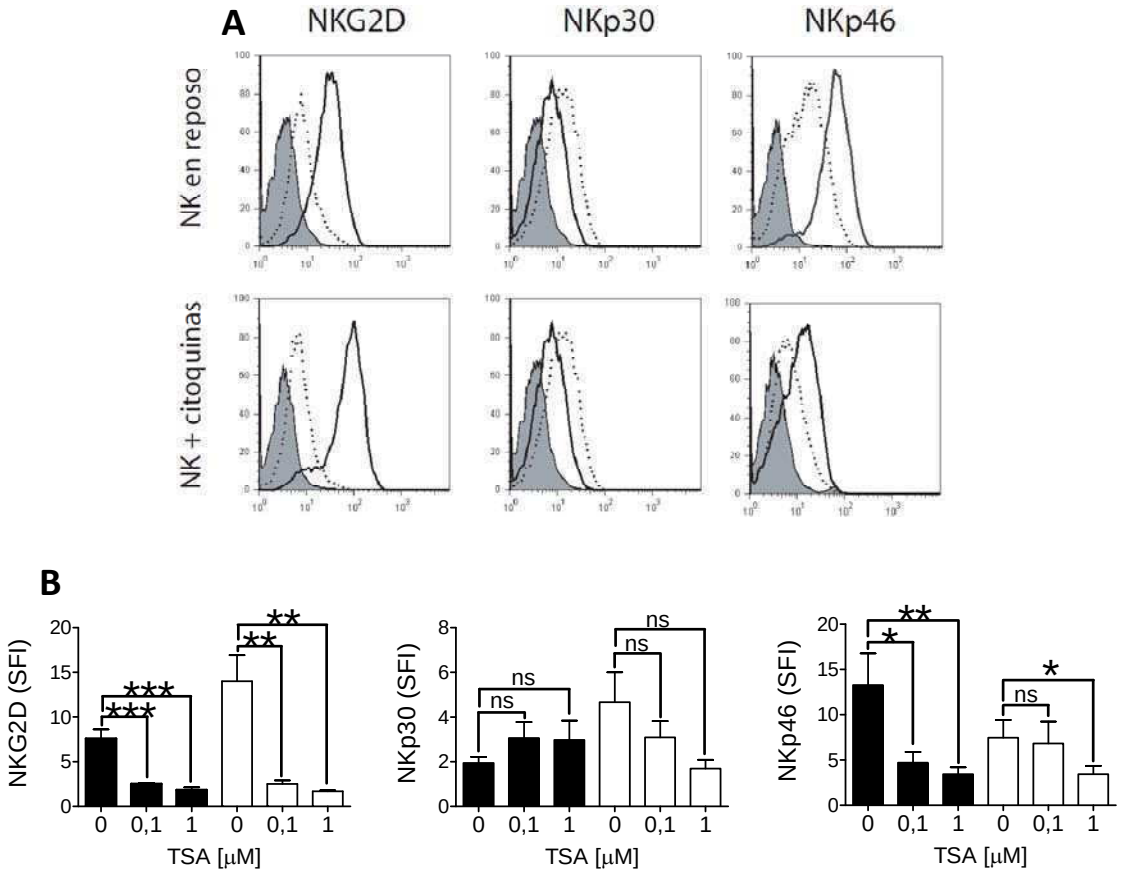

Figura 16. ***La TSA moduló negativamente la expresión de los receptores activadores NKG2D y NKp46.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia (**0**) o en presencia de 0,1 o 1 μM TSA durante 24 h. Seguidamente, se evaluó la expresión de NKG2D, NKp30 y NKp46 por CF. **A**) Se muestran histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin TSA; línea punteada: 1 μM de TSA). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK en reposo (barrras negras) y células NK estimuladas con citoquinas (barras blancas) provenientes de 4 donantes independientes tratadas con TSA. ns: no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.

En células NK en reposo observamos porcentajes de reducción de expresión de 76,0 ± 3,9⁄ para NKG2D y de 73,2 ± 1,4⁄ para NKp46 con la dosis 1 μM de TSA. En células NK estimuladas con citoquinas observamos una reducción de 86,3 ± 2,6⁄ para NKG2D y de 51,8 ± 5,7⁄ para NKp46, también con la dosis de 1 μM de TSA. En cambio, no observamos un efecto de la TSA sobre la expresión del receptor NKp30 en células NK en reposo ni en células NK estimuladas con citoquinas (**Figura 16B**)

Con el objeto de hacer un análisis más extensivo, investigamos si los inhibidores VPA y NaB (de menor espectro de acción) ejercen efectos similares (**Figuras 17 y 18**). Al igual que TSA, VPA

moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D y NKp46 tanto en células NK en reposo como en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 17A**) y la modulación negativa observada fue dosis dependiente (**Figura 17B**). En células NK en reposo, observamos una reducción de la expresión de 73,6 ± 3,6⁄ para NKG2D y de 45,8 ± 7,3⁄ para NKp46 con 10 mM VPA. En células NK estimuladas con citoquinas, observamos una reducción de 70,0 ± 7,2⁄ para NKG2D y de 31,5 ± 8,8⁄ para NKp46 con 10 mM VPA. No observamos una modulación estadísticamente significativa sobre el receptor NKp30 (**Figura 17B**).

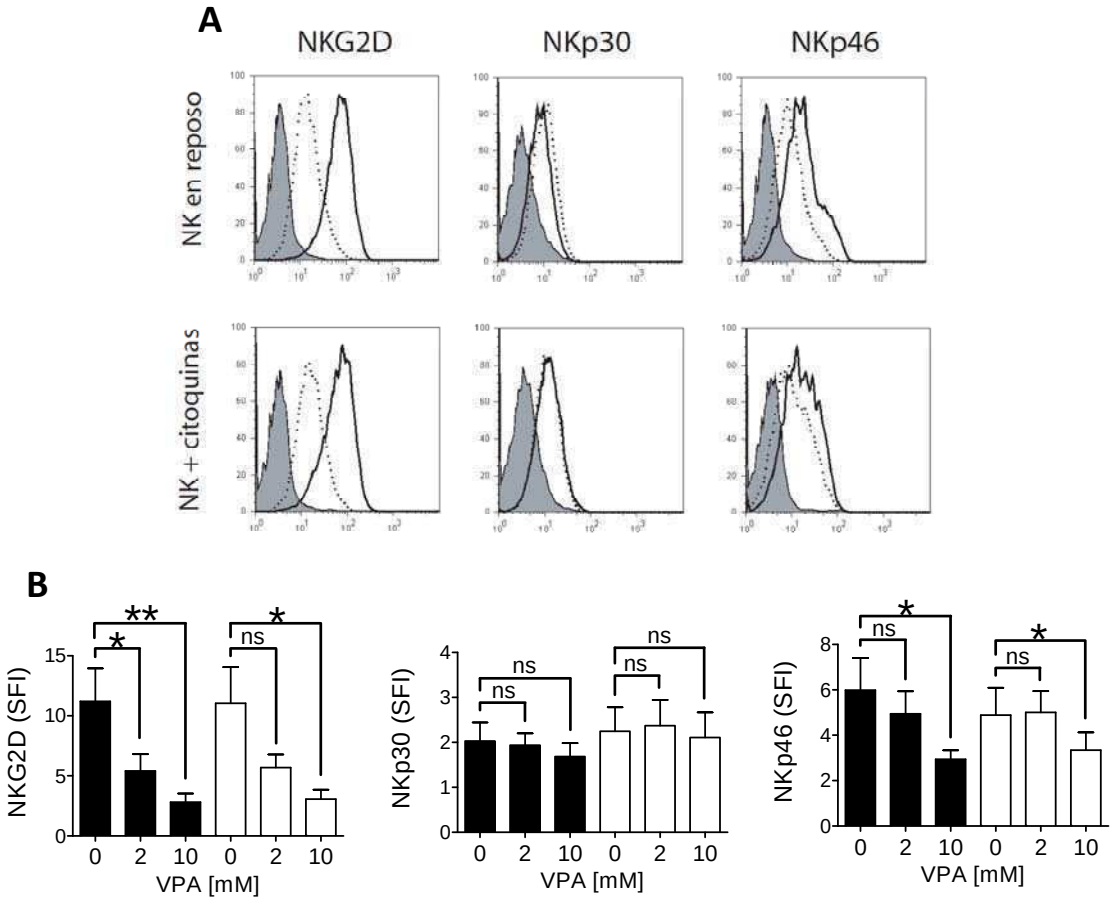

Figura 17. ***VPA moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D y NKp46.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia o en presencia de 2 mM o 10 mM de VPA durante 24 h. Seguidamente, se evaluó la expresión de NKG2D, NKp30 y NKp46 por CF. **A)** Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin droga; línea punteada: 10 mM de VPA. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK en reposo (barrras negras) y células NK estimuladas con citoquinas (barras blancas) provenientes de 4 donantes independientes tratadas con VPA (0: sin VPA). ns: no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01.

Por otra parte, NaB también moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D y NKp46 tanto en células NK en reposo como en células NK estimuladas con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 (**Figura 18A**) y este efecto fue dosis dependiente (**Figura 18B**). Los porcentajes de reducción en la expresión de receptores en células NK en reposo fueron de 67,4 ± 7,1⁄ para NKG2D y de 47,0 ± 7,7⁄ para NKp46 con 10 mM de NaB. En células NK estimuladas con citoquinas, la reducción en la expresión de receptores fue de 58,4 ± 11,2⁄ para NKG2D y de 58,0 ± 3,3⁄ para NKp46 con 10 mM de NaB. Al igual que para TSA, no observamos modulación en la expresión de NKp30 (**Figura 18B**).

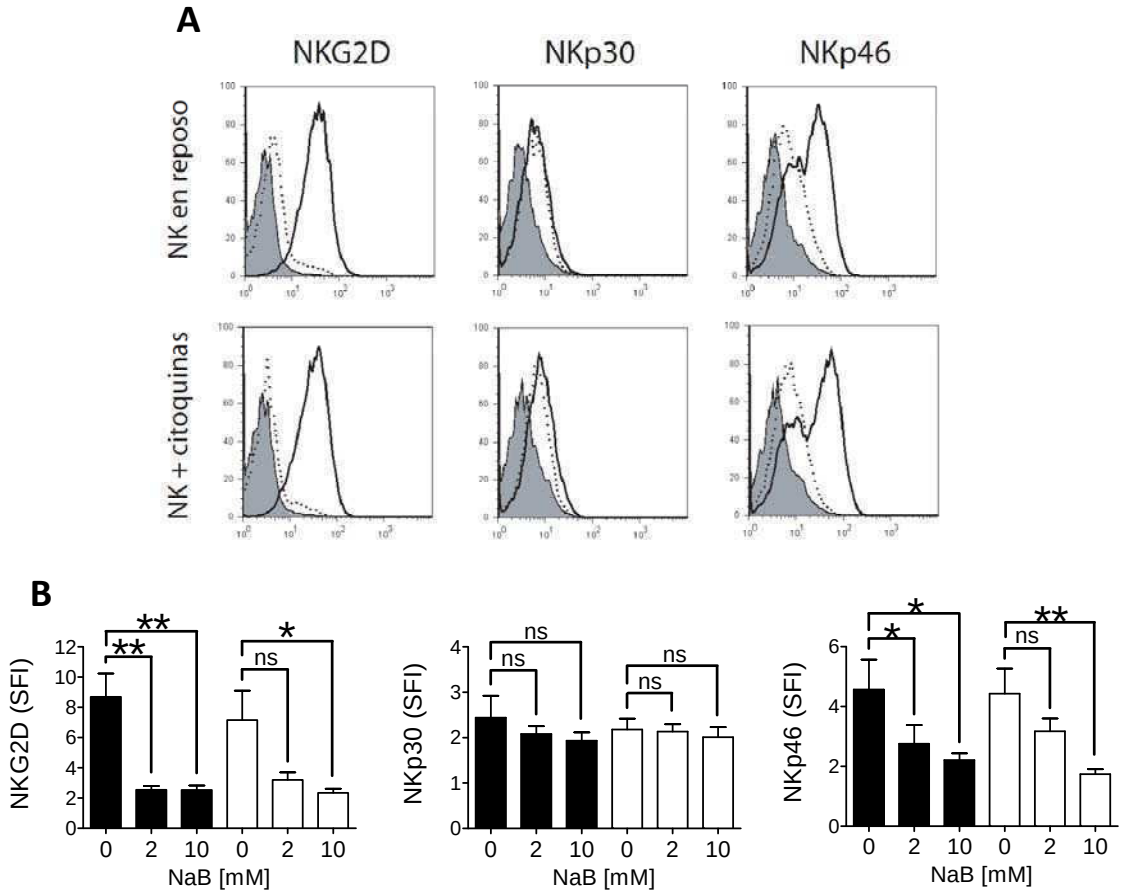

Figura 18. ***NaB moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D y NKp46.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia o en presencia de 2 mM o 10 mM de NaB durante 24 h. Seguidamente, se evaluó la expresión de NKG2D, NKp30 y NKp46 por CF. **A)** Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin droga; línea punteada: 10 mM de NaB. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK en reposo (barras negras) y células NK estimuladas con citoquinas (barras blancas) provenientes de 4 donantes independientes tratadas con NaB (0: sin NaB). ns: no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01.

Además, investigamos si los iHDAC ejercían efectos similares sobre los receptores activadores DNAM-1 y 2B4, los que también son relevantes para la activación y citotoxicidad de las células NK [59, 288] (**Figura 19**). En este caso, utilizando una única dosis de cada iHDAC, observamos que en células NK en reposo TSA pero no VPA ni NaB moduló negativamente la expresión de DNAM-1(**Figura 19A**), con un porcentaje de reducción en la expresión de 36,2 ± 7,1⁄ . Por otra parte, los tres iHDAC modularon negativamente la expresión de DNAM-1 de forma significativa en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18, con porcentajes de reducción de 44,7 ± 6,5⁄ para TSA; 20,4 ± 9,1⁄ para VPA y 18,6 ± 5,7⁄ para NaB (**Figura 19B**).

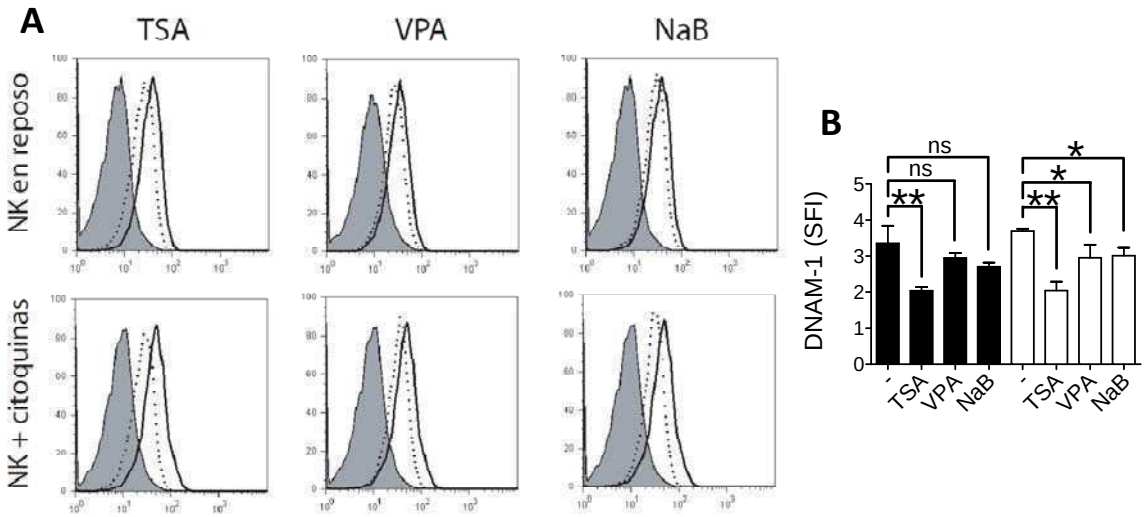

Figura 19. ***Los iHDAC modularon negativamente la expresión de DNAM-1.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia o en presencia de 1 μM de TSA (TSA), 2 mM de VPA (VPA) o 2 mM de NaB (NaB) durante 24 h. Seguidamente, se evaluó la expresión de DNAM-1 por CF. **A)** Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin droga; línea punteada: con iHDAC). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK en reposo (barrras negras) y células NK estimuladas con citoquinas (barras blancas) provenientes de 4 donantes independientes tratadas con iHDAC (-: sin iHDAC). ns: no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01.

Para el receptor 2B4 (**Figura 20**), observamos que TSA pero no VPA ni NaB moduló negativamente su expresión y de forma significativa en células NK en reposo, con una reducción de 40,4 ± 4,1⁄ (**Figura 20A**). Asimismo, TSA pero no VPA ni NaB moduló negativamente y de forma significativa la expresión de 2B4 en células NK estimuladas con citoquinas, con una reducción de 39,6 ± 6,7⁄ (**Figura 20B**).

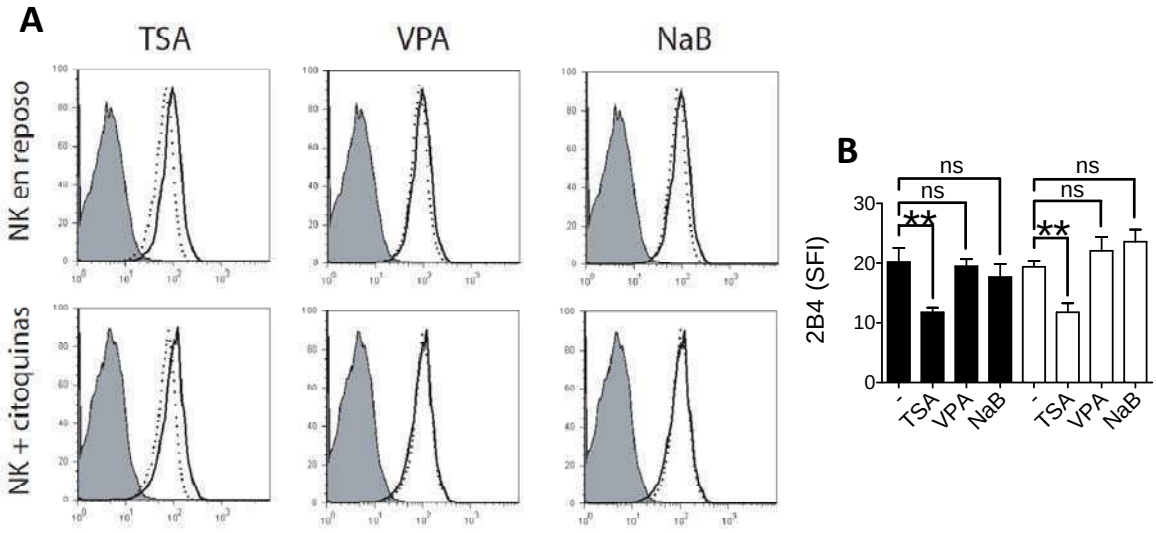

Figura 20. ***Los iHDAC modularon negativamente la expresión del receptor 2B4.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una; "NK+citoquinas") en ausencia o en presencia de 1 μM de TSA (TSA), 2 mM de VPA (VPA) o 2 mM de NaB (NaB) durante 24 h. Seguidamente, se evaluó la expresión de 2B4 por CF. **A)** Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin droga; línea punteada: con iHDAC). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK en reposo (barras negras) y células NK estimuladas con citoquinas (barras blancas) provenientes de 4 donantes independientes tratadas con iHDAC (-: sin iHDAC). ns: no significativo; **, p<0,01.

Los resultados presentados en esta sección indican en su conjunto que el efecto inhibitorio de los iHDAC sobre la funcionalidad de células NK se debe a una inducción parcial de apoptosis, una inhibición de la translocación de NF-κB al núcleo y una modulación negativa en la expresión de receptores para citoquinas y receptores activadores

4. Duración del efecto de los iHDAC

Durante una quimioterapia contra el cáncer, se busca mantener una concentración sanguínea de la droga dentro de determinados niveles, lo que implica una administración de la droga en forma periódica. Por este motivo, investigamos la durabilidad del efecto inhibitorio de los iHDAC sobre las células NK y sobre su producción de IFN-γ (**Figura 21**).Observamos que células NK tratadas

con TSA durante 24 h, lavadas y cultivadas por 72 h más en ausencia de la droga pero en presencia de las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 recuperaron gradualmente su capacidad de producir IFN-γ.

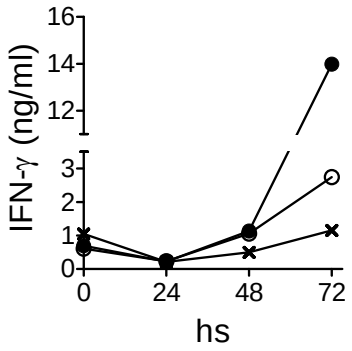

Figura 21. ***El efecto inhibitorio de la TSA sobre la producción de IFN-γ por células NK fue reversible.*** Se incubaron células NK humanas con IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml cada una) en presencia de 1 μM de TSA, durante 24 h. Seguidamente, las células se lavaron exhaustivamente para eliminar la TSA, se cultivaron en presencia de citoquinas frescas a 10 ng/ml cada una y se evaluó la concentración de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo por ELISA. En el gráfico mostrado, cada línea representa la producción de IFN-γ a lo largo del tiempo de células NK provenientes de cada uno de los tres donantes estudiados.

Por otra parte, células NK tratadas con TSA durante 24 h, lavadas y cultivadas en ausencia de la droga recuperaron gradualmente los niveles de expresión de NKG2D y NKp46 hasta llegar prácticamente a los niveles de células NK que nunca fueron expuestas a la TSA (**Figura 22**).

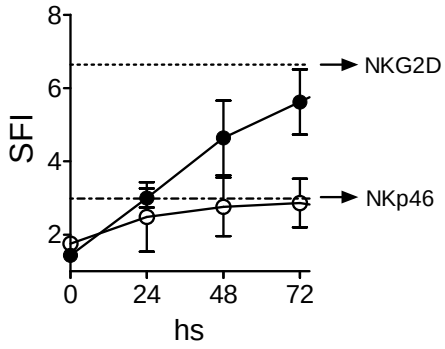

Figura 22. ***La modulación negativa que ejerce la TSA sobre la expresión de los receptores NKG2D y NKp46 en células NK también fue reversible.*** Se incubaron células NK humanas con 10 ng/ml de IL-15 en ausencia o en presencia de 1 μM de TSA durante 24 h. Seguidamente, las células se lavaron exhaustivamente para eliminar la TSA y se cultivaron durante 24-72 h con IL-15 como factor de sobrevida. Seguidamente, se evaluó la expresión de NKG2D (●) y NKp46 (○) por CF. El gráfico muestra la media ± SEM de resultados obtenidos con células NK provenientes de 3 donantes independientes. Línea continua: expresión de NKG2D y NKp46 en células NK tratadas con TSA. Línea punteada: expresión de NKG2D y NKp46 en células NK no expuestas a la droga.

Consecuentemente, el efecto inhibitorio de la TSA sobre la producción de IFN-γ y la expresión de los receptores activadores NKG2D y NKp46 es reversible

5. Impacto de los iHDAC sobre células NK activadas

A lo largo del desarrollo de este trabajo de tesis, hemos investigado el efecto de los iHDAC sobre células NK en reposo y sobre células NK estimuladas con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18, es decir células NK que se encuentran en proceso de activación.

Con el objeto de investigar el efecto de los iHDAC sobre células NK activadas (que se caracterizan por la expresión de marcadores de activación tales como CD69 y CD25, además de una capacidad citotóxica aumentada y una mayor producción de IFN-γ), incubamos células NK humanas con IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml cada una) durante 4 días, las lavamos y las colocamos nuevamente en cultivo en ausencia o en presencia de TSA durante 24 h mas, luego de lo cual evaluamos expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25 y de los receptores activadores NKG2D, NKp30, NKp44 (sólo se expresa en células NK activadas) y NKp46 (**Figura 23**).Observamos que las células NK activadas, caracterizadas por la expresión de CD69 y CD25 (**Figura 23A**), también fueron susceptibles a los efectos inhibitorios de la TSA ya que observamos que la droga moduló negativamente y de forma estadísticamente significativa la expresión de NKG2D, NKp44 y NKp46 (**Figura 23B**). En este caso, los porcentajes de reducción en la expresión observados fueron de 77,4 ± 5,2⁄ para NKG2D, 48 ± 15⁄ para NKp44 y de 56,6 ± 7,2⁄ para NKp46 (**Figura 23C**).

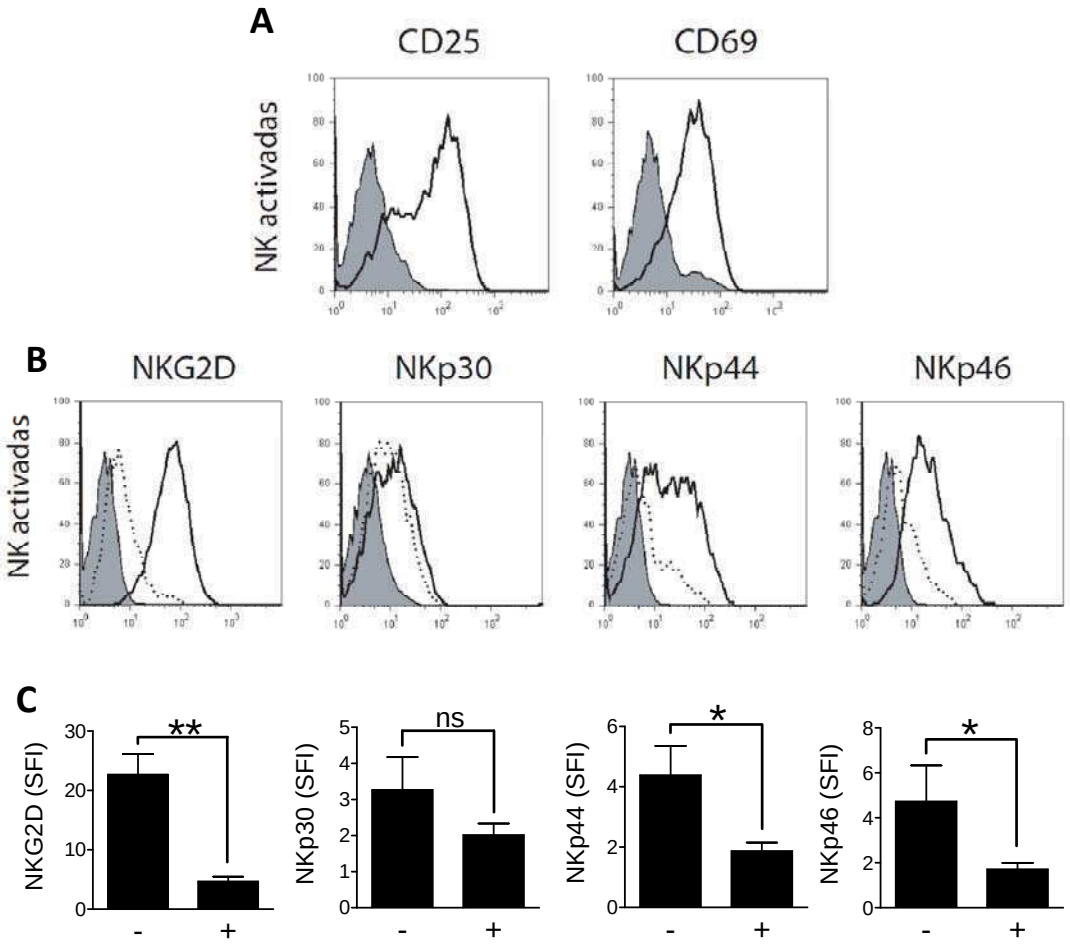

Figura 23. ***La TSA moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D, NKp44 y NKp46 en células NK activadas.*** Se incubaron células NK humanas con IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml cada una) durante 4 días, se lavaron y se cultivaron con citoquinas frescas (IL-12, IL-15 e IL-18 a 10 ng/ml cada una) en ausencia o en presencia de 1μM de TSA durante 24 h. Luego, se evaluó la expresión de CD25, CD69, NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46 por CF. **A**) Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; histograma línea contínua: CD25 o CD69). **B**) Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea negra contínua: sin TSA; línea punteada: 1 μM de TSA). **C)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 donantes independientes tratadas con TSA (-: sin TSA, +: 1 μM TSA). ns: no significativo; *, p<0,05; **, p<0,01.

Estos resultados indican que la TSA modula negativamente la expresión de receptores activadores también en células NK activadas.

6. iHDAC y rol de CD25

Además de los efectos de la TSA sobre la expresión de NKG2D, NKp44 y NKp46 en células NK activadas, también observamos que esta droga moduló negativamente la expresión de la molécula CD25, pero no la de CD69 (**Figura 24A**). Debido a que la expresión de CD25 es clave para la formación del receptor de IL-2 de alta afinidad y debido a la relevancia fisiológica de dicho receptor en el proceso de activación y proliferación de las células NK [85], investigamos si los efectos de TSA sobre la expresión de CD25 tenían consecuencias funcionales. Para esto, repetimos el esquema experimental descripto en el punto anterior, con la salvedad de que luego de la incubación de las células NK activadas con TSA, éstas se cultivaron en presencia de IL-2 por 24 h. Seguidamente, se cosecharon sobrenadantes de cultivo y se evaluó la producción de IFN-γ (**Figura 24B**). Observamos que células NK incubadas en presencia de TSA (y que, por ende, expresaban menores niveles de CD25), produjeron menores niveles de IFN-γ luego de la re-estimulación con IL-2.

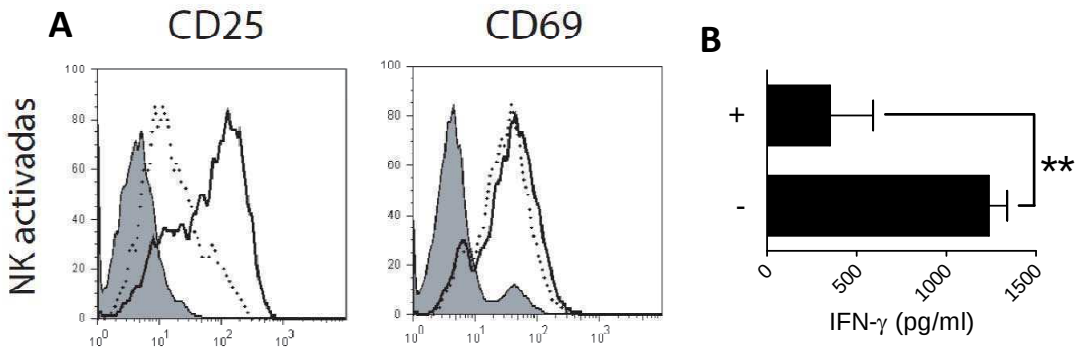

Figura 24. ***La TSA moduló negativamente la expresión de CD25 y como consecuencia, las células NK perdieron la capacidad de respuesta frente a IL-2***. Se incubaron células NK humanas con IL-12, IL-15 e IL-18 (10 ng/ml cada una) durante 4 días. Luego, se lavaron y se colocaron nuevamente en cultivo con citoquinas en ausencia o en presencia de 1 μM de TSA durante 24 h. Se utilizó una parte de las células NK para evaluar la expresión de CD25 y CD69 por CF y se utilizó otra parte para ser re-estimuladas con 5 ng/ml de IL-2, durante otras 24 h. Seguidamente, se cosecharon sobrenadantes y se analizó la producción de IFN-γ mediante ELISA. **A)** Histogramas de un experimento representativo (histograma gris: CI; línea continua: sin TSA; línea punteada: con 1 μM de TSA). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 donantes independientes (-: sin TSA, +: 1 μM TSA). **, p<0,01.

Consecuentemente, otro de los efectos de la TSA es la modulación negativa de la expresión de CD25 en células NK activadas, lo que tiene consecuencias funcionales ya que este efecto se traduce en una menor capacidad de respuesta a IL-2.

7. Consecuencias funcionales de la modulación de la expresión de receptores activadores por iHDAC

Como hemos demostrado en el inciso **3.5**, uno de los mecanismos mediante los cuales los iHDAC afectan a las células NK es la modulación negativa de la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp44, NKp46, DNAM-1 y 2B4. Debido a que los mayores niveles de reducción en la expresión observados fueron para los receptores NKG2D y NKp46, investigamos las consecuencias funcionales de esta modulación sobre la actividad citotóxica, empleando un ensayo de citotoxicidad redirigido o *redirected killing assay* (**Figura 25**).

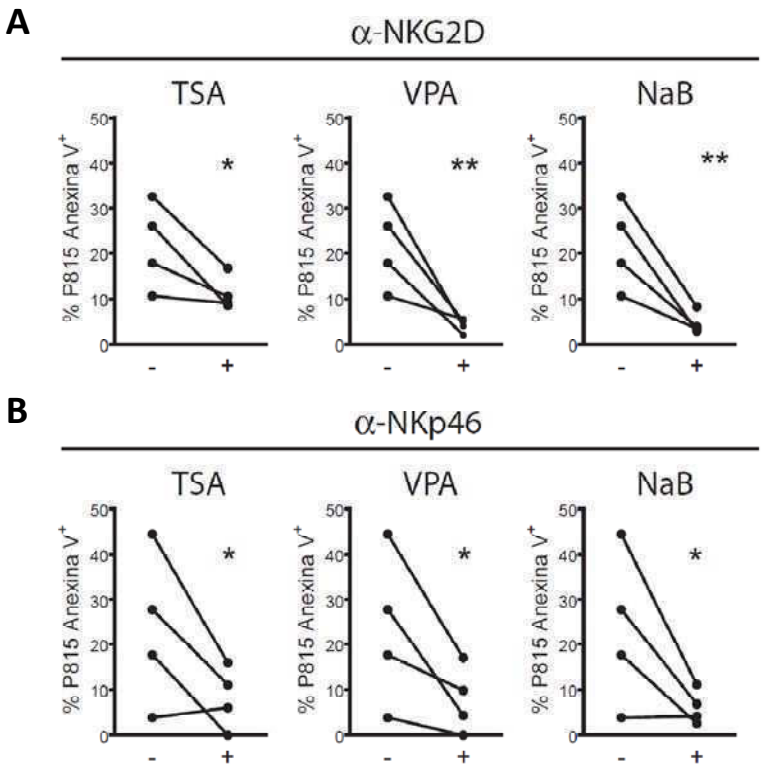

Figura 25. ***Las células NK tratadas con iHDAC exhibieron una menor capacidad citotóxica dependiente de NKG2D y NKp46.*** Se incubaron células NK humanas con 20 ng/ml de IL-15 en ausencia (**-**) o en presencia de 1 μM de TSA, 2 mM de VPA o 2 mM de NaB (**+**) durante 24 h, se lavaron exhaustivamente y se co-cultivaron con células P815 sensibilizadas con AcMo anti-NKG2D (α-NKG2D, **A**) o anti-NKp46 (α-NKp46, **B**) en una relación 3:1 (células NK: células P815) durante 18 h. Seguidamente, se evaluó el porcentaje de células P815 apoptóticas (AV^+)en la población $CD56^-$ por CF. Se muestran los porcentajes individuales de células P815 AV^+ producidos por células NK provenientes de 4 donantes independientes. *, p<0,05; **, p<0,01.

Observamos que cuando se incubaron células NK previamente expuestas a TSA, VPA o NaB con células P815 sensibilizadas con un AcMo anti-NKG2D, los porcentajes de citotoxicidad (evidenciados como porcentajes de células P815 AV^+), fueron significativamente menores que los porcentajes de citotoxicidad producidos por células NK no expuestas a los iHDAC (**Figura 25A**). Observamos el mismo fenómeno cuando se incubaron células NK expuestas a los iHDAC con células P815 sensibilizadas con un AcMo anti-NKp46 (**Figura 25B**). Estos resultados demuestran que la modulación negativa de la expresión de estos receptores inducida por los iHDAC tiene consecuencias funcionales sobre la actividad citotóxica de las células NK.

De los resultados presentados en esta sección concluimos que la inhibición de la expresión de NKG2D y NKp46 por efecto de los iHDAC compromete la capacidad citotóxica de células NK mediada a través de estos receptores.

8. Impacto de los iHDAC sobre células NK *in vivo*

8.1. Impacto de los iHDAC sobre células NK murinas in vitro

Con el objeto de investigar si los efectos observados *in vitro* con células NK humanas también ocurren *in vivo,* primeramente analizamos el efecto de los iHDAC sobre la funcionalidad de células NK murinas aisladas a partir de esplenocitos totales de animales de la cepa C57BL/6 por selección positiva, *in vitro* (**Figura 26**). Observamos que, al igual que lo observado con células NK humanas, los iHDAC inhibieron significativamente la producción de IFN-γ por células NK murinas *in vitro*.

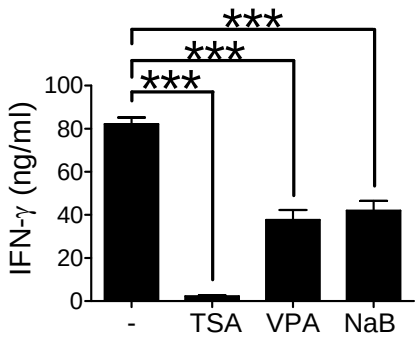

Figura 26. ***Los iHDAC inhibieron la producción de IFN-γ por células NK murinas in vitro.*** Se incubaron células NK de ratones C57BL/6 con las citoquinas de ratón IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una) en ausencia (**-**) o en presencia de 0,1 μM de TSA (TSA), 1 mM de VPA (VPA) o 1 mM de NaB (NaB) durante 24 h. Seguidamente, se determinó la concentración de IFN-γ en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA. En el gráfico se muestra la media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 animales. ***, p<0,001.

8.2. Efecto *in vivo* de la TSA sobre la producción de IFN-γ por células NK

Después de haber corroborado que los efectos de los iHDAC también se manifiestan sobre las células NK murinas *in vitro*, realizamos experimentos *in vivo*. Para ello, trabajamos con dos grupos de 4 animales de la cepa C57BL/6. A un grupo se le administró una dosis de 2 mg/Kg de TSA por vía intraperitoneal, mientras que al otro grupo (control) se le administró un volumen equivalente de DMSO (vehículo de la droga) por la misma vía, diariamente durante 4 días. Al quinto día, se sacrificaron los animales, se obtuvieron sus esplenocitos y se aislaron células NK por selección positiva (**Figura 27**).

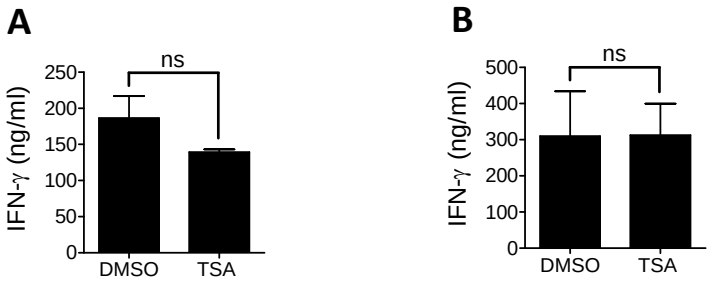

Figura 27. ***El tratamiento in vivo con TSA inhibió la producción de IFN-γ por células NK ex vivo.*** Un grupo de animales machos de la cepa C57BL/6. Fue tratado con 2 mg/Kg de TSA por vía intraperitoneal, mientras que otro grupo de animales fue tratado con un volumen equivalente de DMSO por la misma vía diariamente durante 4 días. Al quinto día, se sacrificaron los animales y se aislaron células NK a partir de esplenocitos. Las células NK se incubaron con IL-12, IL-15 e IL-18 (20 ng/ml cada una) durante 24 h (**A**) o 4 días (**B**) luego de lo cual se cosecharon sobrenadantes de cultivo y se determinó producción de IFN-γ mediante ELISA. En los gráficos se muestra la media ± SEM de resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 animales de cada grupo. ns: no significativo

Cuando estas células fueron estimuladas *ex vivo* con IL-12, IL-15 e IL-18 durante 24 h, observamos que hubo una tendencia a una menor producción de IFN-γ en sobrenadantes de células NK provenientes de animales que habían sido tratados con TSA, aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas (**Figura 27A**).

Cuando las mismas células NK fueron cultivadas *ex vivo* con IL-12, IL-15 e IL-18 durante 4 días, observamos que los niveles de IFN-γ producidos por células NK de ambos grupos de animales fueron muy similares, sugiriendo que en células NK murinas el efecto inhibitorio de la TSA también sería reversible cuando son cultivadas en ausencia de la droga (**Figura 27B**).

8.3. Efecto *in vivo* de la TSA sobre la expresión de receptores activadores en células NK

A continuación, investigamos el efecto de la TSA sobre la expresión de receptores activadores de células NK de ratón (**Figura 28**). Observamos que células NK provenientes de animales que habían sido tratados con TSA expresaron niveles significativamente menores de los receptores activadores NK1.1, NKG2D y NKp46 respecto de células NK provenientes de animales tratados con DMSO (**Figura 28B**).

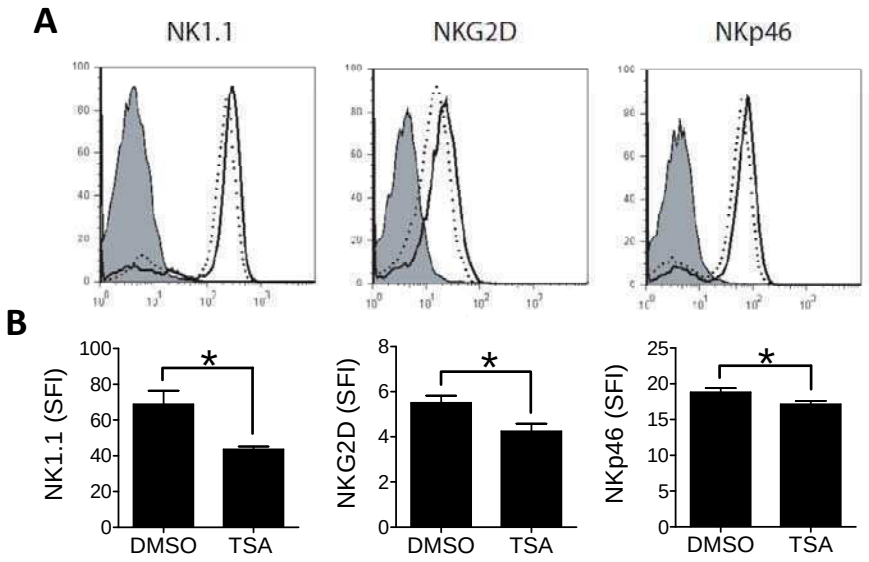

Figura 28. ***El tratamiento in vivo con TSA moduló negativamente la expresión de receptores activadores en células NK de ratón.*** Un grupo de animales machos de la cepa C57BL/6 fue tratado con 2 mg/Kg de TSA por vía intraperitoneal, mientras que otro grupo de animales fue tratado con un volumen equivalente de DMSO por la misma vía diariamente durante 4 días. Al quinto día, se sacrificaron los animales y se aislaron células NK a partir de esplenocitos. Las células NK fueron empleadas para evaluar la expresión de NK1.1, NKG2D y NKp46 por CF. **A)** Histogramas representativos (histograma gris: CI, línea negra contínua: animales tratados con DMSO, línea punteada: animales tratados con 2mg/Kg de TSA). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 4 animales de cada grupo. *, p<0,05

Estos resultados indican que los iHDAC inhiben la producción de IFN-γ por células NK murinas *in vitro* y que el tratamiento *in vivo* con esta droga inhibe la producción de IFN-γ y modula negativamente la expresión de receptores activadores de células NK murinas.

9. Impacto *in vivo* del VPA sobre la funcionalidad de células NK en humanos

Con el objeto de avanzar con nuestros estudios en seres humanos, haciendo búsquedas bibliográficas nos encontramos con el hecho de que hace ya más de 10 años que se trata a pacientes epilépticos con VPA, a veces como tratamiento monodroga y otras en combinación con otras drogas [273-279]. Un paciente libre de tumores (en este caso, pacientes epilépticos) pero que se encuentra bajo tratamiento con VPA resulta útil para estudiar el impacto *in vivo* de los iHDAC sobre células NK humanas, dado que las mismas se encuentran expuestas a la droga únicamente y no a otros factores que puedan afectar su funcionalidad, como en el caso de pacientes con patologías como el linfoma T cutáneo tratados con iHDAC

Por ello, establecimos una colaboración con el Servicio de Epilepsia del Instituto FLENI con el fin de analizar muestras de sangre de pacientes con epilepsia que se encuentren bajo tratamiento con VPA como monodroga. A partir de las muestras, se aislaron CMSP y células NK, se determinó el porcentaje de células NK en CMSP, la expresión de receptores activadores y la producción de IFN-γ y degranulación en respuesta a citoquinas y a la línea celular K562.

Hasta el presente, hemos acumulado los datos de tres pacientes ya que el estudio ha comenzado recientemente. Sin embargo, los resultados obtenidos muestran algunas tendencias interesantes ya que los pacientes exhiben un porcentaje de células NK en CMSP que se encuentra por debajo del rango de células NK en CMSP de donantes sanos (**Figura 29**). Un análisis pormenorizado de las subpoblaciones $CD56^{dim}$ y $CD56^{bright}$ permitió observar que los pacientes tratados con VPA poseen un menor porcentaje de células NK $CD56^{dim}$, pero no de células NK $CD56^{bright}$.

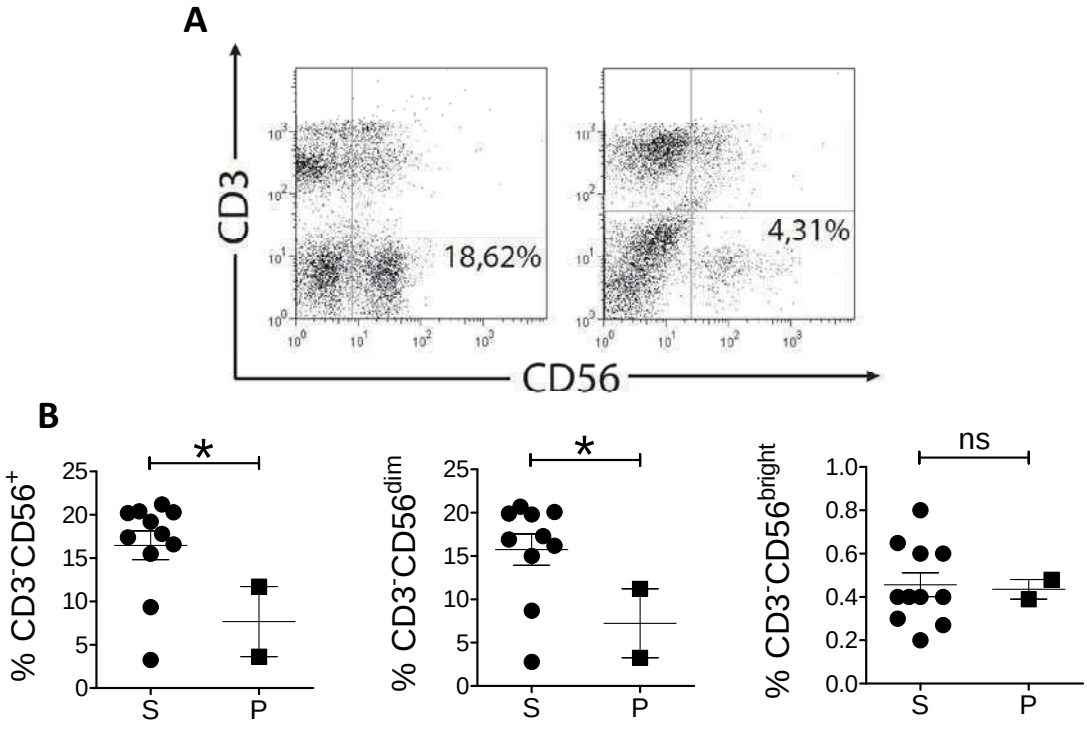

Figura 29. ***Pacientes epilépticos en tratamiento con VPA exhibieron un menor porcentaje de células NK y de células NK CD56^{dim} en CMSP.*** Se aislaron CMSP de muestras de sangre de donantes sanos (S) y de pacientes tratados con VPA (P), se realizaron inmunomarcaciones para CD3 y CD56 y se analizaron los porcentajes de células NK totales (CD3$^-$CD56$^+$) y de las subpoblaciones CD3$^-$CD56^{dim} y CD3$^-$CD56^{bright} por CF. **A)** Dot plot de un experimento representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con los CMSP de 10 donantes normales y 2 pacientes.

Con el objeto de identificar posibles marcadores en células NK que permitan hacer un seguimiento del "estado de inmunovigilancia" en pacientes tratados con VPA, aislamos células NK de donantes normales y de pacientes con el objeto de analizar la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp46 y DNAM-1 (**Figura 30**), cuya expresión se redujo significativamente en células NK incubadas *in vitro* con iHDAC (**Figuras 16-19**). Aunque no observamos diferencias significativas, observamos una tendencia a una menor expresión de los receptores NKG2D y NKp46 en células NK de pacientes tratados en relación a la expresión de los estos receptores en células NK de donantes sanos. No observamos diferencias para el receptor DNAM-1 (**Figura 30B**).

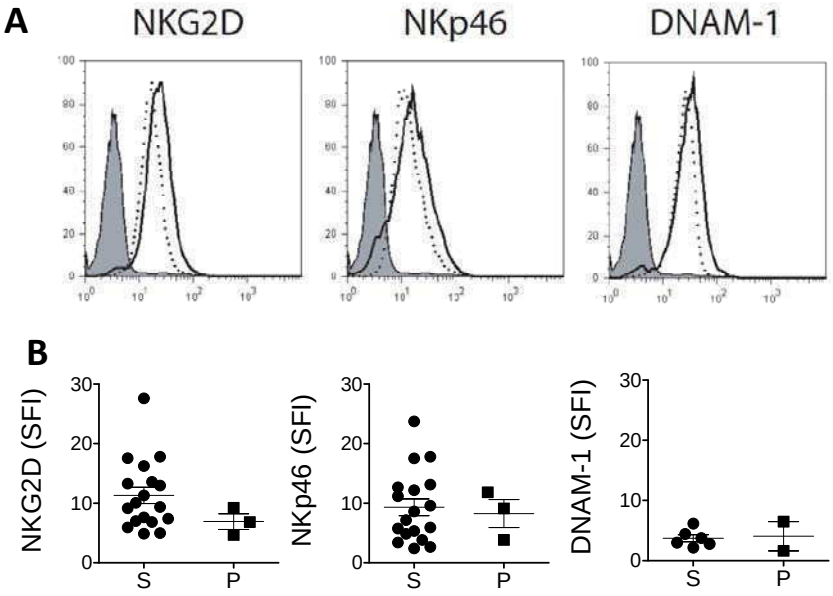

Figura 30. ***Células NK de pacientes epilépticos tratados con VPA expresaron menores niveles de los receptores NKG2D y NKp46 que células NK de donantes sanos***. Se aislaron células NK de muestras de sangre de donantes sanos y de pacientes tratados con VPA y se evaluó la expresión de NKG2D, NKp46 y DNAM-1 por CF. **A)** Histogramas de experimentos representativos (histograma gris: CI, línea negra contínua: donante sano, línea punteada: paciente tratado con VPA). **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con células NK provenientes de 18 donantes sanos (S) y 3 pacientes (P) epilépticos (para NKG2D y NKp46) y de 6 donantes sanos (S) y 2 pacientes (P) epilépticos (para DNAM-1).

También realizamos ensayos funcionales evaluando la producción de IFN-γ y degranulación de células NK mediante *"single cell assay"*. Evaluamos el porcentaje de células IFN-γ^+ totales en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18, ya que estas citoquinas constituyen un estímulo fisiológico que promueve mayoritariamente producción de IFN-γ (**Figura 31**). Por otro lado, evaluamos el porcentaje de células CD107a$^+$ en células NK que fueron co-cultivadas con la línea celular K562 ya que este último es un estímulo que promueve esencialmente la degranulación (**Figura 32**). Observamos que la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18 de células NK provenientes de donantes sanos indujo un 16,1 ± 3,2⁄ de células IFN-γ^+ en la subpoblación CD56^{dim} y un 3,6 ± 0,5⁄ de células IFN-γ^+ en la subpoblación CD56^{bright}, mientras que en células NK provenientes de pacientes tratados con VPA, la estimulación con citoquinas indujo un 8,1 ± 6,1⁄ de células IFN-γ^+ en la subpoblación CD56^{dim} y un 0,7 ± 0,2⁄ de células IFN-γ^+ en la subpoblación CD56^{bright} (**Figura 31B**). Aunque las diferencias no alcanzaron a ser estadísticamente significativas, creemos que a medida

que acumulemos datos de un mayor número de pacientes, tendremos una mejor comprensión del efecto del VPA sobre este parámetro.

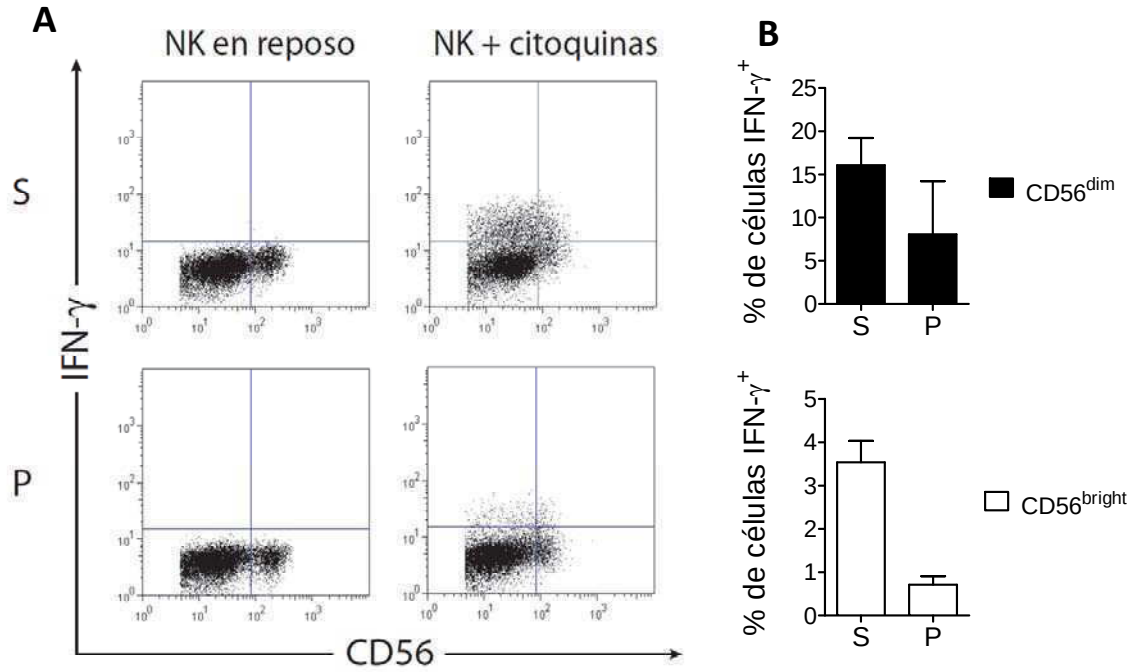

Figura 31. ***La producción de IFN-γ fue menor en las subpoblación CD56^{dim} y en la CD56^{bright} de células NK provenientes de pacientes tratados con VPA.*** Se aislaron células NK de sangre de donantes sanos (S) y de pacientes tratados con VPA(P), se incubaron con 20 ng/ml de IL-15 ("NK en reposo") o con IL-12, IL-15, e IL-18 (20 ng/ml cada una, "NK + citoquinas") durante 24 h y se evaluó el porcentaje de células NK productoras de IFN-γ por CF intracitoplasmática en las subpoblaciones CD56^{dim} y CD56^{bright} según se describe en *Materiales y métodos*. **A)** Dot plots de un experimento representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con muestras provenientes de 2 donantes sanos y de dos pacientes tratados con VPA.

Cuando se co-cultivaron células NK de donantes sanos con la línea celular K562, observamos una inducción de 52,3± 19,0⁄ de células CD107a^{+}, mientras que en células NK provenientes de pacientes tratados con VPA observamos una inducción de 36,3 ± 15,3⁄ de células CD107a^{+} (**Figura 32**). Como en el caso de la producción de IFN-γ, aunque las diferencias tampoco alcanzaron a ser estadísticamente significativas, también pensamos que a medida que acumulemos datos de un mayor número de pacientes tendremos una mejor comprensión del efecto del VPA sobre este parámetro.

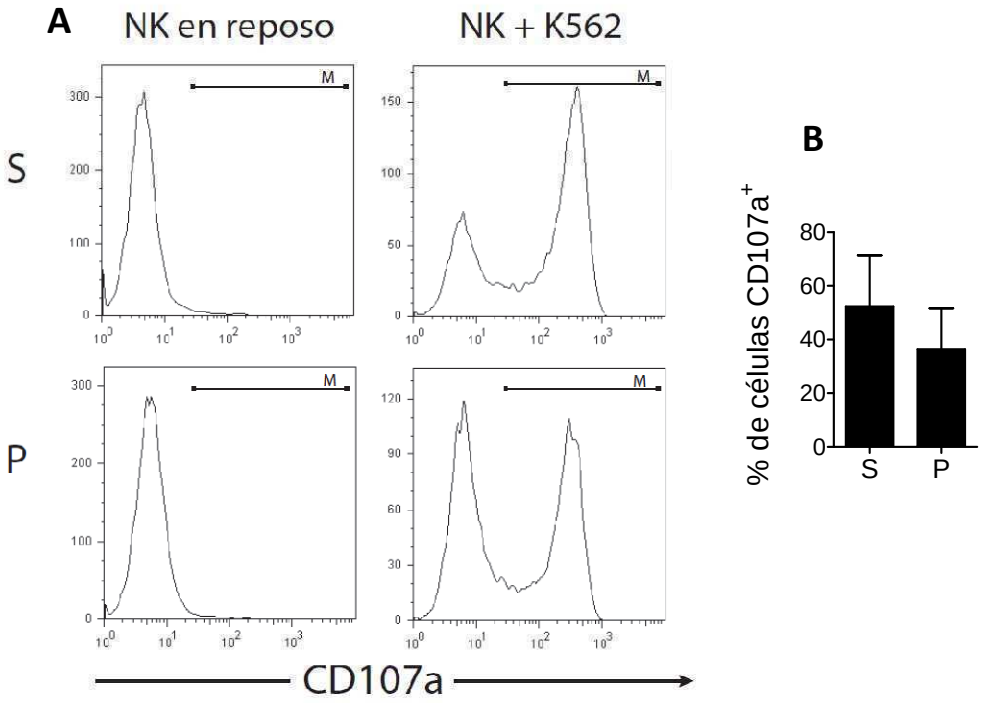

Figura 32. ***Células NK de pacientes tratados con VPA poseen una menor capacidad de degranulación que células NK de donantes sanos.*** Se aislaron células NK de sangre de donantes sanos (S) y de pacientes tratados con VPA(P), se incubaron las mismas con 20 ng/ml de IL-15 durante 18 h y se mantuvieron en cultivo sin estímulo ("NK en reposo") o se co-cultivaron con la línea celular K562 en una relación 1:3 (células NK: células K562; "NK + K562") durante 4 h. Seguidamente, se evaluó la degranulación mediante un *"single cell assay"* según se describe en *Materiales y métodos*. **A)** Histogramas de un experimento representativo. **B)** Media ± SEM de los resultados obtenidos con muestras provenientes de 2 donantes sanos y de dos pacientes tratados con VPA.

Estos resultados preliminares indican que pacientes epilépticos tratados con VPA poseen menores porcentajes de células NK en CMSP que donantes sanos. Además, células NK de pacientes tratados con VPA exhiben menor producción de IFN-γ , menor capacidad de degranulación y menor expresión de los receptores NKG2D y NKp46 que células NK de donantes sanos.

Discusión

Discusión

La evidencia acumulada a la fecha demuestra contundentemente que el sistema inmune juega un rol muy importante en el rechazo tumoral mediante el proceso conocido como inmunovigilancia contra el cáncer. Como se mencionara, los iHDAC han mostrado resultados promisorios en ensayos *in vitro* y también en ensayos clínicos. Sin embargo, no se ha estudiado en profundidad su impacto sobre el sistema inmune, sobre todo en células involucradas en la respuesta anti-tumoral. En pacientes con enfermedades neoplásicas malignas tratados con iHDAC, posibles efectos deletéreos tales como inhibición de las funciones efectoras de células de la inmunidad innata involucradas en la inmunovigilancia contra tumores (células NK), podrían predisponer al desarrollo de recidivas. Además, posibles efectos inhibitorios sobre CDs dificultarían el montaje de la respuesta inmune adaptativa impidiendo la activación de células T $CD8^+$ citotóxicas, las que también son claves en el rechazo tumoral y el control de recidivas.

Existen distintas publicaciones en las que se ha demostrado que el tratamiento con iHDAC (tales como VPA o TSA) de líneas celulares tumorales (K562, Jurkat, BALL1, Hep3B) o bien de cultivos de células tumorales obtenidas de pacientes con LMA o leucemia linfocítica aguda, indujo la expresión de NKG2DL haciendo a dichas células más susceptibles a la citotoxicidad mediada por células NK [243-245, 247]. Además, en una de estas publicaciones se demostró que el tratamiento de un cultivo primario de hepatocitos no indujo expresión de NKG2DL ni efectos tóxicos [243], demostrando la selectividad de los iHDAC sobre las células tumorales. También se ha demostrado que el tratamiento de pacientes con LMA con VPA indujo la expresión *in vivo* de NKG2DL en células leucémicas y que el co-cultivo *in vitro* de células provenientes de estos pacientes con células NK estimuló la degranulación de estas últimas [246]. Sin embargo, en todos los casos se trabajó con células NK aisladas de CMSP de donantes sanos, las cuales nunca habían sido expuestas a los iHDAC. Esto genera importantes interrogantes acerca de cuáles serían los resultados en un esquema experimental que se asemeje mas a la situación que se da en un paciente en el que ambas poblaciones celulares, tanto las células tumorales como las células NK, se encuentren expuestas a los iHDAC.

En estos últimos años, se han acumulado reportes en los que se demuestra que diversos iHDAC ejercen efectos sobre diferentes tipos celulares del sistema inmune. Esto se manifiesta en una actividad mayormente anti-inflamatoria por lo que se presenta una situación dual en cuanto a la

potencialidad terapéutica de los iHDAC en particular para el tratamiento de distintos tipos de cáncer, lo que los convierte en un “arma de doble filo”.

Se han reportado efectos de los iHDAC sobre macrófagos. Gabriec y colaboradores demostraron que el tratamiento con TSA o nicotinamida de macrófagos sinoviales provenientes de pacientes con artritis reumatoidea, inhibe la producción de IL-6 y de TNF-α, además de promover selectivamente su apoptosis [289]. En otro trabajo, los mismos autores demostraron que los iHDAC inhiben la producción de IL-6 estimulada por IL-1β, TNF-α y ligandos de TLR en macrófagos y sinoviocitos de pacientes con artritis reumatoidea, a través de la reducción de la estabilidad del ARNm de IL-6 [290]. Por otro lado, también se ha demostrado que los iHDAC inhiben la capacidad microbicida de los macrófagos[291] . El mecanismo molecular comprende la inhibición de la fagocitosis, la modulación negativa de la expresión de receptores fagocíticos y de NADPH oxidasa, lo que impide la generación de especies reactivas derivadas del oxígeno y del nitrógeno e inhibe la destrucción bacteriana.

Se ha demostrado que los iHDAC promueven el desarrollo de células T regulatorias (Tregs). En el trabajo de Tao y colaboradores se demuestra que la utilización de TSA en un modelo murino de colitis incrementa el número de células T regulatorias y aumenta su capacidad supresora, atenuando la severidad de la patología [292]. En subsecuentes estudios se demostró que en modelos murinos de lupus, de hipersensibilidad por contacto, de artritis inducida por colágeno, de colitis y de polineuropatías, la administración de iHDAC también incrementa el número de Tregs [293-297]. Por otra parte, la incubación de CMSP con IL-2, IL-15 e IL-1β promueve la diferenciación de Tregs $CD4^{+}CD25^{high}Foxp3^{+}CD127^{-}CD27^{+}$ hacia células Th17 y que la TSA inhibe esta diferenciación, lo que sugiere que los iHDAC no sólo promoverían el desarrollo de Tregs, sino que también evitarían su reprogramación a células Th17 que favorecen el desarrollo de patologías inflamatorias [298]. Estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la utilización de iHDAC podría ser beneficiosa para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas o bien como tratamiento post-trasplante. Sin embargo, al mismo tiempo el tratamiento prolongado con iHDAC podría incrementar la susceptibilidad a infecciones con distintos microorganismos debido a una hipotética debilitación del sistema inmune.

Desde el descubrimiento de que la expresión y funcionalidad de las HDAC se encuentra alterada en muchos tumores [165, 195, 197-204] y a partir de los hallazgos que indican que las mismas son relevantes en el desarrollo tumoral, ha surgido un interés particular en el desarrollo de inhibidores de HDAC para su aplicación en terapias anti-tumorales [209].

Las propiedades anti-tumorales de los iHDAC radican esencialmente en su actividad pro-apoptótica [209, 215-218], su capacidad de inducir el arresto del ciclo celular [229-231], sus propiedades anti-angiogénicas [234-239] y su actividad anti-metastásica [240, 241]. Curiosamente,

también se observó que los iHDAC poseen actividad inmunomodulatoria indirecta, haciendo a las células tumorales más susceptibles a la detección y destrucción por parte del sistema inmune. Entre las propiedades inmunomodulatorias, se destacan la capacidad de inducir la expresión de moléculas de clase I del CMH [242] haciendo a las células tumorales más inmunogénicas, como también la inducción de la expresión de NKG2DLs tales como MICA y MICB [243-247] o ULBPs [299]. La expresión aumentada de NKG2DLs "sensibilizaría" a las células tumorales a su destrucción por células del sistema inmune, en particular por células NK (que expresan el recetor NKG2D) [49, 74]. Además, los iHDAC poseen la capacidad de inducir la liberación de la proteína asociada a cromatina HMGB1 (que normalmente es liberada por células necróticas) por células apoptóticas, como consecuencia de la hiperacetilación inducida [300, 301]. Este fenómeno constituye un estímulo pro-inflamatorio que favorece la respuesta inmune anti-tumoral [302]. Los iHDAC también reducen la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF-α, IL-1β, IL-12 e IFN-γ producidas por CMSP en respuesta a una estimulación con lipopolisacárido (LPS) [303, 304]. Para ciertos tumores cuyo crecimiento depende de citoquinas pro-inflamatorias [305, 306], la actividad anti-inflamatoria de los iHDAC podría reducir la producción de tales citoquinas retrasando el crecimiento del tumor [292].

Los iHDAC han demostrado ser drogas bastante selectivas. Existen estudios *in vitro* que demuestran que células transformadas serían hasta 10 veces más sensibles que las células normales a los efectos de los iHDAC [213].

Sin embargo, la mayor parte de los experimentos de toxicidad o viabilidad celular que sustentan la selectividad de acción de los iHDAC sobre células tumorales fueron realizados comparando sus efectos sobre células tumorales con sus efectos sobre fibroblastos humanos [280, 307]. Sin embargo, se ha demostrado que los iHDAC afectan a tipos celulares involucrados en la respuesta inmune anti-tumoral, lo que podría atentar contra la efectividad de la misma. Sobre CDs, se ha demostrado que los iHDAC promueven una reducción en la capacidad de presentación antigénica de CDs murinas estimuladas con LPS. Los iHDAC afectan su maduración y reducen la expresión de marcadores de superficie (moléculas de clase II del CMH, CD80 y CD86) hasta niveles comparables a los de CD inmaduras, inhibiendo su capacidad de estimulación en el cultivo mixto linfocitario. Esto último se traduce en una menor producción de IL-2 por células T [308]. En otro estudio se ha demostrado que los iHDAC llevan a un aumento en la expresión de Indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) mediado por pSTAT3 y la consecuente regulación negativa de las funciones de las CD (una menor producción de TNF y una menor capacidad de estimulación en el cultivo mixto linfocitario) [309]. Asimismo, Song W. y colaboradores demostraron que el iHDAC LBH589 afecta negativamente la maduración de CD mieloides humanas a través de TLR-4, la expresión de moléculas coestimulatorias (CD80, CD86 y CD40) y la producción de las citoquinas IL-6, IL-10, IL-12p70 e IL-23 a través de TLR-3 en [310]. También se ha demostrado que el NaB bloquea la generación de CDs a

partir de precursores de médula ósea a través de la inhibición de la expresión de los ARNm de los factores de transcripción Rel B y PU.1 [311].

Por otro lado, sabemos desde hace un tiempo que las células mieloides supresoras (MDSC) se expanden durante el crecimiento tumoral y facilitan el desarrollo de tumores, siendo reclutadas al foco tumoral e inhibiendo la respuesta anti-tumoral mediada por células T [312]. Rosborough y colaboradores demostraron recientemente que los iHDAC promueven la expansión de MDSC *in vitro* e *in vivo* mediada por GM-CSF [313], por lo que ciertos iHDAC exhiben efectos pro-tumorales.

Asimismo, la capacidad de los iHDAC de favorecer el desarrollo de Tregs y de incrementar su actividad supresora también atenta contra la respuesta inmune anti-tumoral

Los iHDAC también suprimen la producción de citoquinas pro-inflamatorias por células T $CD4^+$ e inducen su apoptosis [314]. Además, se ha demostrado que el NaB induce anergia en células T $CD4^+$ a través de la inducción de $p21^{Cip1}$ [315].

Por último y como se mencionó anteriormente, las células NK juegan un papel muy importante en el rechazo tumoral mediante la producción de IFN-γ y su actividad citotóxica. Ogbomo y colaboradores demostraron que el tratamiento con SAHA o VPA inhibe la capacidad citotóxica de las células NK estimuladas con IL-2, mediante una modulación negativa de los receptores activadores NKp30 y NKp46, y a través de la inhibición de la activación de NF-κB [316].

De las evidencias acumuladas, podemos concluir que a pesar de que los iHDAC pueden incrementar la inmunogenicidad de los tumores, es evidente que presentan efectos anti-inflamatorios e inmunosupresores tanto sobre células de la inmunidad innata como sobre células de la inmunidad adaptativa, lo que podría atentar contra su eficacia terapéutica en pacientes oncológicos. A la luz de estos descubrimientos, se están desarrollando terapias combinadas de iHDAC e inmunoterapias contra el cáncer [317, 318]. Un esquema terapéutico de estas características permite atacar al tumor con los iHDAC compensando su actividad deletérea sobre el sistema inmune mediante la inmunoterapia, con el fin de mejorar la respuesta inmune anti-tumoral. Por ejemplo, es posible imaginar que la combinación de iHDAC con citoquinas que promueven la expansión y función de células T constituya una estrategia adecuada. Kato y colaboradores demostraron que en un modelo de carcinoma renal, la administración conjunta de IL-2 y MS-275 (una benzamida que actúa específicamente sobre las HDAC de clase I) devino en un mayor rechazo del tumor que los tratamientos individuales y que la respuesta inmune anti-tumoral montada era dependiente de LT $CD8^+$ [319]. En este modelo, la administración de IL-2 recombinante logra superar la represión de la expresión del gen de IL-2 mediada por iHDAC. Asimismo, líneas celulares de carcinoma renal también son susceptibles al tratamiento combinado de iHDAC e IFN-α [320].

Muchos tumores expresan bajos niveles del receptor para TRAIL, lo cual los hace resistentes a terapias que apunten a la inducción de apoptosis mediante la administración de agonistas de dicho

receptor. Como se explicó anteriormente, una de las vías mediante las cuales los iHDAC inducen apoptosis en células tumorales es a través de la activación de la expresión de varios miembros de la superfamilia de receptores TNF y sus ligandos [215, 216]. Se han logrado resultados promisorios combinando iHDAC (que incrementan la expresión del receptor para TRAIL) con agonistas de ese receptor [321, 322]. En otro estudio se ha demostrado que esta terapia combinada hace a la célula tumoral más susceptible a la apoptosis debido a la modulación negativa que los iHDAC ejercen sobre la expresión de FLIP , una proteína inhibidora de la apoptosis inducida por TRAIL [323].

En el presente trabajo de tesis, confirmamos que los iHDAC poseen capacidad de inducir la expresión de NKG2DLs ya que observamos que la TSA indujo una expresión aumentada de MICA/B y ULBP-2, la que fue coincidente con un aumento en la expresión de ARNm de MICA y ULBP-2.

Sin embargo, en el contexto de una terapia anti-tumoral basada en el empleo de iHDAC, tanto las células tumorales como las células del sistema inmune se encuentran expuestas a la droga. Además, no existen estudios sobre los efectos de la exposición de células del sistema inmune a los iHDAC en pacientes tratados. Consecuentemente y considerando que las células NK son una de las poblaciones celulares más importantes en la inmunovigilancia y el rechazo de tumores, analizamos el impacto de tres iHDAC de distinto espectro de acción sobre las funciones efectoras de las células NK. Una de las funciones más importantes de las células NK es la producción de IFN-γ en respuesta a citoquinas y células tumorales. Nosotros demostramos que los iHDAC TSA, VPA y NaB inhibieron drásticamente la producción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18 o con la línea celular K562. Esta inhibición se manifestó en ambas subpoblaciones ($CD56^{dim}$ y $CD56^{bright}$), demostrando que no existe un efecto diferencial. La TSA también inhibió la capacidad de degranulación de células NK y los tres iHDAC utilizados (TSA, VPA y NaB) inhibieron significativamente la citotoxicidad de las células NK contra la línea celular K562, lo que demuestra que estos compuestos inhiben fuertemente las funciones efectoras más importantes de las células NK cuando reciben señales de activación a través de receptores de citoquinas y de receptores activadores involucrados en el reconocimiento de células tumorales.

El análisis de los mecanismos involucrados permitió demostrar que si bien los iHDAC indujeron niveles significativos de apoptosis tanto en células NK en reposo como estimuladas con citoquinas y que estas fueron más susceptibles a los efectos tóxicos de los iHDAC que células T $CD4^+$, los niveles de apoptosis observados en células NK no serían suficientes para explicar una inhibición tan dramática de sus funciones efectoras debido a que la gran mayoría de las células NK permaneció viable luego del tratamiento con los iHDAC pero fue incapaz de secretar IFN-γ o de ejercer funciones citotóxicas. Por ello, especulamos que los iHDAC deben ejercer otros efectos supresores sobre las células NK, más allá de la inducción de apoptosis.

Entre los receptores que regulan la fisiología de las células NK, se encuentran los receptores para citoquinas tales como IL-12R, IL-15R e IL-18R. Una de las vías transduccionales más importantes disparadas por IL-12, IL-15 e IL-18 es la activación del factor de transcripción NF-κB [285-287]. Observamos que aunque la TSA no afectó las etapas proximales de la cascada de señalización de IL-12 (pSTAT4), una de las vías afectadas por los iHDAC luego de la estimulación con citoquinas fue la translocación de la subunidad p50 de NF-κB al núcleo. Estos resultados son coincidentes con resultados reportados en otras publicaciones que describen un efecto inhibitorio rápido de los iHDAC sobre NF-κB [324-326]. Consecuentemente, investigamos si los iHDAC también modulaban la expresión de los receptores de las citoquinas en cuestión. Luego del tratamiento con TSA, también observamos menores niveles de ARNm de los receptores IL-12Rβ1, IL-15Rβ, IL-2Rγ (γ_c) e IL-18R, lo que explica parte de los efectos supresores de los iHDAC sobre las células NK.

Otro conjunto de receptores importantes que se expresan mayoritariamente en células NK son los llamados receptores activadores, que reconocen moléculas asociadas a membrana celular y que están involucrados principalmente en el reconocimiento de células tumorales [85, 327, 328]. Existen publicaciones en las que se observó que la formación de tumores y la progresión tumoral están incrementados en animales *knock out* para los receptores NKG2D y NKp46 [110, 112, 113]. Asimismo, el bloqueo *in vivo* del receptor NKG2D mediante AcMo promueve la formación de sarcomas inducidos por MCA [111], lo cual demuestra la importancia de estos receptores en la respuesta anti-tumoral mediada por células NK. Debido a que observamos que los iHDAC inhibieron drásticamente la citotoxicidad de células NK contra la línea celular K562, investigamos si el fenómeno observado podría deberse a un efecto sobre la expresión de los receptores activadores de células NK. Nos centramos en el estudio de NKG2D (que está involucrado en la respuesta citotóxica contra K562 [329]), los NCRs y los receptores DNAM-1 y 2B4. Observamos que los iHDAC modularon negativamente la expresión de NKG2D y NKp46 en células NK en reposo y de NKG2D, NKp44 y NKp46 en células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18. También observamos modulación negativa en la expresión de los receptores DNAM-1 y 2B4 pero solo luego del tratamiento con TSA. El trabajo publicado por Ogbomo y colaboradores demuestra que los iHDAC SAHA (un inhibidor de amplio espectro, estructuralmente similar a la TSA) y VPA modularon negativamente la expresión de los receptores NKp30 y NKp46 como también la translocación al núcleo del factor de transcripción NF-κB en células NK estimuladas con IL-2 [316]. Nosotros no observamos modulación en la expresión del receptor NKp30, lo cual podría deberse a que los estímulos utilizados para las células NK fueron distintos (Ogbomo y colaboradores utilizaron IL-2 durante 4 días mientras que nosotros incubamos las células NK en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18). La reducción en la expresión de los receptores NKG2D y NKp46 observada en nuestro trabajo fue biológicamente relevante, dado que células NK

tratadas con iHDAC exhibieron una menor actividad citotóxica frente a la línea P815 en ensayos de citotoxicidad redirigida.

En el contexto de una quimioterapia contra el cáncer, se busca mantener una dosis de la droga en sangre dentro de ciertos límites, lo cual implica que las células del sistema inmune están crónicamente expuestas a estas drogas. En nuestro trabajo observamos que el efecto inhibitorio de los iHDAC (particularmente de la TSA) sobre las células NK fue duradero hasta unas 48 hs luego de remover la droga. No obstante, el efecto fue reversible a tiempos más largos ya que las células NK recuperaron gradualmente su capacidad de producir IFN-γ y la expresión de NKG2D y NKp46, alcanzando los niveles de expresión de células NK no expuesta a la TSA luego de 48 a 72 h de cultivo.

En nuestro trabajo decidimos utilizar las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 como estímulo para las células NK ya que estas son producidas por CDs en condiciones fisiológicas y la estimulación con dichas citoquinas representaría una situación más fisiológica que la estimulación con IL-2 empleada por otros autores [316]. Por otra parte, la estimulación con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 durante e 18 a 24 h genera células NK en proceso de activación, pero una activación completa se logra luego de 3 o 4 días de estímulo [330]. Por ello, también investigamos el efecto de los iHDAC sobre células NK activadas (estimuladas durante 4 días con IL-12, IL-15 e IL-18), en las que observamos que la TSA también moduló negativamente la expresión de los receptores NKG2D, NKp44 y NKp46 y la expresión de CD25. Este efecto sobre CD25 fue funcionalmente relevante, ya que células NK activadas, expuestas a la TSA y re-estimuladas con IL-2 produjeron menores niveles de IFN-γ que células NK que no habían sido expuestas a TSA.

Con el objeto de validar nuestros resultados en un modelo *in vivo*, trabajamos con animales de la cepa C57BL/6, los cuales fueron tratados con TSA durante 4 días. Observamos que células NK provenientes de estos animales, expresaron menores niveles de los receptores activadores NK1.1, NKG2D y NKp46. Estas células NK, al ser estimuladas *ex vivo* con las citoquinas IL-12, IL-15 y IL-18 produjeron menores niveles de IFN-γ en comparación a células NK de animales control (no tratados con TSA). Aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, creemos que estos resultados muestran una tendencia interesante. Además, cuando las células NK de animales tratados fueron incubadas *in vitro* durante 4 días en presencia de estas citoquinas, recuperaron su capacidad de producir IFN-γ.

Como se ha mencionado antes, muchos iHDAC se encuentran actualmente en ensayos clínicos [264, 265] y específicamente el SAHA o Vorinostat y el FK228 o Romidepsina ya fueron aprobados por la FDA y son utilizados para el tratamiento de pacientes con linfoma T cutáneo [267, 269, 270]. Analizamos la posibilidad de estudiar el impacto del SAHA sobre células NK de pacientes con linfoma T cutáneo que se encontraran en tratamiento con esta droga, pero nos encontramos con

la dificultad de que la incidencia de esta patología es muy baja en nuestro país lo cual complica la obtención de muestras. Además, trabajar con ese sistema experimental es conceptualmente cuestionable, dado que las células NK se encuentran expuestas tanto a la droga como al tumor y existen evidencias experimentales que demuestra que los tumores poseen estrategias de evasión de la respuesta inmune que afectan directamente a la funcionalidad de las células encargadas de la inmunovigilancia, entre las que se encuentran las células NK [39]. Por lo tanto, si se observaran efectos sobre la funcionalidad de las células NK no sabríamos si los mismos se deberían a los iHDAC o al tumor.

Curiosamente, hace ya más de 10 años que el VPA también se aplica para el tratamiento de pacientes epilépticos [273-279]. Aunque se ha reportado que su empleo posee efectos adversos mínimos en pacientes [331], existen reportes en los que se demuestra una mayor incidencia de tumores, leucemias [332-334] y de síndrome de ovario poliquístico [335] en pacientes tratados con VPA en forma crónica respecto de individuos que no se encuentran medicados con esta droga. En este contexto, resultó atractiva la posibilidad de trabajar con muestras de pacientes epilépticos tratados con VPA con el fin de estudiar su impacto *in vivo* sobre células NK humanas. A diferencia de lo que podrían ser pacientes con linfoma T cutáneo tratados con SAHA, pacientes sin una enfermedad neoplásica declarada tal como pacientes epilépticos tratados con VPA resultan sumamente útiles para nuestro estudio, dado que su sistema inmune, y en particular las células NK, se encuentran expuestas a la droga únicamente y no a mecanismos de escape montados por el tumor que puedan afectar su funcionalidad. Con esta idea en mente, nos contactamos e iniciamos una colaboración con el Departamento de Epilepsia del Instituto FLENI, con quienes se redactó un protocolo para obtener y trabajar con muestras de sangre de paciente epilépticos que se encontraran en tratamiento con VPA (se estableció como uno de los criterios de inclusión una dosis mínima de ingesta de 500 mg diarios) con el fin de estudiar el impacto *in vivo* de esta droga en humanos. Una vez obtenida la aprobación de los comités de ética de ambos institutos, comenzamos con esta investigación, la que actualmente continúa.

Los resultados preliminares obtenidos demostraron un menor porcentaje de células NK totales en CMSP de pacientes tratados con VPA que en CMSP de donantes sanos. Asimismo, observamos un menor porcentaje de células $CD56^{dim}$ pero no de células $CD56^{bright}$ en pacientes tratados con VPA respecto de donantes sanos. También encontramos una tendencia a una menor expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp46 y DNAM-1 en células NK de pacientes tratados respecto de donantes sanos, menores porcentajes de células NK productoras de IFN-γ (tanto en la subpoblación $CD56^{dim}$ como en la $CD56^{bright}$) en pacientes tratados con VPA luego de una estimulación *in vitro* con IL-12, IL-15 e IL-18 y también un menor porcentaje de células NK $CD107a^{+}$ luego de su estimulación con la línea celular K562. Estos resultados, aunque preliminares (ya que

llevamos acumulados datos de pocos pacientes), parecen indicar una tendencia a una función deficiente de células NK en individuos que se encuentran tratados con VPA, probablemente debido la existencia de un menor porcentaje de células NK en CMSP, a una menor capacidad de respuesta a citoquinas y células tumorales y a una modulación negativa de los receptores activadores. Este fenotipo conduciría a un estado de inmunovigilancia deficiente que podría facilitar el desarrollo de enfermedades neoplásicas a lo largo de los años.

Nuestros resultados podrían, además, tener importantes consecuencias translacionales ya que la evaluación de la expresión de receptores activadores de células NK (específicamente NKG2D y NKp46) y de sus funciones efectoras (producción de IFN-γ y degranulación) podrían constituir nuevos biomarcadores útiles con el fin de monitorear el estado de inmunovigilancia de pacientes que estén siendo medicados con iHDAC o con otras drogas, o en individuos que forman parte de ensayos clínicos con nuevos fármacos. Esta idea se ve reforzada por el hecho de que un sistema inmune íntegro es necesario no sólo para montar una respuesta inmune adecuada frente a un tumor sino también para prevenir la formación de nuevos tumores y evitar la formación de metástasis o recidivas en respuesta al tratamiento [336].

En resumen, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis contribuyen a un mejor entendimiento del impacto de los iHDAC sobre las funciones de las células NK y demuestran la potencial importancia de identificar posibles mecanismos que atenten contra la efectividad terapéutica de estas drogas, lo que permitirá más a largo plazo la optimización y desarrollo de nuevas estrategias de abordaje clínico con una eficacia terapéutica superior.

Conclusiones

Conclusiones

En esta tesis doctoral hemos demostrado que:

- Los iHDAC inhiben la producción de IFN-γ, la degranulación y la actividad citotóxica de células NK humanas.

- El efecto inhibitorio de los iHDAC sobre la funcionalidad de células NK se debe a una inducción parcial de apoptosis, una inhibición de la translocación de NF-κB al núcleo y una modulación negativa en la expresión de receptores para citoquinas y receptores activadores.

- El efecto inhibitorio de la TSA sobre la producción de IFN-γ y la expresión de los receptores activadores NKG2D y NKp46 es reversible

- La TSA modula negativamente la expresión de receptores activadores también en células NK activadas.

- Otro de los efectos de la TSA es la modulación negativa de la expresión de CD25 en células NK activadas, lo que tiene consecuencias funcionales ya que este efecto se traduce en una menor capacidad de respuesta a IL-2.

- La inhibición de la expresión de NKG2D y NKp46 por efecto de los iHDAC compromete la capacidad citotóxica de células NK mediada a través de estos receptores.

- Los iHDAC inhiben la producción de IFN-γ por células NK murinas *in vitro* y el tratamiento *in vivo* con TSA modula negativamente la expresión de receptores activadores de células NK murinas y parece inhibir la producción de IFN-γ.

- Pacientes epilépticos tratados con VPA poseen menores porcentajes de células NK en CMSP que donantes sanos. Además, células NK de pacientes tratados con VPA exhiben menor producción de IFN-γ , menor capacidad de degranulación y menor expresión de los receptores NKG2D y NKp46 que células NK de donantes sanos.

- Nuestros resultados demuestran que los iHDAC ejercen efectos deletéreos sobre las funciones efectoras de células NK. Por lo tanto, la administración a largo plazo de iHDAC en pacientes humanos podría comprometer su capacidad de inmunovigilancia, predisponiendo a la aparición de recidivas, otros tumores primarios y/o metástasis.

Bibliografía

Bibliografía

1. Shibuya, A., et al., *Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells.* Blood, 1995. **85**(12): p. 3538-46.
2. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-640.
3. Dorshkind, K., et al., *Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid).* J Immunol, 1985. **134**(6): p. 3798-801.
4. Sanchez, M.J., et al., *Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus.* J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 569-76.
5. Gascoyne, D.M., et al., *The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development.* Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1118-24.
6. Di Santo, J.P., *A defining factor for natural killer cell development.* Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1051-2.
7. Zijlstra, M., et al., *Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice.* J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 885-93.
8. Routes, J.M., *IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing.* J Immunol, 1992. **149**(7): p. 2372-7.
9. Caligiuri, M.A., et al., *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors.* J Exp Med, 1990. **171**(5): p. 1509-26.
10. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.* Immunological Reviews, 2006. **214**(1): p. 73-91.
11. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.
12. Walzer, T., et al., *Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(3): p. 365-372.
13. Newman, K.C. and E.M. Riley, *Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(4): p. 279-91.
14. Welte, S., et al., *Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction.* Nat Immunol, 2006. **7**(12): p. 1334-42.
15. Gerosa, F., et al., *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 327-333.
16. Piccioli, D., et al., *Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 335-41.
17. Andrews, D.M., et al., *Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection.* Mol Immunol, 2005. **42**(4): p. 547-55.
18. Ghiringhelli, F., et al., *Links between innate and cognate tumor immunity.* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 224-31.
19. Cooper, M.A., et al., *NK cell and DC interactions.* Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 47-52.
20. Ferlazzo, G., et al., *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16606-11.
21. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming.* Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
22. Walzer, T., et al., *Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force".* Blood, 2005. **106**(7): p. 2252-8.
23. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.* Immunity, 2007. **26**(4): p. 503-517.
24. Mullen, A.C., et al., *Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.* Science, 2001. **292**(5523): p. 1907-10.
25. Lanier, L.L., *NK cell recognition.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 225-74.
26. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells.* J Leukoc Biol, 2002. **71**(2): p. 173-183.
27. Ferlazzo, G., et al., *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16606-16611.

28. De Maria, A., et al., *Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(2): p. 728-32.
29. Ferlazzo, G., et al., *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs.* Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**(47): p. 16606-16611.
30. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?* Eur J Immunol, 2009. **39**(8): p. 2059-64.
31. O'Leary, J.G., et al., *T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells.* Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 507-16.
32. Sun, J.C., J.N. Beilke, and L.L. Lanier, *Adaptive immune features of natural killer cells.* Nature, 2009. **457**(7229): p. 557-561.
33. Cooper, M.A., et al., *Cytokine-induced memory-like natural killer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(6): p. 1915-9.
34. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cells, viruses and cancer.* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 41-49.
35. Moser, J.M., A.M. Byers, and A.E. Lukacher, *NK cell receptors in antiviral immunity.* Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 509-16.
36. Long, E.O., *Regulation of immune responses through inhibitory receptors.* Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 875-904.
37. Moretta, A., et al., *Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis.* Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 197-223.
38. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors.* Science, 2000. **290**(5489): p. 84-9.
39. Rabinovich, G.A., E. Sotomayor, and D. Gabrilovich, *Immunosuppressive Strategies that Are Mediated by Tumor Cells.* Annu Rev Immunol, 2007. **25**(1): p. 267-296.
40. Zwirner, N.W., et al., *Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 159-170.
41. Trowsdale, J., *Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes.* Immunity, 2001. **15**(3): p. 363-374.
42. Natarajan, K., et al., *Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 853-85.
43. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 217-51.
44. Faure, M. and E.O. Long, *KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential.* J Immunol, 2002. **168**(12): p. 6208-14.
45. Winter, C.C., et al., *Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.* J Immunol, 1998. **161**(2): p. 571-7.
46. Long, E.O., *Tumor cell recognition by natural killer cells.* Semin Cancer Biol, 2002. **12**(1): p. 57-61.
47. Bakker, A.B., et al., *NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals.* Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 18-27.
48. Glienke, J., et al., *The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex.* Immunogenetics, 1998. **48**(3): p. 163-73.
49. Houchins, J.P., et al., *DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells.* J Exp Med, 1991. **173**(4): p. 1017-20.
50. Borrego, F., et al., *The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance.* Immunol Res, 2006. **35**(3): p. 263-78.
51. Lanier, L.L., et al., *Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors.* Immunity, 1998. **8**(6): p. 693-701.
52. Lanier, L.L., et al., *Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells.* Nature, 1998. **391**(6668): p. 703-7.
53. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.* Nature, 1998. **391**(6669): p. 795-9.
54. Braud, V.M., et al., *TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide.* Curr Biol, 1998. **8**(1): p. 1-10.
55. Spruyt, L.L., et al., *Signal transduction by the CD2 antigen in T cells and natural killer cells: requirement for expression of a functional T cell receptor or binding of antibody Fc to the Fc receptor, Fc gamma RIIIA (CD16).* J Exp Med, 1991. **174**(6): p. 1407-15.

56. Sivori, S., et al., *2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation.* Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 787-93.
57. Bouchon, A., et al., *Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family.* J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5517-21.
58. Bottino, C., et al., *NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease.* J Exp Med, 2001. **194**(3): p. 235-46.
59. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes.* Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
60. Vitale, M., et al., *Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells.* Eur J Immunol, 2001. **31**(1): p. 233-42.
61. Upshaw, J.L. and P.J. Leibson, *NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes.* Semin Immunol, 2006. **18**(3): p. 167-75.
62. Bryceson, Y.T., et al., *Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.* Blood, 2006. **107**(1): p. 159-166.
63. Fischer, L., et al., *The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells.* Experimental Hematology, 2006. **34**(6): p. 753-759.
64. Maddocks, K.J. and T.S. Lin, *Update in the management of chronic lymphocytic leukemia.* J Hematol Oncol, 2009. **2**: p. 29.
65. Pessino, A., 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): p. 953-60.
66. Cantoni, C., et al., *NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily.* J Exp Med, 1999. **189**(5): p. 787-796.
67. Pende, D., 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): p. 1505-1516.
68. Arnon, T.I., et al., *Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30.* Eur J Immunol, 2001. **31**(9): p. 2680-9.
69. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells.* Nature, 2001. **409**(6823): p. 1055-60.
70. Ferlazzo, G., et al., *Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells.* J Exp Med, 2002. **195**(3): p. 343-351.
71. Byrd, A., et al., *Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44.* PLoS One, 2007. **2**(12): p. e1339.
72. Hershkovitz, O., et al., *Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44.* Biochemistry, 2007. **46**(25): p. 7426-36.
73. Bloushtain, N., et al., *Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46.* J Immunol, 2004. **173**(4): p. 2392-401.
74. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. **285**(5428): p. 727-729.
75. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* Science, 1999. **285**(5428): p. 730-732.
76. Diefenbach, A., et al., *Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D.* Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1142-1149.
77. Chang, C., et al., *Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties.* J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4651-4.
78. Roberts, A.I., et al., *NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment.* J Immunol, 2001. **167**(10): p. 5527-5530.
79. Ho, E.L., et al., *Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): p. 6320-5.
80. Long, E.O., *Versatile signaling through NKG2D.* Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1119-20.
81. Gilfillan, S., et al., *NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation.* Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1150-1155.
82. Campbell, J.J., et al., *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire.* J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6477-82.

83. Hart, O.M., et al., *TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production.* J Immunol, 2005. **175**(3): p. 1636-42.
84. Sivori, S., et al., *CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(27): p. 10116-21.
85. Zwirner, N.W. and C.I. Domaica, *Cytokine regulation of natural killer cell effector functions.* Biofactors, 2010. **36**(4): p. 274-88.
86. Fehniger, T.A., et al., *Potential mechanisms of human natural killer cell expansion in vivo during low-dose IL-2 therapy.* J Clin Invest, 2000. **106**(1): p. 117-24.
87. Biron, C.A., H.A. Young, and M.T. Kasaian, *Interleukin 2-induced proliferation of murine natural killer cells in vivo.* J Exp Med, 1990. **171**(1): p. 173-88.
88. Wang, K.S., D.A. Frank, and J. Ritz, *Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4.* Blood, 2000. **95**(10): p. 3183-90.
89. Cooper, M.A., et al., *In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells.* Blood, 2002. **100**(10): p. 3633-8.
90. Carson, W.E., et al., *A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival.* J Clin Invest, 1997. **99**(5): p. 937-43.
91. Warren, H.S., et al., *Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells.* J Immunol, 1996. **156**(9): p. 3254-9.
92. Becknell, B. and M.A. Caligiuri, *Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells.* Adv Immunol, 2005. **86**: p. 209-39.
93. Kodama, T., et al., *Perforin-dependent NK cell cytotoxicity is sufficient for anti-metastatic effect of IL-12.* Eur J Immunol, 1999. **29**(4): p. 1390-6.
94. Orange, J.S., et al., *Requirement for natural killer cell-produced interferon gamma in defense against murine cytomegalovirus infection and enhancement of this defense pathway by interleukin 12 administration.* J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1045-56.
95. Loza, M.J. and B. Perussia, *The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions.* J Immunol, 2004. **172**(1): p. 88-96.
96. Mailliard, R.B., et al., *IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells.* J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 941-53.
97. Girart, M.V., et al., *Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12.* J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3472-9.
98. Peritt, D., et al., *Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets.* J Immunol, 1998. **161**(11): p. 5821-4.
99. Deniz, G., et al., *Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells.* Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 879-84.
100. Bellone, G., et al., *Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1.* J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1066-73.
101. Ortaldo, J.R., et al., *Mechanistic studies of transforming growth factor-beta inhibition of IL-2-dependent activation of CD3- large granular lymphocyte functions. Regulation of IL-2R beta (p75) signal transduction.* J Immunol, 1991. **146**(11): p. 3791-8.
102. Tripp, C.S., S.F. Wolf, and E.R. Unanue, *Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(8): p. 3725-9.
103. Huntington, N.D., C.A. Vosshenrich, and J.P. Di Santo, *Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 703-14.
104. Rosmaraki, E.E., et al., *Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow.* Eur J Immunol, 2001. **31**(6): p. 1900-9.
105. Takei, F., et al., *Ly49 and CD94/NKG2: developmentally regulated expression and evolution.* Immunol Rev, 2001. **181**: p. 90-103.
106. Nakamura, M.C. and W.E. Seaman, *Ligand interactions by activating and inhibitory Ly-49 receptors.* Immunol Rev, 2001. **181**: p. 138-48.
107. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.* Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
108. Yokoyama, W.M. and S. Kim, *How do natural killer cells find self to achieve tolerance?* Immunity, 2006. **24**(3): p. 249-57.

109. Di Santo, J.P., *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance.* Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 257-86.
110. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy.* Immunity, 2008. **28**(4): p. 571-80.
111. Smyth, M.J., et al., *NKG2D function protects the host from tumor initiation.* J Exp Med, 2005. **202**(5): p. 583-8.
112. Elboim, M., et al., *Tumor immunoediting by NKp46.* J Immunol, 2010. **184**(10): p. 5637-44.
113. Halfteck, G.G., et al., *Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1.* J Immunol, 2009. **182**(4): p. 2221-30.
114. Diefenbach, A., et al., *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.* Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 119-126.
115. Carayannopoulos, L.N., et al., *Murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4079-4083.
116. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.* Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-133.
117. Sutherland, C.L., et al., *UL16-Binding Proteins, Novel MHC Class I-Related Proteins, Bind to NKG2D and Activate Multiple Signaling Pathways in Primary NK Cells.* J Immunol, 2002. **168**(2): p. 671-679.
118. Cao, W., et al., *RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits NKG2D-mediated NK Cytotoxicity*, in *J Biol Chem*. 2007. p. 18922-18928.
119. Bacon, L., et al., *Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D.* J Immunol, 2004. **173**: p. 1078-1084.
120. Eagle, R.A. and J. Trowsdale, *Promiscuity and the single receptor: NKG2D.* Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 737-744.
121. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer.* Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
122. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
123. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack.* J Leukoc Biol, 2002. **71**(6): p. 907-20.
124. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.* Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-998.
125. Shankaran, V., et al., *IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.* Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
126. Bromberg, J.F., et al., *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): p. 7673-8.
127. Ikeda, H., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting.* Cytokine Growth Factor Rev, 2002. **13**(2): p. 95-109.
128. Strieter, R.M., et al., *Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis.* Biochem Biophys Res Commun, 1995. **210**(1): p. 51-7.
129. Farber, J.M., *Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.* J Leukoc Biol, 1997. **61**(3): p. 246-57.
130. Gasperini, S., et al., *Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils.* J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4928-37.
131. Chavez-Galan, L., et al., *Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes.* Cell Mol Immunol, 2009. **6**(1): p. 15-25.
132. Panaretakis, T., et al., *Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death.* EMBO J, 2009. **28**(5): p. 578-90.
133. Green, D.R., et al., *Immunogenic and tolerogenic cell death.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 353-63.
134. Kepp, O., et al., *Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment.* Apoptosis, 2009. **14**(4): p. 364-75.
135. Restifo, N.P., et al., *Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis.* Semin Cancer Biol, 2002. **12**(1): p. 81-86.
136. Koebel, C.M., et al., *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.* Nature, 2007. **450**(7171): p. 903-907.
137. Maccalli, C., et al., *NKG2D-mediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific T-cell clones isolated from melanoma patients.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(24): p. 7459-7468.

138. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.* Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-738.
139. Salih, H.R., H.-G. Rammensee, and A. Steinle, *Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding.* J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-4102.
140. Kaiser, B.K., et al., *Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands.* Nature, 2007. **447**(7143): p. 482-486.
141. Wahl, S.M., J. Wen, and N. Moutsopoulos, *TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege.* Immunol Rev, 2006. **213**: p. 213-27.
142. Friese, M.A., et al., *RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo.* Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7596-7603.
143. Ghiringhelli, F., 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): p. 1075-1085.
144. Friese, M.A., et al., *RNA Interference Targeting Transforming Growth Factor-{beta} Enhances NKG2D-Mediated Antiglioma Immune Response, Inhibits Glioma Cell Migration and Invasiveness, and Abrogates Tumorigenicity In vivo.* Cancer Res, 2004. **64**(20): p. 7596-7603.
145. Castriconi, R., et al., *Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells.* Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(7): p. 4120-4125.
146. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer.* J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1582-1587.
147. Lee, J.C., et al., *Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients.* J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7335-7340.
148. Fuertes, M.B., 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): p. 4606-4614.
149. Toscano, M.A., et al., *Differential glycosylation of T(H)1, T(H)2 and T(H)-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death.* Nat Immunol, 2007. **8**(8): p. 825-834.
150. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.* Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 361-70.
151. Veugelers, K., et al., *Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 623-33.
152. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
153. Hersey, P. and X.D. Zhang, *HOW MELANOMA CELLS EVADE TRAIL-INDUCED APOPTOSIS.* Nature Reviews Cancer, 2001. **1**(2): p. 142-150.
154. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming.* Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-1265.
155. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation.* Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
156. Craig, J.M. and W.A. Bickmore, *The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes.* Nat Genet, 1994. **7**(3): p. 376-82.
157. Falls, J.G., et al., *Genomic imprinting: implications for human disease.* Am J Pathol, 1999. **154**(3): p. 635-47.
158. Huynh, K.D. and J.T. Lee, *X-chromosome inactivation: a hypothesis linking ontogeny and phylogeny.* Nat Rev Genet, 2005. **6**(5): p. 410-8.
159. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer.* Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
160. Eden, A., et al., *Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation.* Science, 2003. **300**(5618): p. 455.
161. Gaudet, F., et al., *Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation.* Science, 2003. **300**(5618): p. 489-92.
162. Kouzarides, T., *SnapShot: Histone-modifying enzymes.* Cell, 2007. **131**(4): p. 822.
163. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function.* Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
164. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications.* Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
165. Witt, O., et al., *HDAC family: What are the cancer relevant targets?* Cancer Lett, 2009. **277**(1): p. 8-21.

166. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.* Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
167. Gregoretti, I.V., Y.M. Lee, and H.V. Goodson, *Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis.* J Mol Biol, 2004. **338**(1): p. 17-31.
168. Buchwald, M., O.H. Kramer, and T. Heinzel, *HDACi--targets beyond chromatin.* Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 160-7.
169. Yang, X.J. and E. Seto, *The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(3): p. 206-18.
170. Li, A.G., et al., *An acetylation switch in p53 mediates holo-TFIID recruitment.* Mol Cell, 2007. **28**(3): p. 408-21.
171. Tang, Y., et al., *Acetylation is indispensable for p53 activation.* Cell, 2008. **133**(4): p. 612-26.
172. Mujtaba, S., et al., *Structural mechanism of the bromodomain of the coactivator CBP in p53 transcriptional activation.* Mol Cell, 2004. **13**(2): p. 251-63.
173. Kiernan, R., et al., *Post-activation turn-off of NF-kappa B-dependent transcription is regulated by acetylation of p65.* J Biol Chem, 2003. **278**(4): p. 2758-66.
174. Ray, S., et al., *Requirement of histone deacetylase1 (HDAC1) in signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) nucleocytoplasmic distribution.* Nucleic Acids Res, 2008. **36**(13): p. 4510-20.
175. Yuan, Z.L., et al., *Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue.* Science, 2005. **307**(5707): p. 269-73.
176. Nusinzon, I. and C.M. Horvath, *Interferon-stimulated transcription and innate antiviral immunity require deacetylase activity and histone deacetylase 1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(25): p. 14742-7.
177. Bowman, T., et al., *STATs in oncogenesis.* Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2474-88.
178. Bromberg, J.F. and J.E. Darnell, Jr., *Potential roles of Stat1 and Stat3 in cellular transformation.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1999. **64**: p. 425-8.
179. Battle, T.E. and D.A. Frank, *The role of STATs in apoptosis.* Curr Mol Med, 2002. **2**(4): p. 381-92.
180. Kramer, O.H., et al., *Acetylation of Stat1 modulates NF-kappaB activity.* Genes Dev, 2006. **20**(4): p. 473-85.
181. Kim, H.S. and M.S. Lee, *STAT1 as a key modulator of cell death.* Cell Signal, 2007. **19**(3): p. 454-65.
182. Haura, E.B., J. Turkson, and R. Jove, *Mechanisms of disease: Insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer.* Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(6): p. 315-24.
183. Klampfer, L., et al., *Requirement of histone deacetylase activity for signaling by STAT1.* J Biol Chem, 2004. **279**(29): p. 30358-68.
184. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase.* Nature, 2002. **417**(6887): p. 455-8.
185. Kovacs, J.J., et al., *HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor.* Mol Cell, 2005. **18**(5): p. 601-7.
186. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The epigenomics of cancer.* Cell, 2007. **128**(4): p. 683-92.
187. Esteller, M., *Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 629-56.
188. Greger, V., et al., *Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma.* Hum Genet, 1989. **83**(2): p. 155-8.
189. Herman, J.G., et al., *Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 6870-5.
190. Kane, M.F., et al., *Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines.* Cancer Res, 1997. **57**(5): p. 808-11.
191. Gonzalez-Zulueta, M., et al., *Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing.* Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4531-5.
192. Herman, J.G., et al., *Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers.* Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4525-30.
193. Dobrovic, A. and D. Simpfendorfer, *Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer.* Cancer Res, 1997. **57**(16): p. 3347-50.
194. Esteller, M., et al., *Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia.* Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 793-7.

195. Glaser, K.B., et al., *Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA.* Biochem Biophys Res Commun, 2003. **310**(2): p. 529-36.
196. Halkidou, K., et al., *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer.* Prostate, 2004. **59**(2): p. 177-89.
197. Mottet, D., et al., *Histone deacetylase 7 silencing alters endothelial cell migration, a key step in angiogenesis.* Circ Res, 2007. **101**(12): p. 1237-46.
198. Haggarty, S.J., et al., *Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4389-94.
199. Li, Y., et al., *HDAC6 is required for epidermal growth factor-induced beta-catenin nuclear localization.* J Biol Chem, 2008. **283**(19): p. 12686-90.
200. Shan, B., et al., *Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition.* J Biol Chem, 2008. **283**(30): p. 21065-73.
201. Choi, J.H., et al., *Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues.* Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(12): p. 1300-4.
202. Miyake, K., et al., *Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation.* Pancreas, 2008. **36**(3): p. e1-9.
203. Weichert, W., et al., *Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(6): p. 1669-77.
204. Krusche, C.A., et al., *Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **90**(1): p. 15-23.
205. Zhang, Z., et al., *Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast*.* Breast Cancer Res Treat, 2005. **94**(1): p. 11-6.
206. Ozdag, H., et al., *Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers.* BMC Genomics, 2006. **7**: p. 90.
207. Sakuma, T., et al., *Aberrant expression of histone deacetylase 6 in oral squamous cell carcinoma.* Int J Oncol, 2006. **29**(1): p. 117-24.
208. Zhang, Z., et al., *HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(20): p. 6962-8.
209. Bolden, J.E., M.J. Peart, and R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.* Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 769-84.
210. Somoza, J.R., et al., *Structural snapshots of human HDAC8 provide insights into the class I histone deacetylases.* Structure, 2004. **12**(7): p. 1325-34.
211. Lipscomb, W.N. and N. Strater, *Recent Advances in Zinc Enzymology.* Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2375-2434.
212. Drummond, D.C., et al., *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 495-528.
213. Dokmanovic, M. and P.A. Marks, *Prospects: histone deacetylase inhibitors.* J Cell Biochem, 2005. **96**(2): p. 293-304.
214. Kelly, W.K. and P.A. Marks, *Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid.* Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(3): p. 150-7.
215. Minucci, S. and P.G. Pelicci, *Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(1): p. 38-51.
216. Insinga, A., et al., *Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway.* Nat Med, 2005. **11**(1): p. 71-6.
217. Kwon, S.H., et al., *Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells.* J Biol Chem, 2002. **277**(3): p. 2073-80.
218. Ruefli, A.A., et al., *The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10833-8.
219. Peart, M.J., et al., *Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors.* Cancer Res, 2003. **63**(15): p. 4460-71.
220. Mitsiades, N., et al., *Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells.* Blood, 2003. **101**(10): p. 4055-62.

221. Rosato, R.R., J.A. Almenara, and S. Grant, *The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1.* Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3637-45.
222. Rosato, R.R. and S. Grant, *Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy.* Cancer Biol Ther, 2003. **2**(1): p. 30-7.
223. Gu, W. and R.G. Roeder, *Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain.* Cell, 1997. **90**(4): p. 595-606.
224. Luo, J., et al., *Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis.* Nature, 2000. **408**(6810): p. 377-81.
225. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 761-72.
226. Fuino, L., et al., *Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine, and epothilone B.* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(10): p. 971-84.
227. Nimmanapalli, R., et al., *Histone deacetylase inhibitor LAQ824 both lowers expression and promotes proteasomal degradation of Bcr-Abl and induces apoptosis of imatinib mesylate-sensitive or -refractory chronic myelogenous leukemia-blast crisis cells.* Cancer Res, 2003. **63**(16): p. 5126-35.
228. Yu, X., et al., *Modulation of p53, ErbB1, ErbB2, and Raf-1 expression in lung cancer cells by depsipeptide FR901228.* J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(7): p. 504-13.
229. Johnstone, R.W., *Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer.* Nat Rev Drug Discov, 2002. **1**(4): p. 287-99.
230. Marks, P.A., T. Miller, and V.M. Richon, *Histone deacetylases.* Curr Opin Pharmacol, 2003. **3**(4): p. 344-51.
231. Gabrielli, B.G., R.W. Johnstone, and N.A. Saunders, *Identifying molecular targets mediating the anticancer activity of histone deacetylase inhibitors: a work in progress.* Curr Cancer Drug Targets, 2002. **2**(4): p. 337-53.
232. Qiu, L., et al., *Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells.* Mol Biol Cell, 2000. **11**(6): p. 2069-83.
233. Burgess, A.J., et al., *Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity.* Mol Pharmacol, 2001. **60**(4): p. 828-37.
234. Qian, D.Z., et al., *Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589.* Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 634-42.
235. Pili, R., et al., *Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis.* Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1477-85.
236. Sasakawa, Y., et al., *Antitumor efficacy of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, depends on the effect on expression of angiogenesis factors.* Biochem Pharmacol, 2003. **66**(6): p. 897-906.
237. Michaelis, M., et al., *Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo.* Mol Pharmacol, 2004. **65**(3): p. 520-7.
238. Rossig, L., et al., *Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis.* Circ Res, 2002. **91**(9): p. 837-44.
239. Deroanne, C.F., et al., *Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling.* Oncogene, 2002. **21**(3): p. 427-36.
240. Liu, L.T., et al., *Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion.* Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3069-72.
241. Klisovic, D.D., et al., *Depsipeptide inhibits migration of primary and metastatic uveal melanoma cell lines in vitro: a potential strategy for uveal melanoma.* Melanoma Res, 2005. **15**(3): p. 147-53.
242. Magner, W.J., et al., *Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors.* J Immunol, 2000. **165**(12): p. 7017-24.
243. Armeanu, S., et al., *Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate.* Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6321-9.
244. Diermayr, S., et al., *NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities.* Blood, 2008. **111**(3): p. 1428-36.
245. Kato, N., et al., *Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells.* Leukemia, 2007. **21**(10): p. 2103-8.

246. Poggi, A., et al., *Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate.* Leukemia, 2009. **23**(4): p. 641-8.
247. Skov, S., et al., *Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B.* Cancer Res, 2005. **65**(23): p. 11136-45.
248. Lindemann, R.K., B. Gabrielli, and R.W. Johnstone, *Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer.* Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 779-88.
249. Bhalla, K.N., *Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies.* J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3971-93.
250. Cameron, E.E., et al., *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer.* Nat Genet, 1999. **21**(1): p. 103-7.
251. Kim, M.S., et al., *Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA.* Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7291-300.
252. Catley, L., et al., *NVP-LAQ824 is a potent novel histone deacetylase inhibitor with significant activity against multiple myeloma.* Blood, 2003. **102**(7): p. 2615-22.
253. George, P., et al., *Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3.* Blood, 2005. **105**(4): p. 1768-76.
254. Rahmani, M., et al., *Coadministration of the heat shock protein 90 antagonist 17-allylamino- 17-demethoxygeldanamycin with suberoylanilide hydroxamic acid or sodium butyrate synergistically induces apoptosis in human leukemia cells.* Cancer Res, 2003. **63**(23): p. 8420-7.
255. Hideshima, T., et al., *Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8567-72.
256. Yu, C., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis in Bcr/Abl+ cells sensitive and resistant to STI571.* Blood, 2003. **102**(10): p. 3765-74.
257. Pei, X.Y., Y. Dai, and S. Grant, *Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3839-52.
258. Zhang, Y., M. Jung, and A. Dritschilo, *Enhancement of radiation sensitivity of human squamous carcinoma cells by histone deacetylase inhibitors.* Radiat Res, 2004. **161**(6): p. 667-74.
259. Kim, J.H., J.H. Shin, and I.H. Kim, *Susceptibility and radiosensitization of human glioblastoma cells to trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2004. **59**(4): p. 1174-80.
260. Camphausen, K., et al., *Enhancement of in vitro and in vivo tumor cell radiosensitivity by valproic acid.* Int J Cancer, 2005. **114**(3): p. 380-6.
261. Karagiannis, T.C., K.N. Harikrishnan, and A. El-Osta, *The histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, enhances radiation sensitivity and accumulation of gammaH2A.X.* Cancer Biol Ther, 2005. **4**(7): p. 787-93.
262. Camphausen, K., et al., *Enhancement of xenograft tumor radiosensitivity by the histone deacetylase inhibitor MS-275 and correlation with histone hyperacetylation.* Clin Cancer Res, 2004. **10**(18 Pt 1): p. 6066-71.
263. Kristensen, L.S., H.M. Nielsen, and L.L. Hansen, *Epigenetics and cancer treatment.* Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 131-42.
264. Prince, H.M., M.J. Bishton, and S.J. Harrison, *Clinical studies of histone deacetylase inhibitors.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 3958-69.
265. Wagner, J.M., et al., *Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in recent clinical trials for cancer therapy.* Clin Epigenetics, 2010. **1**(3-4): p. 117-136.
266. Munster, P., et al., *Clinical and biological effects of valproic acid as a histone deacetylase inhibitor on tumor and surrogate tissues: phase I/II trial of valproic acid and epirubicin/FEC.* Clin Cancer Res, 2009. **15**(7): p. 2488-96.
267. Khan, O. and N.B. La Thangue, *Drug Insight: histone deacetylase inhibitor-based therapies for cutaneous T-cell lymphomas.* Nat Clin Pract Oncol, 2008. **5**(12): p. 714-26.
268. Piekarz, R.L., et al., *Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report.* Blood, 2001. **98**(9): p. 2865-8.
269. Marks, P.A. and R. Breslow, *Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug.* Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 84-90.

270. Grant, C., et al., *Romidepsin: a new therapy for cutaneous T-cell lymphoma and a potential therapy for solid tumors.* Expert Rev Anticancer Ther, 2010. **10**(7): p. 997-1008.
271. Kelly, W.K., et al., *Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously.* Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3578-88.
272. Pilatrino, C., et al., *Increase in platelet count in older, poor-risk patients with acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome treated with valproic acid and all-trans retinoic acid.* Cancer, 2005. **104**(1): p. 101-9.
273. Gerstner, T., N. Bell, and S. Konig, *Oral valproic acid for epilepsy--long-term experience in therapy and side effects.* Expert Opin Pharmacother, 2008. **9**(2): p. 285-92.
274. Yap, K.Y., W.K. Chui, and A. Chan, *Drug interactions between chemotherapeutic regimens and antiepileptics.* Clin Ther, 2008. **30**(8): p. 1385-407.
275. Brodie, M.J., *Antiepileptic drug therapy the story so far.* Seizure, 2010. **19**(10): p. 650-5.
276. Mula, M., *New antiepileptic drugs: molecular targets.* Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2009. **9**(2): p. 79-86.
277. Monti, B., E. Polazzi, and A. Contestabile, *Biochemical, molecular and epigenetic mechanisms of valproic acid neuroprotection.* Curr Mol Pharmacol, 2009. **2**(1): p. 95-109.
278. Chadwick, D.W., *The treatment of the first seizure: the benefits.* Epilepsia, 2008. **49 Suppl 1**: p. 26-8.
279. Garcia-Morales, I., et al., *Antiepileptic drugs: from scientific evidence to clinical practice.* Neurologist, 2007. **13**(6 Suppl 1): p. S20-8.
280. Ungerstedt, J.S., et al., *Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 673-8.
281. Fuertes, M.B., 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): p. 4606-14.
282. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I.* Immunity, 2006. **25**(2): p. 331-42.
283. Segain, J.P., et al., *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease.* Gut, 2000. **47**(3): p. 397-403.
284. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, *Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways.* Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 695-708.
285. Grohmann, U., et al., *IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production.* Immunity, 1998. **9**(3): p. 315-23.
286. Fortin, C.F., T. Ear, and P.P. McDonald, *Autocrine role of endogenous interleukin-18 on inflammatory cytokine generation by human neutrophils.* FASEB J, 2009. **23**(1): p. 194-203.
287. McDonald, P.P., et al., *Interleukin-15 (IL-15) induces NF-kappaB activation and IL-8 production in human neutrophils.* Blood, 1998. **92**(12): p. 4828-35.
288. Garni-Wagner, B.A., et al., *A novel function-associated molecule related to non-MHC-restricted cytotoxicity mediated by activated natural killer cells and T cells.* J Immunol, 1993. **151**(1): p. 60-70.
289. Grabiec, A.M., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue.* J Immunol, 2010. **184**(5): p. 2718-28.
290. Grabiec, A.M., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocyte and macrophage IL-6 production by accelerating mRNA decay.* Ann Rheum Dis, 2011.
291. Mombelli, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors impair antibacterial defenses of macrophages.* J Infect Dis, 2011. **204**(9): p. 1367-74.
292. Tao, R., et al., *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells.* Nat Med, 2007. **13**(11): p. 1299-307.
293. Reilly, C.M., et al., *The histone deacetylase inhibitor trichostatin A upregulates regulatory T cells and modulates autoimmunity in NZB/W F1 mice.* J Autoimmun, 2008. **31**(2): p. 123-30.
294. Lucas, J.L., et al., *Induction of Foxp3+ regulatory T cells with histone deacetylase inhibitors.* Cell Immunol, 2009. **257**(1-2): p. 97-104.
295. Saouaf, S.J., et al., *Deacetylase inhibition increases regulatory T cell function and decreases incidence and severity of collagen-induced arthritis.* Exp Mol Pathol, 2009. **87**(2): p. 99-104.
296. de Zoeten, E.F., et al., *Inhibition of HDAC9 increases T regulatory cell function and prevents colitis in mice.* Gastroenterology, 2010. **138**(2): p. 583-94.
297. Zhang, Z.Y., Z. Zhang, and H.J. Schluesener, *MS-275, an histone deacetylase inhibitor, reduces the inflammatory reaction in rat experimental autoimmune neuritis.* Neuroscience, 2010. **169**(1): p. 370-7.

298. Koenen, H.J., et al., *Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells.* Blood, 2008. **112**(6): p. 2340-52.
299. Lopez-Soto, A., et al., *HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer.* Oncogene, 2009. **28**(25): p. 2370-82.
300. Bonaldi, T., et al., *Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion.* EMBO J, 2003. **22**(20): p. 5551-60.
301. Evankovich, J., et al., *High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity.* J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39888-97.
302. Albert, M.L., *Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 223-31.
303. Shakespear, M.R., et al., *Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity.* Trends Immunol, 2011. **32**(7): p. 335-43.
304. Leoni, F., et al., *The antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(5): p. 2995-3000.
305. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer.* Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
306. Mantovani, A., *Molecular pathways linking inflammation and cancer.* Curr Mol Med, 2010. **10**(4): p. 369-73.
307. Purrucker, J.C., et al., *HDAC inhibition radiosensitizes human normal tissue cells and reduces DNA Double-Strand Break repair capacity.* Oncol Rep, 2010. **23**(1): p. 263-9.
308. Kim, E.S. and J.K. Lee, *Histone deacetylase inhibitors decrease the antigen presenting activity of murine bone marrow derived dendritic cells.* Cell Immunol, 2010. **262**(1): p. 52-7.
309. Sun, Y., et al., *Cutting edge: Negative regulation of dendritic cells through acetylation of the nonhistone protein STAT-3.* J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5899-903.
310. Song, W., et al., *HDAC inhibition by LBH589 affects the phenotype and function of human myeloid dendritic cells.* Leukemia, 2011. **25**(1): p. 161-8.
311. Singh, N., et al., *Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and propionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases.* J Biol Chem, 2010. **285**(36): p. 27601-8.
312. Corzo, C.A., et al., *HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.* J Exp Med, 2010. **207**(11): p. 2439-53.
313. Rosborough, B.R., et al., *Histone deacetylase inhibition facilitates GM-CSF-mediated expansion of myeloid-derived suppressor cells in vitro and in vivo.* J Leukoc Biol, 2011.
314. Moreira, J.M., P. Scheipers, and P. Sorensen, *The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+ T cell responses.* BMC Cancer, 2003. **3**: p. 30.
315. Selma Dagtas, A. and K.M. Gilbert, *p21(Cip1) up-regulated during histone deacetylase inhibitor-induced CD4(+) T-cell anergy selectively associates with mitogen-activated protein kinases.* Immunology, 2010. **129**(4): p. 589-99.
316. Ogbomo, H., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity.* FEBS Lett, 2007. **581**(7): p. 1317-22.
317. Leggatt, G.R. and B. Gabrielli, *Histone deacetylase inhibitors in the generation of the anti-tumour immune response.* Immunol Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 33-8.
318. Thurn, K.T., et al., *Rational therapeutic combinations with histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer.* Future Oncol, 2011. **7**(2): p. 263-83.
319. Kato, Y., et al., *Synergistic in vivo antitumor effect of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in combination with interleukin 2 in a murine model of renal cell carcinoma.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4538-46.
320. Juengel, E., et al., *Alterations of the gene expression profile in renal cell carcinoma after treatment with the histone deacetylase-inhibitor valproic acid and interferon-alpha.* World J Urol, 2011. **29**(6): p. 779-86.
321. Norian, L.A., et al., *Synergistic Induction of Apoptosis in Primary B-CLL Cells after Treatment with Recombinant Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand and Histone Deacetylase Inhibitors.* J Oncol, 2009. **2009**: p. 408038.
322. Martin, B.P., et al., *Antitumor activities and on-target toxicities mediated by a TRAIL receptor agonist following cotreatment with panobinostat.* Int J Cancer, 2011. **128**(11): p. 2735-47.

323. Frew, A.J., et al., *Combination therapy of established cancer using a histone deacetylase inhibitor and a TRAIL receptor agonist.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(32): p. 11317-22.
324. Place, R.F., E.J. Noonan, and C. Giardina, *HDAC inhibition prevents NF-kappa B activation by suppressing proteasome activity: down-regulation of proteasome subunit expression stabilizes I kappa B alpha.* Biochem Pharmacol, 2005. **70**(3): p. 394-406.
325. Imre, G., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress the inducibility of nuclear factor-kappaB by tumor necrosis factor-alpha receptor-1 down-regulation.* Cancer Res, 2006. **66**(10): p. 5409-18.
326. Yin, L., G. Laevsky, and C. Giardina, *Butyrate suppression of colonocyte NF-kappa B activation and cellular proteasome activity.* J Biol Chem, 2001. **276**(48): p. 44641-6.
327. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.
328. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells.* Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
329. Epling-Burnette, P.K., et al., *Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors.* Blood, 2007. **109**(11): p. 4816-24.
330. Wang, K.S., J. Ritz, and D.A. Frank, *IL-2 induces STAT4 activation in primary NK cells and NK cell lines, but not in T cells.* J Immunol, 1999. **162**(1): p. 299-304.
331. Johannessen Landmark, C., *Antiepileptic drugs in non-epilepsy disorders: relations between mechanisms of action and clinical efficacy.* CNS Drugs, 2008. **22**(1): p. 27-47.
332. Williams, D.C., Jr., et al., *Translocation-positive acute myeloid leukemia associated with valproic acid therapy.* Pediatr Blood Cancer, 2008. **50**(3): p. 641-3.
333. Hallas, J., et al., *Cancer risk in long-term users of valproate: a population-based case-control study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(6): p. 1714-9.
334. Coyle, T.E., et al., *Acute leukemia associated with valproic acid treatment: a novel mechanism for leukemogenesis?* Am J Hematol, 2005. **78**(4): p. 256-60.
335. Duncan, S., *Polycystic ovarian syndrome in women with epilepsy: a review.* Epilepsia, 2001. **42 Suppl 3**: p. 60-5.
336. Rakhra, K., et al., *CD4(+) T cells contribute to the remodeling of the microenvironment required for sustained tumor regression upon oncogene inactivation.* Cancer Cell, 2010. **18**(5): p. 485-98.