

Tesis Doctoral

# Rol de los linfocitos NK en la inmunovigilancia del cáncer colorectal

Rocca, Yamila Sol

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rocca, Yamila Sol. (2017). Rol de los linfocitos NK en la inmunovigilancia del cáncer colorectal. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.  
[https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6257\\_Rocca](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6257_Rocca)

Cita tipo Chicago:

Rocca, Yamila Sol. "Rol de los linfocitos NK en la inmunovigilancia del cáncer colorectal". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017.  
[https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6257\\_Rocca](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6257_Rocca)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

## **Rol de los linfocitos NK en la inmunovigilancia del cáncer colorectal**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la  
Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Lic. Yamila Sol Rocca**

Director de Tesis: Dr. José Mordoh

Director Asistente: Dra. Estrella Mariel Levy

Consejero de Estudios: Dr. Martín Monte

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Bioquímicas de  
Buenos Aires -Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2017

## Agradecimientos

No me resultaría difícil escribir esta sección si en los últimos cuarenta días hubiera hecho otra cosa que escribir. Hace tiempo escuché a mi director decir –a otra persona- que el doctorado es un momento de reflexión y que cada uno lo toma a su manera. No lo entendí, hasta este momento. De chica odiaba el inglés, un día desperté y sentí que sabía hablarlo. Algo parecido pasó en mi doctorado. Llegando al final noté todo lo que había aprendido, en tantos sentidos, y con quién. Mientras se cruzan imágenes de las chicas del labo, de Estre, de receptores NK, de mi campana preferida, pienso que si bien es un alivio saber que en el post-doc no voy a tener que escribir una tesis, ya la empiezo a extrañar. Ciertas experiencias determinan, en parte, quien sos, como el colegio, y la tesis. La tesis que fue única y la volvería a hacer, aunque probablemente no se lo recomendaría a mis amigos, los hippies. Qué papel importante tuvo Estre! Me reclutó, me enseñó, me presentó al Doctor. El Doctor que me permitió trabajar en el mejor laboratorio del mundo y llenarme de estímulos. Va a ser raro no compartir días con Marce acercándose al fondo a contarnos algo; sin Michele concentrado frente a los dibujitos que le regalamos todos los años; sin Marian cuidando el microscopio; Ivi jugando con Cacho o con Pauli en el sector melanoma -con la cofia puesta-; sin Sol que ya no va a ser sol, van a ser dos; sin Tef usando campana, mesada y citómetro al mismo tiempo ni Bet mostrándome videos al lado, mi grupo NK, que no son tan NK; sin Anto siempre enseñándonos cosas, sin Flor M que después de la facultad y el labo debería venir conmigo a Francia, sin Caro y yo volviéndola loca o Dan, acompañándome al colectivo.

Igual voy a extrañar a las que ya me habían abandonado, las históricas Chof, Flor ch, Pau y Gabi, que las amé –no la primera vez-. Son un sueño.

Y toda la gente del Fleming tan dispuesta que ya no me voy a cruzar en los pasillos, especialmente a Luisina, que me enseñó a pensar como ellos, los médicos.

Sin falta, les debo a padres, hermanas, recientemente a un bebe chiquito (no mío) y muy necesario, no necesario, indispensable para esta tesis, Tom.

Gracias!

## **Rol de los linfocitos NK en la inmunovigilancia del cáncer colorectal**

### RESUMEN

La progresión clínica de pacientes con cáncer colorectal (CCR) se encuentra asociada a la respuesta inmunológica por lo que estos tumores podrían ser susceptibles a terapias inmunes. Las células Natural Killer (cNK) constituyen importantes efectores anti-tumorales capaces de eliminar células tumorales (CT) sin inmunización previa, mediante el reconocimiento de ligandos presentes en las mismas mediante por receptores activadores e inhibitorios de su función citotóxica. Sin embargo, hasta el momento no está claro el rol que las cNK puedan tener en el control inmunológico del CCR por lo que nos propusimos determinar el impacto de estas células en distintas etapas de la patología tumoral.

En este trabajo de Tesis determinamos que las cNK infiltrantes del microambiente tumoral exhibieron un fenotipo profundamente alterado. Co-cultivos de cNK con líneas tumorales demostraron que las mismas son capaces de modular la expresión de receptores y generar una reducción drástica de la capacidad de degranular y producir IFN $\gamma$  luego de desafío con blancos específicos.

Por otra parte, evaluamos cNK de sangre periférica y su posible rol en el control de la diseminación tumoral. Desde estadios tempranos de la enfermedad observamos en las cNK de pacientes una disminución en la expresión de receptores activadores y un aumento de los inhibitorios en referencia a donantes sanos. Este fenotipo inhibitorio afectaría la función citotóxica sobre CT de CCR, siendo TGF- $\beta$  un mediador soluble presente en alta concentración plasmática posible causante del mismo. Mediante ensayos específicos de bloqueo, observamos que los receptores activadores NKp30 y NKp46 son determinantes de la función lítica de las cNK contra CT de CCR. Además, hallamos una asociación entre la expresión de NKp46 en cNK de pacientes y la sobrevida libre de recaída.

Teniendo en cuenta las terapias actualmente administradas para el tratamiento del CCR, evaluamos el impacto de 5-fluorouracilo y oxaliplatino sobre líneas tumorales de CCR y observamos que la exposición al tratamiento incrementa su susceptibilidad a ser lisadas por cNK. Por último, con el objetivo de restaurar funcionalmente las cNK evaluamos el efecto de las citoquinas estimuladoras IL-2 o IL-15 en conjunto con el anticuerpo monoclonal cetuximab.

Estas combinaciones mejoraron la citotoxicidad de cNK de pacientes recuperando valores de referencia. Estos experimentos sugieren una posible estrategia de terapias combinatorias para incrementar la actividad de cNK en el contexto del cáncer colorectal.

Palabras clave: células NK, cáncer colorectal, inmunoterapia, NKp46, cetuximab.

## **Role of NK lymphocytes in colorectal cancer immune surveillance**

### SUMMARY

The clinical progression of colorectal cancer (CRC) patients is associated with the immune response; therefore these tumors may be susceptible to immune therapies. Natural Killer cells (NKc) are important anti-tumor effectors capable of eliminating tumor cells (TC) without previous immunization, through the recognition of its ligands through activating and inhibitory receptors of their cytotoxic function.

In this thesis work we determined that tumor micro-environment infiltrating NKc exhibited a profoundly altered phenotype. Co-cultures of NKc with tumor lines demonstrated that they are capable of modulating receptor expression and to generate a drastic reduction in the ability to degranulate and produce IFN $\gamma$  following the challenge with specific targets.

On the other hand, we evaluated NKc of peripheral blood CRC patients and its possible role in tumor dissemination control. From early stages of the disease we observed in patient NKc a decrease in activating receptor expression and an increase of the inhibitory ones in reference to healthy donors. This inhibitory phenotype would affect the cytotoxic function on CRC cells, being TGF- $\beta$ , a soluble mediator present in plasma at high concentration, a possible responsible. By specific blocking assays, we observed that NKp30 and NKp46 activating receptors are determinants for NKc lytic function against TC of CRC. In addition, we found an association between NKp46 expression in CRC patient NKc and relapse-free survival.

Taking in account the administrated therapies for CRC treatment nowadays, we evaluated the impact of 5-fluorouracil and oxaliplatin on CRC tumor lines and observed that exposure to treatment increases their susceptibility to NKc lysis. Finally, in order to restore NKc functionality, we evaluated the effect of IL-2 or IL-15 stimulatory cytokines jointly with the monoclonal antibody cetuximab. These combinations improved the patient NKc cytotoxicity by recovering reference values. All together, these experiments suggest a possible strategy of combinatorial therapies to increase NKc activity in the context of colorectal cancer.

Key words: NK cells, colorectal cancer, immunotherapy, NKp46, cetuximab.

Los resultados presentados en esta tesis fueron parcialmente publicados en los siguientes artículos:

Innate Immun. 2013 Feb;19(1):76-85

**Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients.**

**Rocca Y.S.**, Roberti M.P., Arriaga J.M., Amat M., Bruno L., Pampeña M.B., Huertas E., Loria F.S., Pairola A., Bianchini M., Mordoh J., Levy E.M.

Front Immunol. 2016 Oct 10;7:413

**Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15.**

**Rocca Y.S.**, Roberti M.P., Juliá E.P., Pampeña M.B., Bruno L., Rivero S., Huertas E., Sánchez Loria F., Pairola A., Caignard A., Mordoh J., Levy E.M.

## Abreviaturas

5-fu: 5-fluorouracilo

ADCC: *Antibody dependent cellular cytotoxicity*

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AM: Anticuerpo monoclonal

ARN: Ácido ribonucleico

CCR: Cáncer colorectal

CEA: *carcino-embryonic antigen*

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMSP: Células mononucleares de sangre periférica

CTLA-4: *Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*

EGF: *Epidermal growth factor*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

GMCSF: *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

HLA: *Human leukocyte antigen*

IFN $\gamma$ : Interferón  $\gamma$

IHQ: Inmunohistoquímica

IL: Interleuquina

IMF: Intensidad de fluorescencia media

ITAM: *Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*

ITIM: *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*

IVL: invasión vaso-linfática



KIR: *Killer-cell immunoglobulin-like receptors*

MDSC: *Myeloid-derived suppressor cell*

NK: *Natural Killer*

Oxa: *Oxaliplatino*

PD-1: *Program death receptor 1*

PDL-1: *Program death receptor ligand 1*

QT: *Quimioterapia*

Sfb: *Suero fetal bovino*

SP: *Sangre periférica*

TCR: *T cell receptor*

TGF $\beta$ : *Tumor growth factor  $\beta$*

TNF $\alpha$ : *Tumor necrosis factor  $\alpha$*

TNM: *Tumor - node - metastasis*

TRAIL: *Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand*

Treg: *Célula T regulatoria*

VEGF: *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR: *Vascular endothelial growth factor receptor*

**INTRODUCCIÓN ..... - 1 -**

**El cáncer..... - 2 -**

    Cáncer colorectal..... - 6 -

    Mucosa colorectal normal y su carcinogénesis..... - 9 -

    Estadificación ..... - 14 -

    Factores pronóstico..... - 16 -

    Vías metastásicas ..... - 19 -

    Terapias actuales..... - 20 -

    Inmunoterapia en CCR ..... - 26 -

    Eje PD-1/PDL-1 en CCR..... - 28 -

**Inmunidad en cáncer ..... - 29 -**

    Inmunidad innata y adaptativa ..... - 31 -

    Células NK..... - 31 -

    Integración de señales ..... - 38 -

    Receptores inhibitorios ..... - 38 -

    Receptores activadores..... - 40 -

    Otros receptores ..... - 43 -

**Función citotóxica de células NK ..... - 46 -**

    Degranulación: liberación de granzimas y perforinas..... - 46 -

    ADCC..... - 46 -

**Sinapsis lítica..... - 47 -**

**Interacción con otras poblaciones inmunes: CD, células T, Macrófagos ..... - 49 -**

**Terapias que involucran células NK ..... - 50 -**

**Hipótesis ..... - 52 -**

**Objetivos generales ..... - 53 -**

**Objetivos específicos ..... - 53 -**

**MATERIALES Y MÉTODOS ..... - 54 -**

**Muestras de pacientes con CCR y donantes sanos..... - 55 -**

**Aislamiento de células mononucleares de SP (CMSP)..... - 57 -**

Purificación de células NK ..... - 58 -

Disgregación mecánica de muestras tumorales..... - 58 -

Citometría de flujo –fluorescence activated cell sorting (FACS) ..... - 59 -

Marcación de antígenos de membrana..... - 61 -

Marcación de antígenos intracelulares ..... - 62 -

Adquisición de muestras..... - 62 -

Líneas celulares ..... - 64 -

Testeo de micoplasma intracelular (Hoechst) ..... - 64 -

Determinación de viabilidad celular ..... - 65 -

Ensayos de crecimiento celular *in vitro* (MTT)..... - 65 -

Co-cultivo de CMSP y células tumorales ..... - 66 -

Ensayos de Degranulación y producción de IFN $\gamma$  ..... - 67 -

Ensayos funcionales de lisis..... - 69 -

Ensayos de proliferación con CFSE..... - 71 -

Tratamientos con citoquinas y AMs *in vitro* ..... - 72 -

Drogas quimioterapéuticas ..... - 73 -

Ensayos en xCELLigence ..... - 74 -

Bloqueos de receptores de células NK ..... - 75 -

Ensayos de Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ..... - 76 -

Inmunohistoquímica (IHQ)..... - 77 -

Extracción de ARN de tejidos tumorales y líneas celulares ..... - 78 -

RT-PCR ..... - 79 -

PCR cualitativa ..... - 79 -

|  |                |
|--|----------------|
| q-PCR .....  | - 80 -         |
| Electroforesis en geles de agarosa.....  | - 80 -         |
| Análisis estadístico .....   | - 81 -         |
| Análisis de Clustering.....  | - 82 -         |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>- 83 -</b>  |
| <b>Capítulo I: Rol de células NK en el microambiente tumoral .....</b>   | <b>- 84 -</b>  |
| 1.1 Evaluación de la presencia de células NK en tumores primarios mediante IHQ .....                                   | - 84 -         |
| 1.2 Evaluación ex vivo de células mononucleares infiltrantes al tumor .....  | - 91 -         |
| 1.3 Evaluación de la inmunosupresión mediada por células tumorales sobre células NK mediante co-cultivos in vitro..... | - 103 -        |
| 1.3 Evaluación por PCR de la expresión de TGFβ .....   | - 110 -        |
| <b>Capítulo II: Rol de las células NK de sangre periférica en el control de la diseminación tumoral .....</b>          | <b>- 113 -</b> |
| 2.1 Evaluación ex vivo de poblaciones linfocitarias de sangre periférica .....   | - 113 -        |
| Caracterización del fenotipo de células NK de pacientes con CCR en SP .....  | - 118 -        |
| 2.2 Evaluación de la funcionalidad de células NK .....   | - 131 -        |
| 2.2.1 Evaluación de la degranulación (expresión de CD107a) y producción de IFN $\gamma$ en células NK .....            | - 136 -        |
| 2.2.2 Evaluación de la capacidad lítica de células NK frente a células tumorales de CCR .....                          | - 140 -        |
| 2.2.2.1 Evaluación de la actividad lítica de células NK activadas con citoquinas.....                                  | - 144 -        |
| 2.2.3 Asociación entre fenotipo y función de células NK.....   | - 146 -        |
| 2.2.4 Impacto de las células NK en el pronóstico de pacientes con CCR .....  | - 153 -        |
| <b>Capítulo III: Células NK en la terapia del Cáncer Colorectal .....</b>  | <b>- 156 -</b> |
| 3.1. Impacto de drogas quimioterapéuticas en el reconocimiento por células NK .....                                    | - 156 -        |
| 3.2 Evaluación de los efectos inmunológicos en pacientes tratados con neoadyuvancia.....                               | - 169 -        |
| 3.3 Inmunoterapias para la restauración de la funcionalidad de células NK.....   | - 172 -        |
| 3.3.1 AM Cetuximab.....  | - 172 -        |
| <b>DISCUSIÓN .....</b>   | <b>- 180 -</b> |
| <b>Comentarios finales.....</b>  | <b>- 193 -</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>   | <b>- 196 -</b> |

# Introducción

El éxito clínico en pacientes con cáncer colorectal se encuentra asociado a la respuesta inmune<sup>1</sup>, por lo que consideramos que este tipo de tumores podría ser susceptible a terapias con diferentes enfoques inmunológicos.

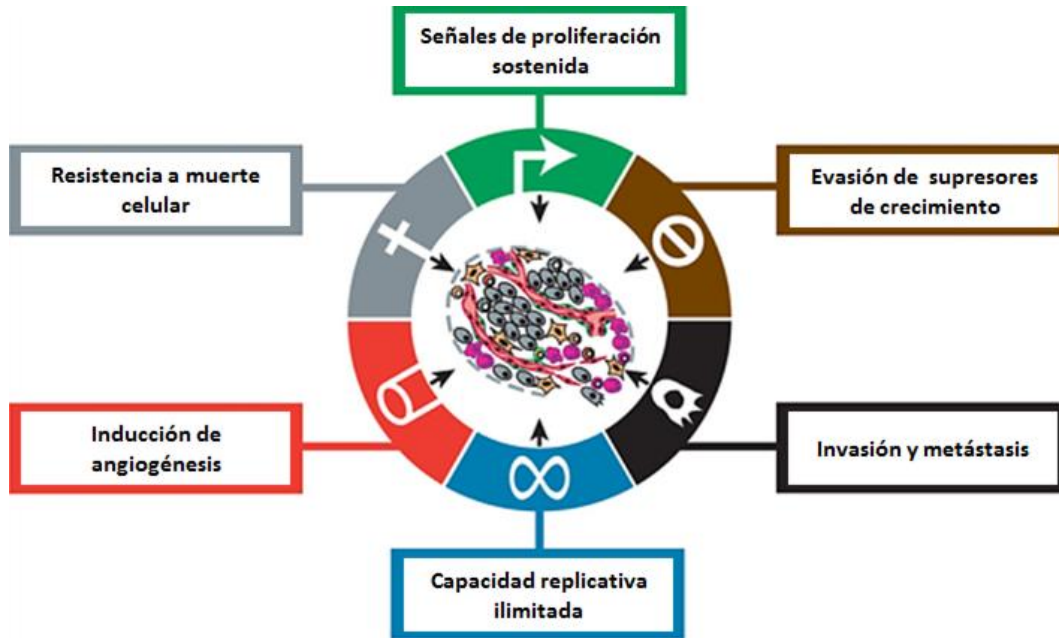
Las células NK constituyen efectores clave en la respuesta anti-tumoral y tienen la capacidad de eliminar células tumorales rápidamente y sin inmunización previa. De hecho, se vio que ratones depletados de células NK se volvían susceptibles a la aparición de tumores espontáneos<sup>2</sup>.

Se ha determinado que el incremento de ciertas poblaciones inmunes, como células T de memoria, correlaciona con una disminución en la diseminación del carcinoma<sup>3</sup>, no obstante, el rol de las células *Natural Killer* no está claramente determinado.

## EL CÁNCER

El cáncer constituye una enfermedad, o más bien un conjunto de enfermedades, que en la actualidad representa una de las causas de muerte más preponderante a nivel mundial. Involucra la proliferación no controlada de células malignas en el organismo, local o sistémicamente, que impide el normal desarrollo de las funciones del órgano blanco y del sistema inmune.

Hanahan y Weinberg describieron seis características necesarias, presentes en los diversos tipos de neoplasias, como proceso progresivo que les permiten a las células adquirir tumorigenicidad: señales de proliferación sostenida, evasión de supresores del crecimiento, capacidad replicativa ilimitada, inducción de angiogénesis, resistencia a la muerte celular y capacidad invasiva y de generar metástasis<sup>4</sup> (Figura 1).



**Figura 1:** Características adquiridas por células tumorales. Imagen adaptada de Hanahan & Weinberg, 2011.

Los factores de crecimiento, principal señal de proliferación, pueden ser producidos por las mismas células tumorales o por células vecinas inducidas a tal función. A su vez, las células de un tumor pueden presentar constitutivamente activadas vías de señalización *downstream* a los receptores correspondientes de dichos factores de crecimiento. Generalmente, cuando estas vías se encuentran activadas, se induce un proceso de senescencia como respuesta celular de defensa, no obstante las células tumorales podrían regular la intensidad de la señalización oncogénica o bien desarticular completamente el mecanismo de senescencia<sup>5</sup>. Adicionalmente, las células malignas son capaces de evadir señales de restricción como la inhibición por contacto y eludir el proceso de apoptosis, desencadenado tanto por la vía intrínseca de caspasas como por la extrínseca (Fas-FasL)<sup>6</sup>.

Mientras que la actividad de la telomerasa (enzima encargada de replicar extremos cromosómicos de ADN) se encuentra prácticamente ausente en tejidos

somáticos normales, su actividad estaría significativamente incrementada en células tumorales lo que determinaría la “inmortalidad” del tejido<sup>7</sup>. De esta manera, su tamaño aumentará y con él, la necesidad de oxígeno y de eliminación de desechos metabólicos. Estos requerimientos impondrán la formación de nuevos vasos sanguíneos que nutran al tumor, esenciales para su rápida expansión. La medida de angiogénesis impactará en el pronóstico de los pacientes con distintos tipos de cáncer<sup>8</sup>. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) representa un importante mediador soluble de este proceso.

La capacidad invasiva y de generar metástasis de las células tumorales depende de su expresión en membrana de moléculas tales como selectinas y caderinas que les permiten interactuar con su entorno y, su posterior establecimiento en potenciales nichos.

El cáncer puede entenderse como una enfermedad estructuralmente genética, en la que mutaciones, ya sea en línea germinal o somática, permitirían la adquisición de las seis características o *hallmarks* mencionados anteriormente. Si los cambios ocurrieran en la línea germinal se desarrollaría un cáncer de carácter hereditario o de cierta predisposición familiar mientras que, si las mutaciones ocurrieran – lo más usual- en células somáticas, se trataría de un tumor esporádico.

El desarrollo de un cáncer no es producto de la falla de un único gen sino de la acumulación concurrente de mutaciones en múltiples blancos como oncogenes, genes supresores de tumor y genes de estabilidad<sup>9</sup>.

En el primer caso, la activación constitutiva de un oncogen generaría una característica ventajosa para la célula portadora. Por ejemplo, el gen que codifica para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha visto amplificado y mutado en distintos tipos de cáncer permitiendo su activación constitutiva en tejidos tumorales, tales como en cáncer de mama –pacientes en los que la mutación correlaciona con peor pronóstico-, CCR y glioblastoma<sup>10</sup>.

En el caso de genes supresores de tumor, su falla implicaría la pérdida de



un punto de control. Tal es el caso del gen *adenomatous polyposis coli* (APC), en el contexto del cáncer colorectal (CCR), que induce la degradación de la proteína  $\beta$ -catenina libre. Mutaciones en este gen provocarían una proteína incapaz de formar el complejo de degradación y, consecuentemente, la acumulación de  $\beta$ -catenina citoplasmática que transloca al núcleo donde activa la transcripción de genes de proliferación y diferenciación celular<sup>11</sup>.

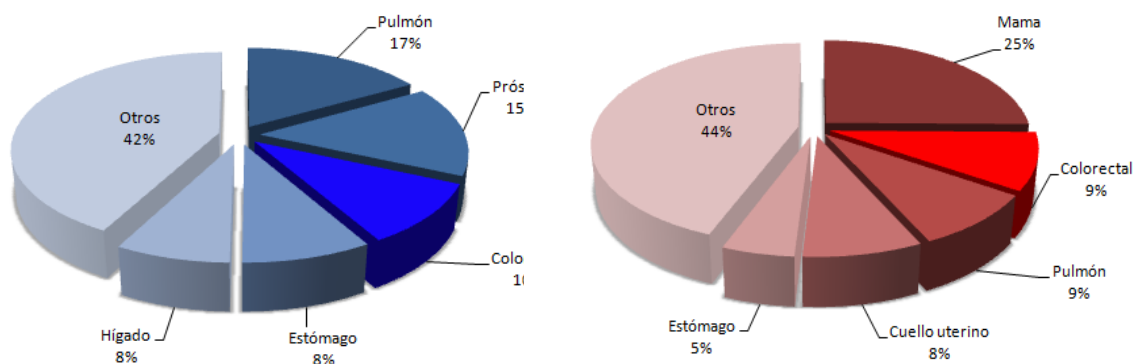
Por último, los genes de estabilidad son los responsables de mantener las alteraciones genéticas al menor nivel posible como el sistema *mismatch repair* (MMR) que reconoce y repara errores de inserción, deleción o incorporación de bases incorrectas durante la replicación. Defectos en estos genes se han observado en cáncer gástrico, melanoma y CCR<sup>121314</sup>.

A su vez, el cáncer se asocia con alteraciones en el proceso mitótico que conlleva re-arreglos cromosómicos y aneuploidía (cambio en el número cromosómico). A partir de uno o varios eventos carcinogénicos iniciales y aparición de la aneuploidía, que puede darse temprana o tardíamente, se incrementa la probabilidad de nuevas alteraciones o pérdidas cromosómicas<sup>15</sup>. La capacidad celular de revertir el daño en el ADN determinará su destino. Dicho daño puede darse intrínsecamente debido a errores en la replicación o por vía extrínseca como exposición a agentes mutagénicos. Durante la progresión, el proceso se vuelve irreversible a partir de una mayor tasa de crecimiento, cambios bioquímicos, metabólicos y morfológicos.

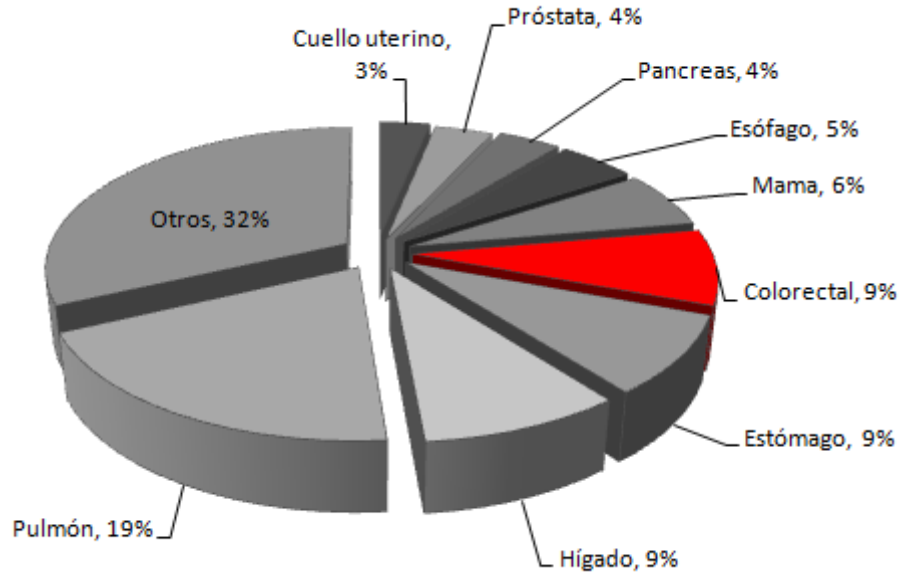
Existen dos modelos bien establecidos que explican la génesis de un tumor entendiéndose éstos como acumulación de mutaciones. En el primer modelo, una única célula somática proliferaría evitando el control del ciclo celular y dando lugar a un tumor completo constituido por células "equivalentes". El segundo modelo propone que el tumor es originado a partir de *stem cells*, responsables de la organogénesis de los tejidos, éstas constituirían, de esta manera, la sub-población tumoral capaz de autorrenovarse<sup>16</sup>.

**Cáncer colorectal**

A nivel mundial, los cinco órganos más comunes en los que se realiza un diagnóstico tumoral son, en hombres: pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. Se corresponde, en la población de mujeres, con mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago (Figura 2). De esta manera, el CCR ocupa un lugar preponderante en porcentaje de incidencia en ambos sexos, representando, a su vez, la cuarta causa de mortalidad por cáncer en el mundo<sup>17</sup> (Figura 3).

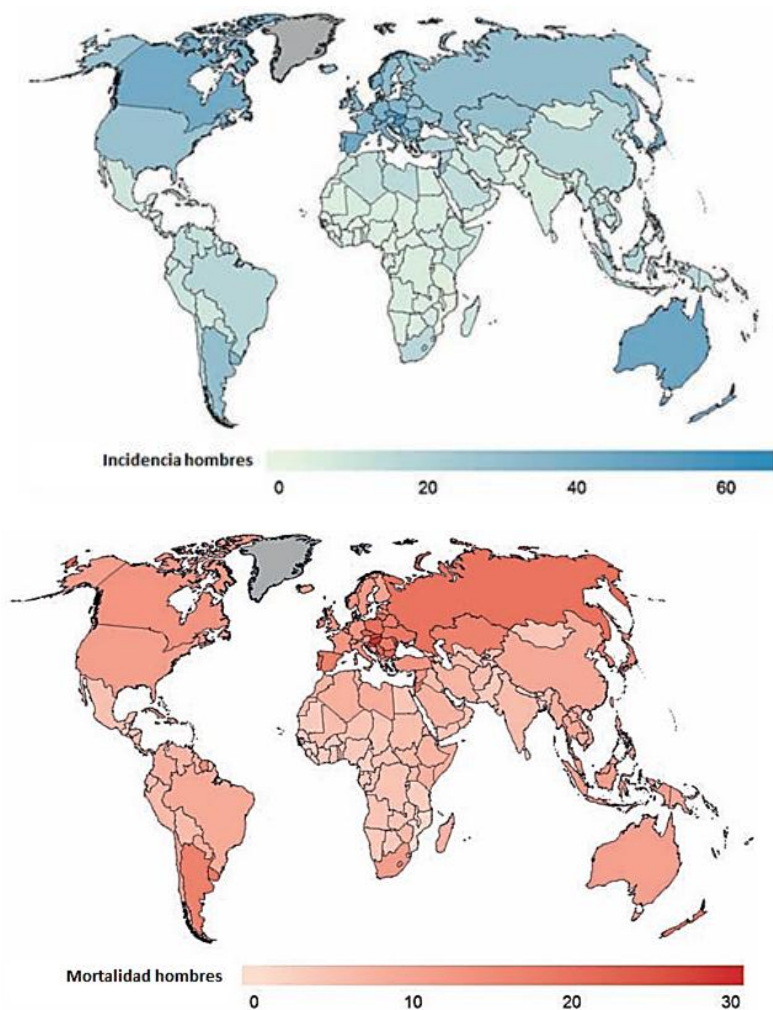


**Figura 2:** Incidencia de distintos tipos de cáncer en hombres (izquierda) y en mujeres (derecha) a nivel mundial.



**Figura 3:** Porcentaje de mortalidad de distintos tipos de cáncer para ambos sexos a nivel mundial.

La mayor parte de los nuevos casos diagnosticados ocurre en países desarrollados como Estados Unidos, Australia y Europa occidental, donde la incidencia y mortalidad se encuentra en aumento mientras que, países africanos y parte de América latina mantienen un bajo porcentaje de casos de CCR (Figura 4). Esta distinción encontraría causal en la composición dietaria, con bajo consumo de frutas y verduras o alta ingesta de alcohol; la obesidad; falta de actividad física y una mayor exposición a agentes mutagénicos como tabaco o contaminantes; considerados en su totalidad importantes factores de riesgo<sup>18</sup>.



**Figura 4:** Distribución global de incidencia (arriba) y mortalidad (abajo) cada 100000 hombres por CCR, estandarizado por edad. Imágenes adaptadas de *Stewart & Wild, World Health Organization, 2014*.

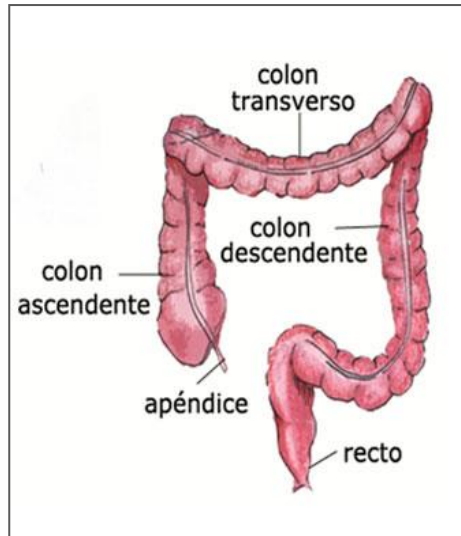
En Argentina, se produjeron 13.500 nuevos casos de CCR en 2015, de los cuales 7.200 fueron en hombres y 6.300 en mujeres con proyecciones de aumento hasta el año 2030<sup>19</sup>.

El CCR se presenta en un 90% de los casos en personas mayores de 50 años. Alrededor del 75% de los tumores de CCR son esporádicos es decir que se desarrollan en personas sin antecedentes familiares de la enfermedad por lo que, se presume que factores ambientales han determinado su etiología. El 25% restante presenta carácter hereditario o se corresponde con enfermedades inflamatorias del intestino<sup>20</sup>.

En los cánceres hereditarios, ciertas mutaciones son heredadas en un alelo de un determinado gen, lo que implica que una mutación en el alelo restante desencadenaría la aparición de una célula tumoral con alta probabilidad. Se dividen en dos grandes grupos: los polipósicos y los no polipósicos. Dentro del primer grupo, el principal síndrome es el de poliposis adenomatosa familiar (FAP) que representa el 1% del total. FAP es considerada una enfermedad autosómica dominante con mutación germinal en el gen APC en un 80% de los casos. El segundo grupo constituye el CCR no polipósico hereditario (HNPCC) cuya principal causa es el síndrome de Lynch que representa el 2-3% de todos los CCR. HNPCC es también autosómica dominante típicamente debido a mutaciones en línea germinal de genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) conocidas en su conjunto como inestabilidad microsatelital (los microsatélites son secuencias cortas repetitivas en el ADN) <sup>21 22 23</sup>.

#### ***Mucosa colorectal normal y su carcinogénesis***

El colon mide aproximadamente 1,5 metros de largo y presenta una circunferencia promedio de 6,2 cm de diámetro, comunica el intestino delgado – desde la válvula ileocecal- con el recto y puede dividirse en colon ascendente o derecho, colon transversal, colon descendente o izquierdo y colon sigmoideo (por su forma en s) (Figura 5). La principal función de las primeras dos secciones constituye la reabsorción de agua y electrolitos –como Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>- mientras que las siguientes se encargan de almacenar y compactar la materia fecal <sup>24</sup>.



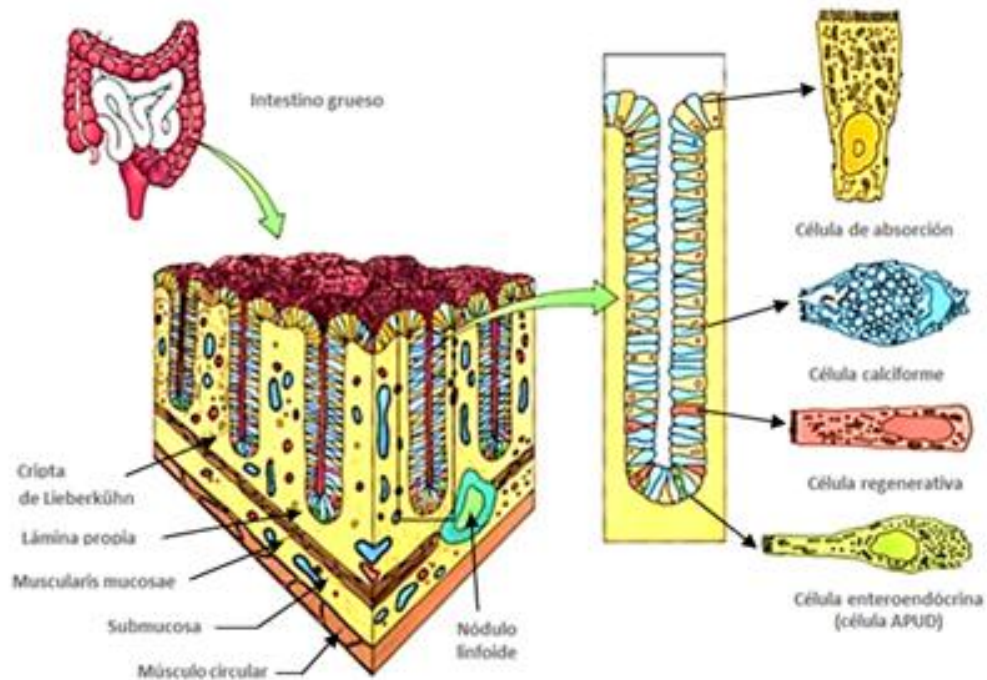
**Figura 5:** Esquema anatómico del colon y recto.

El epitelio colónico presenta invaginaciones, conocidas como criptas de Lieberkühn, orientadas a la luz intestinal. Constituyen glándulas tubulares que renuevan el revestimiento del intestino y producen grandes cantidades de moco. Además de llevar a cabo su función de absorción y secreción de mucinas (proteínas de alto peso molecular que constituyen el principal componente del moco), secreta inmunoglobulinas y péptidos anti-microbianos. Las células calciformes son las principales responsables de la secreción de mucinas exocitadas que, diluidas en agua, forman el moco manteniendo así húmedo el epitelio y protegiéndolo de la desecación. El colon presenta alrededor de 10 millones de criptas en toda su extensión. De hecho, las criptas constituirán la unidad básica tisular ya que se considera que la fisión de criptas transformadas favorecería el crecimiento inicial de un tumor a partir de adenomas mono-criptales, más que el crecimiento aberrante *per se* de células malignas<sup>25</sup>.

La mucosa, propiamente dicha, está constituida por la lámina propia (tejido conjuntivo por debajo del epitelio que le proporciona soporte y nutrición) y por un epitelio simple de células -colonocitos- polarizadas. Más internamente se

encuentra la submucosa, tejido conjuntivo que incluye importantes vasos y organizaciones linfáticas, seguida por las capas de músculo circular y longitudinal. Por último, se halla la serosa o adventicia que constituye la continuación del peritoneo (Figura 6).

La “cara apical” de la mucosa entra en contacto con múltiples microorganismos que forman parte de la flora comensal del organismo. Dicha mucosa debe inducir un ambiente tolerogénico que permita la presencia de bacterias, hongos y demás microorganismos que facilitan la digestión de ciertos alimentos, secretan vitaminas y participarían activamente en la inmunidad del tejido, sin dejar de estar preparada para desarrollar una fuerte respuesta inmune si la barrera epitelial se rompiera o se presentara una amenaza patogénica. Las comunidades microbianas del tracto intestinal pueden modificarse por la dieta, factores ambientales, ingesta de pro-bióticos y toma de antibióticos. Diversos estudios avalan su participación tanto protectora como promotora de la carcinogénesis. En los últimos años se ha descubierto que alteraciones en la microbiota bacteriana resultan en alteraciones en las células de la respuesta inmune adaptativa que desencadenarían diversos procesos inflamatorios<sup>26</sup>.



**Figura 6:** Estructura microscópica del tejido colónico.

El recto es la parte final del tubo digestivo, tiene aproximadamente 15 cm de largo y su histología es similar a la del colon.

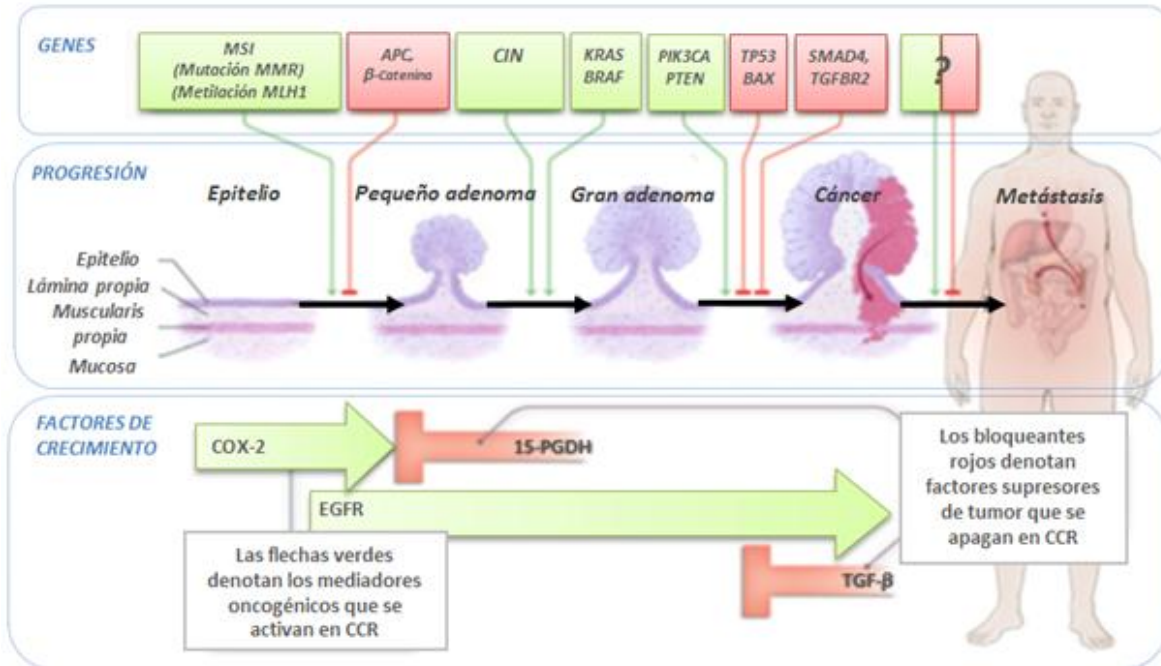
Procedentes de la arteria aorta, la arteria mesentérica superior irriga el colon ascendente y la primera mitad del transversal mientras que la arteria mesentérica inferior irriga la segunda mitad del transversal, el colon descendente y el recto. El retorno se realiza a través de las venas correspondientes mesentérica superior e inferior, que transportan nutrientes procedentes de la digestión, y convergen en la vena porta hacia el hígado. Posteriormente la sangre desemboca en la vena cava y vuelve al corazón. La circulación portal permitiría la rápida llegada de nutrientes al hígado y también la eliminación de patógenos previa a su re-circulación sistémica.

La progresión carcinogénica del CCR se caracteriza por cambios genéticos y epigenéticos secuenciales. Existen aproximadamente 15 mutaciones *driver* (que



confieren una ventaja selectiva al tumor) preponderantes en dicha carcinogénesis. Estas mutaciones afectan la proliferación, migración, adhesión, diferenciación, muerte celular y estabilidad del ADN así como su reparación. A su vez, existen múltiples alteraciones epigenéticas como metilación del ADN, modificación de histonas post-traduccionalmente, posicionamientos de nucleosomas y pequeños ARNs no codificantes que regulan la expresión genética<sup>27 28</sup>.

La mucosa normal de tejido colónico o rectal se origina en la cripta colónica, las células migran desde la base hacia la superficie epitelial donde finalmente sufren un proceso de apoptosis. Este equilibrio se ve alterado en pólipos y tumores en los que disminuye la apoptosis y la mucosa se vuelve más susceptible a daños del ADN y los mencionados cambios epigenéticos. En la Figura 7 se muestra un modelo de carcinogénesis según potenciales alteraciones secuenciales en genes y vías de señalización<sup>29</sup>. Aproximadamente el 70% de los CCR sigue esta sucesión específica de mutaciones comenzando con la formación de un adenoma (tumor epitelial benigno) hasta el desarrollo de un adenocarcinoma (carcinoma originado en células del revestimiento interno de glándulas de secreción externa). Una de las primeras mutaciones ocurriría en el gen APC dando lugar a la formación de un pólipo o adenoma. El 15% de esos adenomas progresarían a carcinoma en un período de diez años<sup>30</sup>.



**Figura 7:** Genes y vías de señalización *driver* para la progresión del CCR. Las alteraciones genéticas incluyen la inestabilidad microsatelital (MSI), mutaciones en el gen APC que involucra la vía de  $\beta$ -catenina, inestabilidad cromosómica (CIN), mutaciones en genes KRAS o BRAF, PI3K, PTEN, TP53, BAX, SMAD4 y TGFBR2. El desbalance de factores de crecimiento y sus respectivos receptores involucra la ciclo-oxigenasa (COX-2), el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), la prostaglandina-dehidrogenasa (PGDH) y el factor de crecimiento tumoral TGF-  $\beta$ . Figura adaptada de Markowitz & Bertagnoli, 2009.

### Estadificación

La Estadificación de tumores constituye una medida para determinar “cuánto cáncer” hay en el cuerpo y dónde se encuentra localizado. Actualmente se utiliza la clasificación del *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) denominada *tumor/node/metastasis* (TNM). La Estadificación se basa en el tamaño del tumor primario, su ubicación, la afectación de ganglios o ganglios linfáticos y la presencia o ausencia de metástasis a distancia en otros órganos del cuerpo (Tabla 1 y 2). Se

determina a partir de análisis por imágenes, informes quirúrgicos y exámenes patológicos.

| <b>Tumor primario (T)</b> |  |
|---------------------------|--|
| <b>T0</b>                 | Sin evidencia de tumor primario  |
| <b>Tis</b>                | Carcinoma <i>in situ</i> : intra-epitelial o invasión de lámina propia |
| <b>T1</b>                 | Tumor invade la sub-mucosa   |
| <b>T2</b>                 | Tumor invade <i>muscularis propria</i>                                 |
| <b>T3</b>                 | Tumor invade tejidos peri-colorectales                                 |
| <b>T4a</b>                | Tumor penetra en peritoneo visceral                                    |
| <b>T4b</b>                | Tumor invade otros órganos   |

| <b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b> |   |
|---|---|
| <b>N0</b>                                 | Ningún nódulo metastásico                                   |
| <b>N1</b>                                 | Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos                       |
| <b>N1a</b>                                | Metástasis en 1 nodo linfático                              |
| <b>N1b</b>                                | Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos                       |
| <b>N1c</b>                                | Tumor en la subserosa sin metástasis en ganglios linfáticos |
| <b>N2</b>                                 | Metástasis en 4 o más ganglios linfáticos                   |
| <b>N2a</b>                                | Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos                       |
| <b>N2b</b>                                | Metástasis en 7 o más ganglios linfáticos                   |

| <b>Metástasis a distancia (M)</b> |                                    |
|-----------------------------------|------------------------------------|
| <b>M0</b>                         | Sin metástasis                     |
| <b>M1</b>                         | Metástasis a distancia             |
| <b>M1a</b>                        | Metástasis confinadas en un órgano |
| <b>M1b</b>                        | Metástasis en más de un órgano     |

**Tabla 1:** Clasificación de tumor-ganglio linfático-metástasis (TNM) de AJCC para CCR.

| <b>Estadio</b> | <b>T</b>       | <b>N</b>       | <b>M</b> |
|----------------|----------------|----------------|----------|
| 0              | Tis            | N0             | M0       |
| I              | T1             | N0             | M0       |
|                | T2             | N0             | M0       |
| IIA            | T3             | N0             | M0       |
| IIB            | T4a            | N0             | M0       |
| IIC            | T4b            | N0             | M0       |
| IIIA           | T1-T2          | N1             | M0       |
|                | T1             | N2a            | M0       |
| IIIB           | T3-T4a         | N1-N1c         | M0       |
|                | T2-T3          | N2a            | M0       |
|                | T1-T2          | N2b            | M0       |
| IIIC           | T4a            | N2a            | M0       |
|                | T3-T4a         | N2b            | M0       |
|                | T4b            | N1-N2          | M0       |
| IVA            | cualquier<br>T | cualquier<br>N | M1a      |
| IVB            | cualquier<br>T | cualquier<br>N | M1b      |

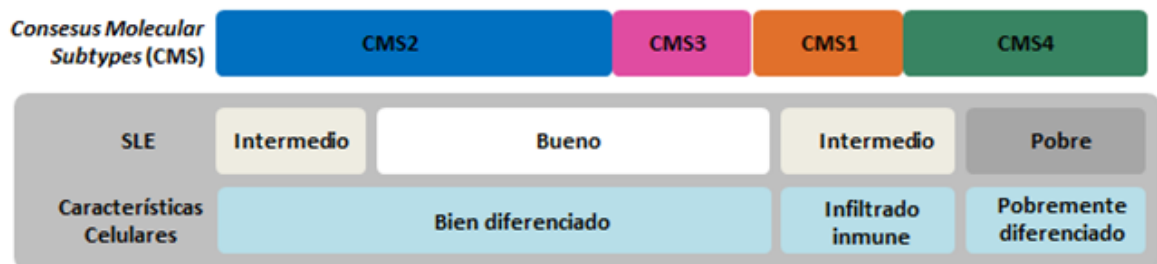
**Tabla 2:** Estadificación TNM para CCR según AJCC.

### ***Factores pronóstico***

Existen diversas variables clínicas importantes al momento del diagnóstico de un CCR y la toma de decisión terapéutica tales como la edad, antecedentes familiares, localización –colon derecho, colon transverso, colon izquierdo o recto-, obstrucción del conducto, niveles séricos del antígeno carcino-embriionario (CEA) pre- y post-operatorio, tamaño tumoral, grado histológico (bien o pobremente diferenciado), invasión vascular-linfática (IVL), estadificación, presencia de inestabilidad microsatelital, status del gen KRAS y del gen BRAF.

La sobrevida global decrece con la edad, sin grandes diferencias entre hombres y mujeres<sup>31</sup>. Existe gran heterogeneidad entre los pacientes con CCR.

Junto con el melanoma, son considerados los tumores de mayor cantidad de mutaciones somáticas. A nivel molecular se describieron cuatro categorías moleculares (*consensus molecular subtypes-CMS*) que podrían, en un futuro, tomar partido en la decisión terapéutica aunque por el momento no son factores predictivos: CMS1, caracterizado por hipermutaciones incluyendo el gen BRAF, inestabilidad microsatelital, con activación del sistema inmune; CMS2, tumor inestable cromosómicamente, con alteraciones en la vía de Wnt; CMS3, que presenta desregulación metabólica y; CMS4, con alteración en la vía de TGF- $\beta$ , prominente angiogénesis y mal pronóstico. Esta última categoría, compuesta por tumores cuyas células son pobremente diferenciadas, corresponde la de peor pronóstico (Figura 8)<sup>32</sup>.



**Figura 8:** Categorías moleculares del CCR. SLE: supervivencia libre de enfermedad. Imagen tomada de Fontana et al. 2016.

El diagnóstico de un tumor localizado en colon izquierdo y sigmoideo o en recto exhibe menor mortalidad que uno en colon derecho y transversal, aunque los casos de tumores de colon derecho o transversal con inestabilidad microsatelital presentan la menor mortalidad de todos los grupos<sup>33</sup>. De esta manera, tumores en colon derecho e izquierdo son abordados con distintos enfoques desde un punto de vista quirúrgico y terapéutico. Adicionalmente a un peor pronóstico, los tumores en colon derecho presentan usualmente la mutación del gen BRAF que se

encuentra más representada en este grupo. Suelen ser diagnosticados más tardíamente e implican un mayor infiltrado inmune<sup>34</sup>.

El CEA se mide en suero de pacientes y se encuentra bien establecido como marcador pronóstico siendo favorable su valor menor a 5 ng/ml y, a su vez, es considerado predictor de respuesta completa frente a quimioterapia/radioterapia neoadyuvante en pacientes con tumores rectales<sup>35</sup>.

La IVL designa la presencia de células malignas en vasos sanguíneos o linfáticos. Usualmente precede la propagación de cáncer en ganglios linfáticos que drenan líquido linfático del tejido afectado y se asocia con peor pronóstico<sup>36</sup>.

La inestabilidad microsatelital, mencionada anteriormente, es determinada por inmunohistoquímica de tejido colorectal, método que permite evaluar la presencia de enzimas de reparación del ADN. Puede medirse, a su vez, por el método de *polymerase chain reaction* (PCR). Ambas metodologías, en combinación, presentan una sensibilidad del 95% para su detección. Los microsátélites constituyen regiones repetitivas del ADN donde la polimerasa fácilmente puede confundirse, si además existe un déficit en la reparación de errores, el efecto es muy notorio. Dicha inestabilidad se asocia a síndromes hereditarios, aunque no de manera excluyente y, a un pronóstico favorable.

Existen tres genes RAS que codifican para cuatro proteínas RAS de alta homología: NRAS, HRAS, KRAS4B y KRAS4A, las dos últimas variantes de *splicing*. Las cuatro proteínas tienen dominios efectores idénticos aunque pueden exhibir diferentes potenciales oncogénicos. La mutación KRAS es la más común en CCR y se asocia a un peor pronóstico de los pacientes<sup>37</sup>.

En un 10-15% de los casos de CCR, se encuentra una mutación en el gen BRAF, siendo la más común la V600E. Se asocia a la hipermetilación del promotor de MLH1, enzima de la reparación del ADN, y el consecuente déficit en corrección de errores<sup>38</sup>.

En líneas generales, las mutaciones KRAS y BRAF no ocurren conjuntamente en el mismo tumor. Se consideran equivalentes en sus efectos tumorigénicos, son somáticas y afectan las mismas vías de señalización. A su vez, los tumores inestables tienen una gran incidencia de mutaciones BRAF y una muy baja de KRAS ya que, la primera representaría la mutación más frecuente en tumores con errores en la reparación del ADN<sup>37</sup>.

Asimismo, el infiltrado inmune constituiría un importante factor pronóstico en CCR. Se vio que linfocitos T de memoria en el tumor evidenciarían menor invasión metastásica y mayor sobrevida<sup>38</sup>. La densidad y orientación de células T en tumores primarios podría ser un buen predictor de la respuesta clínica<sup>39</sup>.

#### *Vías metastásicas*

Desde el colon y partes proximales del recto, la sangre, como mencionamos anteriormente, es drenada por el sistema porta hacia el hígado. Desde allí, el siguiente órgano del recorrido es el pulmón, a través del corazón. Las partes distales del recto son drenadas directamente al pulmón por lo que resulta lógico que los tumores de recto generen metástasis más frecuentemente en órganos torácicos que los de colon<sup>40</sup>. Asimismo, la sección colorectal en su totalidad comparte un drenaje linfático común que desemboca en la vena subclavia y pulmones. De esta manera, la dispersión de células malignas desde la localización del tumor primario podría darse tanto por vía hemática como linfática.

Además, las metástasis podrían propagarse a través del fluido de la cavidad peritoneal. Los carcinomas mucinosos, debido a la secreción mucosa, serían más capaces de propagarse por el peritoneo o establecerse allí por lo que se consideran más agresivos<sup>41</sup>.

Las metástasis en sistema nervioso ocurren usualmente en conjunto con las respiratorias que, a su vez, requerirían más tiempo para desarrollarse que las hepáticas<sup>42</sup>.

Cabe mencionar que el perfil mutacional que caracteriza a una metástasis no necesariamente coincide con el del tumor primario.

### *Terapias actuales*

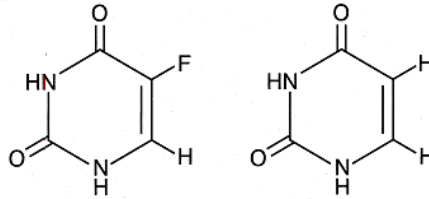
En estadios tempranos del CCR la cirugía suele ser curativa aunque la mayoría de los pacientes, excepto los correspondientes a estadio I, son sometidos a quimioterapia (QT) adyuvante con el fin de reducir el riesgo de recaídas.

La adyuvancia consiste en aplicar QT posteriormente a la cirugía con el fin de erradicar micro-metástasis persistentes o, en pacientes metastásicos, tratar las metástasis ya establecidas. Por esta razón, tendrá diferentes efectos en pacientes de estadios tempranos y tardíos. La terapia adyuvante involucra principalmente esquemas de 5-fluorouracilo (5-fu) en combinación con oxaliplatino (oxa). 5-fu es considerada la droga estándar en el tratamiento adyuvante de pacientes de estadios III y II con alto riesgo. La adyuvancia es controversial en pacientes de estadio II ya que un subgrupo de ellos -los de alto riesgo, tumor T4 o pobremente diferenciados- mejoraría su pronóstico mientras que el resto no se vería beneficiado en gran medida<sup>43</sup>. En la tabla 3 se muestran los principales esquemas de QT administrados en CCR, implican 5-fu y oxa en distintas dosis en combinación con leucovorin (ácido fólico), capecitabina (precursor del 5-fu) e irinotecan (inhibidor de topoisomerasa I).

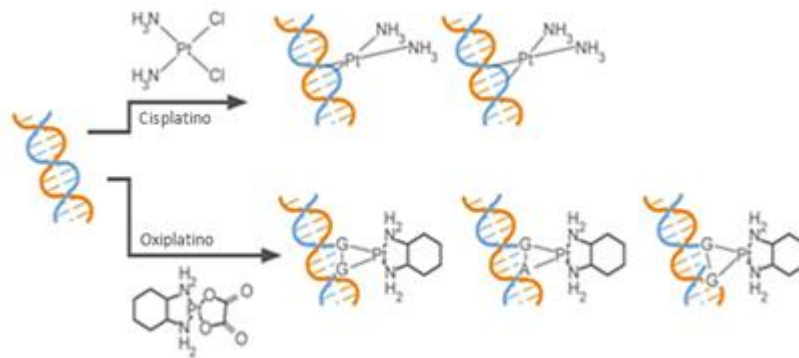
**5-fluorouracilo:** Es un antimetabolito. Se une irreversiblemente a la enzima timidilato sintasa (TS), desplaza a dUTP -sustrato de TS- por similitud estructural (Figura 9), inhibiendo así la síntesis de timidina, necesaria para la replicación del ADN. Es una droga específica de la fase celular S.



**Oxaliplatino:** Es un agente alquilante. Inhibe la síntesis de ADN por la formación de puentes inter e intra-catenarios en las hebras de ácido nucleico como otros platinos (Figura 10).



**Figura 9:** Estructuras de 5-fu (derecha) y uracilo (izquierda).



**Figura 10:** Mecanismo de acción de platinos como agentes alquilantes del ADN. Imagen adaptada de Kline & El-Deiry 2013.

| Régimen   | Drogas                            |
|-----------|-----------------------------------|
| FOLFOX    | Leucovorin, 5-fu, oxa             |
| FOLFIRI   | Leucovorin, 5-fu, irinotecan      |
| CapeOx    | Capecitabina, oxa                 |
| FOLFOXIRI | Leucovorin, 5-fu, oxa, irinotecan |

**Tabla 3:** Regímenes posibles de QT administrados en adyuvancia a pacientes con CCR.

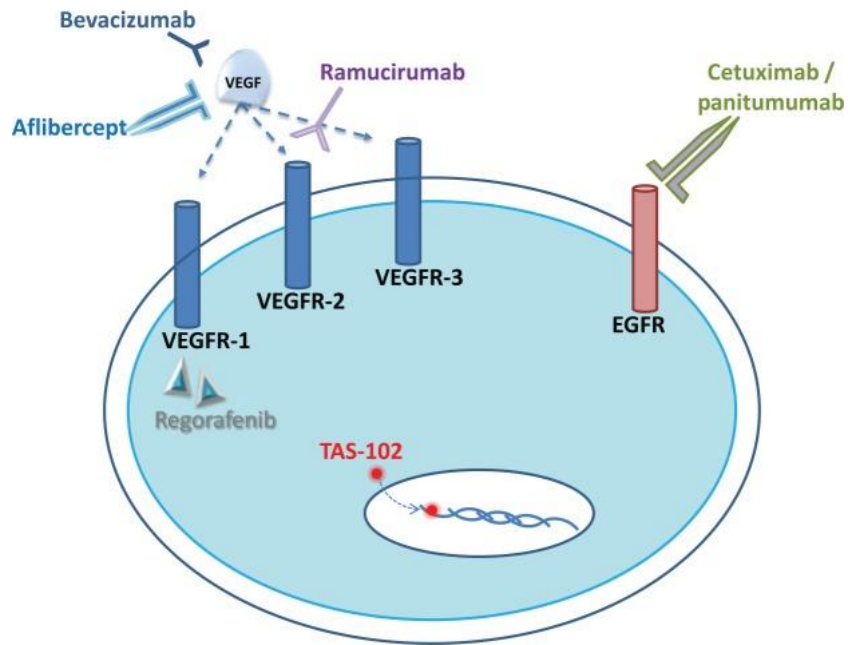
De producirse una recaída, se administran tratamientos quimioterápicos que pueden incluir nuevamente 5-fu, oxa y, además, anticuerpos monoclonales

(AcMs) como Cetuximab y bevacizumab. Usualmente, las combinatorias de QT y AcMs presentan distintos grados de efectos adversos como fatiga, vómitos, hipertensión, *rash* cutáneo, neurotoxicidad y mala cicatrización. Los pacientes metastásicos pueden recibir sucesivas líneas de tratamiento y las drogas administradas son re-evaluadas en cada ciclo de acuerdo a toxicidad y resistencia en el ciclo anterior.

En algunos casos, se administra terapia neoadyuvante a pacientes con cáncer de colon previamente a la cirugía que incluye radioterapia y dosis de 5-fu.

La terapia para pacientes con cáncer de recto involucra generalmente QT y radiación como neoadyuvancia previa a la cirugía con el fin de inducir regresión tumoral e incrementar la probabilidad de una cirugía con márgenes negativos exitosa y así, reducir el riesgo de recaída local. A su vez, se administra usualmente QT adyuvante para reducir el riesgo de metástasis a distancia<sup>44</sup>. Parte de los pacientes que reciben tratamiento neoadyuvante y montan una respuesta completa pueden continuar un protocolo *watch and wait*, no invasivo sin cirugía, y alcanzarían una sobrevida similar a aquellos que son sometidos a resección rectal, aunque aun los pacientes con remisión total representan un bajo porcentaje del total<sup>45</sup>. Luego del tratamiento neoadyuvante, si no se presenta una respuesta completa, se realiza la cirugía de resección (aproximadamente 8 semanas después) ya que inicialmente la radiación induce fibrosis tisular que dificultaría técnicamente la operación<sup>46</sup>.

Si bien actualmente el principal régimen terapéutico en CCR es la QT, en los últimos años se han sumado enfoques alternativos con aprobación por la *Food and drug administration* (FDA) de drogas dirigidas a blancos específicos (Figura 11), administradas en esquemas metastásicos. Tanto la elección del tratamiento, como su combinación con otras terapias y la secuencia temporal de las mismas constituyen el desafío del momento frente a la heterogeneidad del CCR.



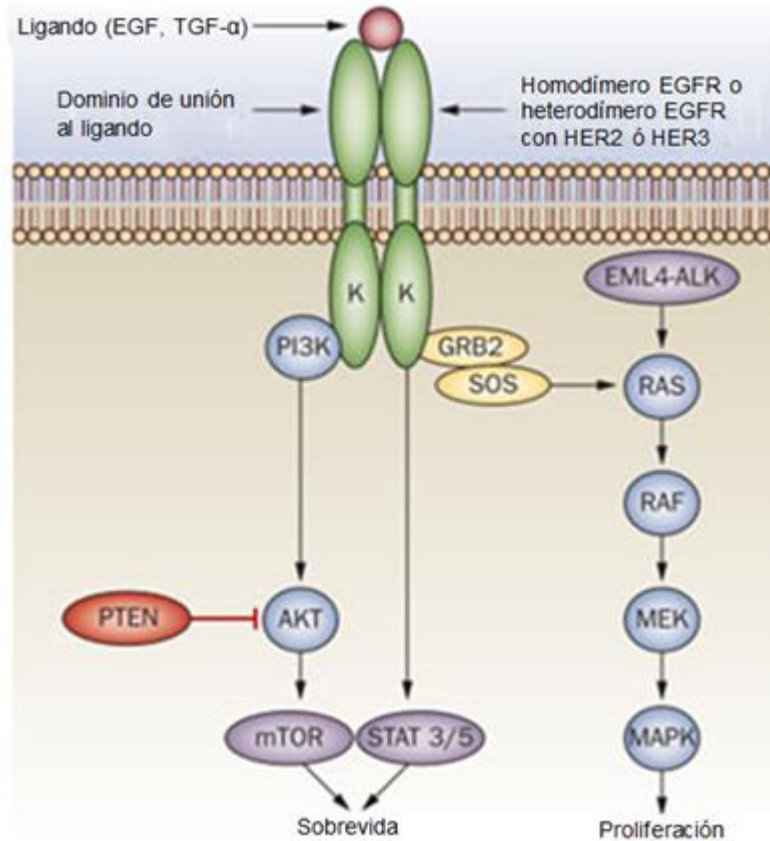
**Figura 11:** Mecanismo de acción esquemático de siete drogas aprobadas para su uso en CCR. Imagen tomada de Moriarity et al. 2016.

Como mencionamos anteriormente, la angiogénesis es un proceso de vascularización que ocurre en un tumor en crecimiento que enfrenta falta de nutrientes e hipoxia<sup>47</sup>. Ésta favorece la liberación de VEGF por la vasculatura existente y por células tumorales, entre otros mediadores solubles, que promoverá la proliferación y migración de células endoteliales y la remodelación de la matriz extra-celular<sup>48</sup>. VEGF se une a su receptor (VEGFR) en la membrana de células endoteliales y activa la señalización río abajo mediada por el dominio intra-celular tirosin-kinasa del receptor.

Bevacizumab es un AM recombinante (IgG1), humanizado, que une todas las formas solubles de VEGF, impidiendo así su reconocimiento por VEGFR. Está demostrado que estabiliza la vasculatura tumoral y mejora la llegada sistémica de agentes quimioterápicos<sup>49</sup>.

La familia de receptores tirosin-kinasa ErbB/HER comprende las formas EGFR (ErbB-1/HER-1), ErbB-2/HER-2, ErbB-3/HER-3 y ErbB-4/HER-4<sup>50</sup>. EGFR es

una glico-proteína de membrana ubicua. Reconoce sus ligandos -EGF principalmente y en menor medida TGF- $\alpha$ -, se dimeriza y autofosforila su dominio tirosin-kinasa activando una cascada de señalización, incluye RAS, RAF, MEK, MAPK y PI3K, que desemboca en supervivencia y proliferación celular (Figura 12).



**Figura 12:** Cascada de señalización de EGFR. Imagen adaptada de Janku et al 2010.

Parte de las potenciales variables que influyen en la señalización de EGFR incluyen: expresión tumoral de EGFR, mutaciones o modificaciones post-transcripcionales de EGFR, heterodimerización del receptor, interacciones con otros receptores de factores de crecimiento, inter-relaciones con otras vías de señalización *downstream* y expresión de sus ligandos<sup>51</sup>.

La expresión elevada de EGFR se asocia con tumores sólidos como el de pulmón, mama y colorectal. 97% de los tumores de CCR expresan el receptor<sup>52</sup>. Por este motivo, se lo ha estudiado como posible blanco de terapias, emergiendo así los AMs Cetuximab y panitumumab.

Cetuximab es un anticuerpo (IgG1) quimérico - con porciones constantes humanas y variables murinas-. Se une específicamente a EGFR compitiendo con EGF y evitando el desencadenamiento de la señal río abajo. Presenta una vida media en el organismo de 114hs y se administra en protocolos de una vez por semana.

El AM Cetuximab inhibe totalmente la interacción del receptor con el ligando, favoreciendo la apoptosis de la célula blanco. Asimismo, la internalización del complejo cumpliría un rol importante ya que, mientras que los complejos EGF-EGFR se disocian fácilmente a pH 5 en el compartimento endosomal, Cetuximab-EGFR permanece unido en tales condiciones por lo que será destinado a degradación lisosomal<sup>53</sup>.

Panitumumab es un anticuerpo recombinante totalmente humano (IgG2) que reconoce EGFR evitando la activación de la vía de manera similar a Cetuximab. No están bien definidas las ventajas de uno sobre el otro aunque una de las características de Cetuximab es que, al ser IgG1, tiene la capacidad de iniciar una actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo (ADCC) -que mencionaremos más adelante- mientras que panitumumab no<sup>54</sup>.

Las mutaciones KRAS se encuentran en el 40-45% de los tumores de CCR y las mutaciones del gen BRAF en el 10%. Ambas implican que la vía de proliferación estará activada independientemente del reconocimiento de EGFR por su ligando. Así, la presencia de mutaciones en cualquiera de estos genes es tomada en consideración como predictor negativo de respuesta a AMs cuyo blanco es EGFR. De esta manera, aunque aún sigue siendo controversial, en pacientes donde se halla alguna de estas mutaciones, no se administra Cetuximab. Si las

características genéticas del tumor son BRAF wt/ KRAS wt, los pacientes podrán recibir como terapia de primera o subsiguiente línea una combinación de Cetuximab con QT y/o vemurafenib (inhibidor de BRAF)<sup>55</sup>.

Otros tratamientos aprobados en CCR, menos utilizados incluyen el AM ramucirumab (bloqueante de VEGFR), ziv-aflibercept (proteína recombinante de unión a VEGF), regorafenib (molécula pequeña inhibidora de proteínas kinasas) y, TAS-102 (análogo del nucleósido timidina)<sup>55</sup>.

### ***Inmunoterapia en CCR***

Existen múltiples abordajes inmunoterapéuticos para tratar el CCR metastásico, no obstante el principal tratamiento continúa siendo la QT que, adicionalmente a su citotoxicidad neoplásica, podría beneficiar la respuesta inmune por medio de mecanismos tales como la muerte inmunogénica o la regulación del perfil de ciertas células del sistema inmune. Un ejemplo resulta la droga 5-fu que favorece la eliminación de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC). Se han realizado ensayos de inmunoterapias propuestas en pacientes metastásicos de CCR aunque en un número significativamente limitado<sup>56</sup>:

**-Depleción de células T regulatorias (Treg):** Se realiza mediante anticuerpos anti-CD25, los resultados de los estudios han sido contradictorios.

**-Terapia adoptiva de células T autólogas:** Se trata de linfocitos T específicos contra antígenos tumorales, estimulados *ex vivo* con IL-2. Aunque estas células pudieran evadir el microambiente tumoral inmunosupresor, obtener ganglios drenantes del tumor complica la cirugía y es difícil conseguir suficiente número de células.

**-Receptores de antígenos quiméricos (CARs):** Son linfocitos T, con TCR específicos para el antígeno CEA, que no requieren presentación antigénica. En varios casos resultó una terapia deletérea.

**-Vacunas anti-tumorales:** Se han realizado vacunas de ADN dirigidas contra el antígeno CEA de las que ninguna mostró regresión clínica en pacientes. Vacunas de células dendríticas (CD) con antígenos cargados activaron la respuesta T pero sigue en duda si son capaces de contrarrestar la inmunosupresión del microambiente tumoral.

**-Adyuvantes derivados de patógenos:** Constituyen potenciadores inmunes derivados de bacterias o virus. Para pacientes con cáncer de colon de estadio II, se vieron resultados frente a vacunas de células tumorales irradiadas inyectadas junto con BCG, aunque pacientes de cáncer de recto no respondieron.

**-Citoquinas como adyuvantes:** Se administran con el fin de activar el sistema inmune y generar células T de memoria. Pacientes tratados con factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) demostraron mayor respuesta y liberación de IFN $\gamma$ .

**-Bloqueo de *immune checkpoint* “antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico” (CTLA-4):** Se realiza con anticuerpos anti-CTLA-4. Los ensayos no dieron resultados concluyentes.

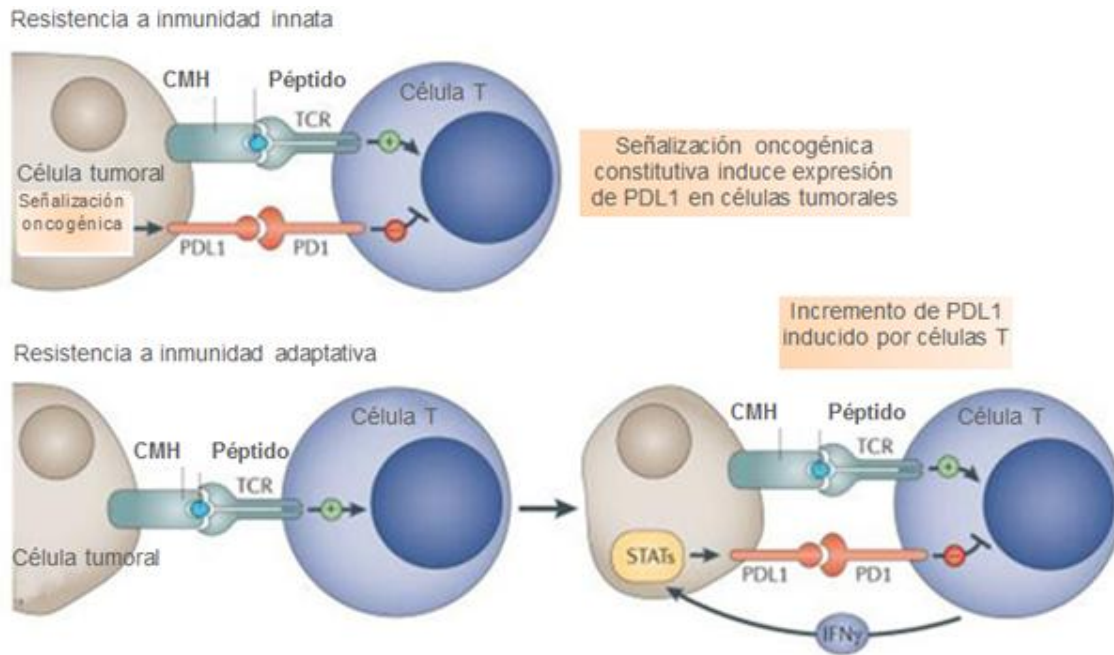
**- Bloqueo de *immune checkpoint* “muerte programada 1”/“ligando de muerte programada 1” (PD-1 /PDL-1):** Se realiza con anticuerpos anti-PD-1 o anti-PDL-1. Estudios con pocos pacientes no dieron resultados concluyentes.

**Eje PD-1/PDL-1 en CCR**

Los *immune checkpoints* corresponden a puntos de control y freno de la respuesta inmune con el fin de no dañar tejidos sanos. La respuesta inmune se auto-regula, al dispararse una señal positiva se disparará luego una negativa. Esto se lleva a cabo mediante distintos tipos de receptores inhibitorios como CTLA-4 y PD-1 expresados en la superficie de células T. Este último reconoce como ligandos las moléculas PDL-1 (B7H1) y PDL-2(B7-DC) presentes en CD o en tejidos<sup>57</sup>. Se ha visto en muchos tumores una expresión incrementada de PDL-1/2 como mecanismo de escape- del escape inmune hablaremos más adelante- . El aumento de PDL-1/2 se da por dos mecanismos diferentes (Figura 13), en algunos tumores la señalización oncogénica constitutiva puede incrementar la expresión de PDL-1/2 mientras que, en otros tumores aumenta en respuesta a señales inflamatorias correspondientes a una respuesta anti-tumoral como la liberación de IFN $\gamma$  por linfocitos T (estos tumores se encontrarían infiltrados)<sup>58</sup>. Se han desarrollado AMs cuyo blanco son las moléculas PD-1 o PDL-1 llamados nivolumab o pembrolizumab y avelumab respectivamente.

Mencionamos anteriormente que el infiltrado inmune correlaciona con un buen pronóstico en pacientes con CCR. A su vez, vimos que el microambiente tumoral puede desarrollar inmunosupresión. Pacientes de CCR con inestabilidad microsatelital, que presentan gran cantidad de neo-antígenos derivados de alta frecuencia mutacional, y en relación a esto, mayor infiltrado inmune, se verían beneficiados por el bloqueo de *immune checkpoints*<sup>5960</sup>.





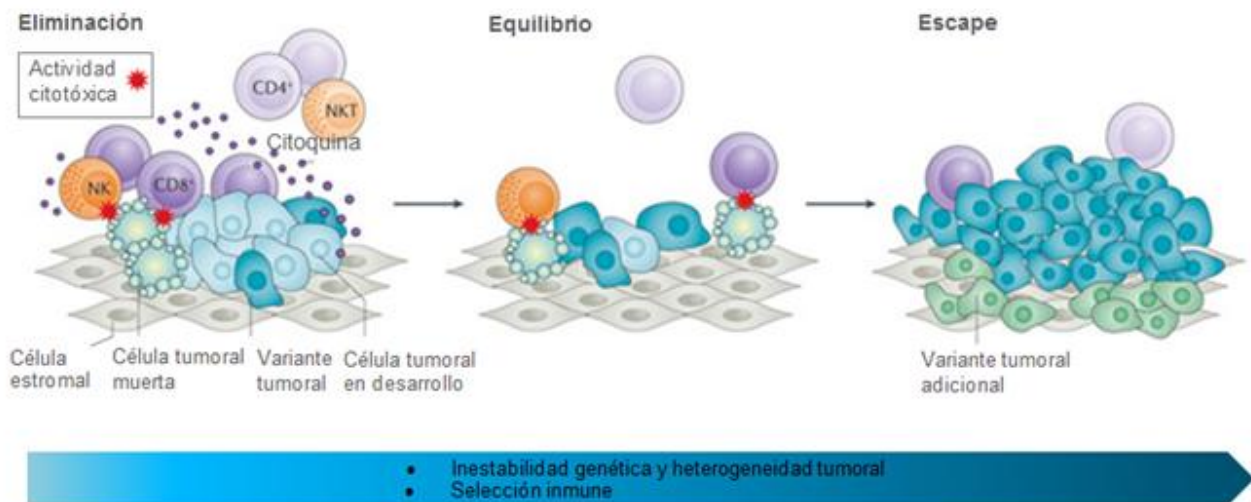
**Figura 13:** Mecanismos por los que un tumor expresa PDL-1 (señalización oncogénica constitutiva o contra-ataque a respuesta inflamatoria). Imagen adaptada de Pardoll, 2012.

## INMUNIDAD EN CÁNCER

Macfarlane Burnet y Lewis Thomas fueron los primeros en introducir el concepto de *inmunovigilancia* en 1950 según el cual el sistema inmune es capaz de reconocer células malignas. Si bien no pudo ser fundamentado con evidencia experimental, a lo largo de los años cobró importancia culminando con el desarrollo de la *Teoría de inmunodición de tumores*, la que sostiene que la inmunovigilancia sería la responsable, por un lado, de la eliminación de tumores y, por el otro, de modelar el fenotipo inmunogénico que caracteriza al tumor en un hospedador inmunocompetente<sup>61</sup>. De esta manera, en un organismo inmunosuprimido existiría mayor probabilidad de desarrollar un tumor mientras que, en uno competente, el reconocimiento de variantes tumorales favorecería la

eliminación de aquellas detectables por el sistema inmune omitiendo las menos inmunogénicas o más capaces de sobrevivir en un ambiente inmunocompetente.

La edición del cáncer incluye tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (Figura 14). En la primera etapa, el crecimiento tumoral generaría inflamación lo que atraería células de la inmunidad innata y linfocitos  $CD4^+$  y  $CD8^+$  al sitio tumoral, se producen citoquinas como  $IFN\gamma$  y existe muerte de células tumorales. En la fase de equilibrio, el sistema inmune funciona como una presión de selección que contiene al tumor pero no puede erradicarlo completamente, persiste la muerte celular y la formación de nuevas variantes tumorales. Se cree que, de las tres, es la fase más larga. En el escape, ciertas características intrínsecas adquiridas por las células tumorales, que les permiten evadir el control inmune, y mecanismos extrínsecos, que derivan en la inmunosupresión del ambiente, hacen posible la expansión tumoral <sup>62</sup>.



**Figura 14:** Progresión esquemática de la inmunoección del cáncer: fase de eliminación, equilibrio y escape. Imagen adaptada de Sjoerd et al. 2016.

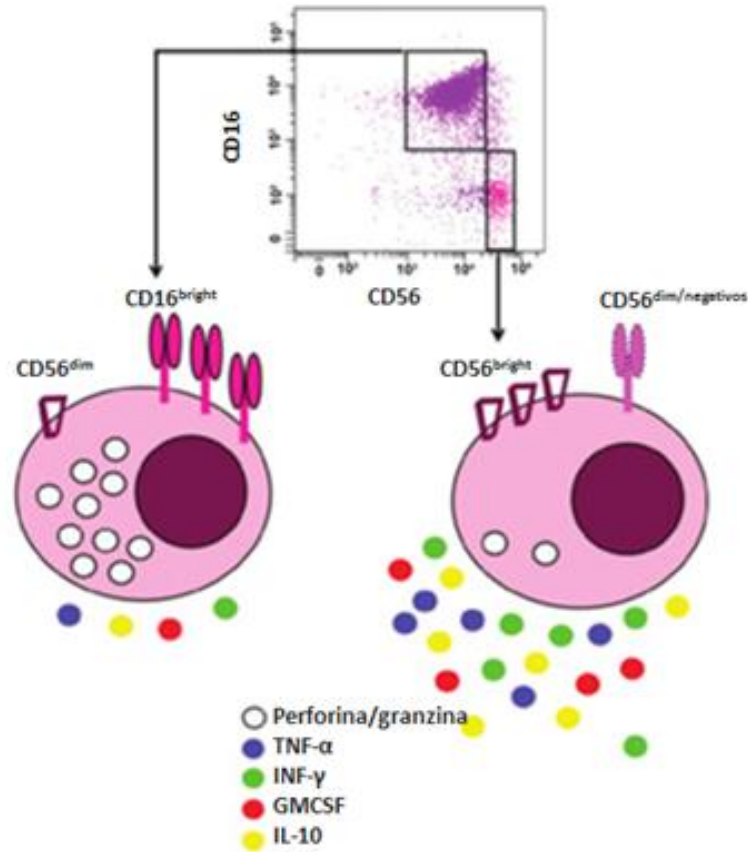
***Inmunidad innata y adaptativa***

Tradicionalmente se han agrupado mecanismos y tipos celulares del sistema inmune en inmunidad innata y adaptativa, comprendiendo la primera una barrera y contención inicial frente a la amenaza de patógenos que orienta el perfil de la segunda. La inmunidad innata abarca tanto células epiteliales que integran los tejidos, como células inmunes especializadas en el rápido reconocimiento de moléculas patogénicas, células infectadas por virus o bacterias y células transformadas. Dentro de este gran grupo se encuentran los granulocitos eosinófilos, basófilos, mastocitos y neutrófilos, los macrófagos, las CD y las células *Natural Killer* (NK). La inmunidad adaptativa comprende los linfocitos T y B y, a nivel humoral, anticuerpos específicos liberados por las células B. Esta última se diferencia por su mecanismo de reconocimiento de microorganismos –a través de epitopes antigénicos- mediante un único receptor, su forma de activación en ganglios linfáticos y posterior expansión clonal con consiguiente desarrollo de memoria inmunológica.

***Células NK***

Los linfocitos NK son incluidos en la inmunidad innata –por no requerir recombinación somática de genes como linfocitos T y B- aunque tienen la capacidad de modular la respuesta adaptativa. Cumplen un papel importante en estadios tempranos de la infección con microorganismos y, a su vez, reconocen y eliminan células tumorales. Pueden producir citoquinas como IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y múltiples quemoquinas. Ejercen actividad citotóxica sobre células blanco, sin previa sensibilización, mediante la liberación de granzimas y perforinas. Dicha activación está dada por la integración de señales positivas y negativas desencadenadas por múltiples receptores activadores e inhibitorios, respectivamente.

Constituyen el 5-15% de los linfocitos circulantes de sangre periférica (SP), con una vida media de dos semanas, identificándose por la expresión en membrana de la molécula CD56 y la ausencia de CD3 (Figura 15). De acuerdo a la intensidad de expresión de CD56 y del receptor CD16 se las clasifica en dos poblaciones: CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>bright</sup> (baja expresión de CD56 y alta de CD16) y CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>dim</sup> (alta expresión de CD56 y baja de CD16). Las primeras constituyen aproximadamente el 90% de las células NK totales en SP y las segundas el 10%. La subpoblación CD56<sup>bright</sup>, escasamente representada en SP, predomina en ganglios linfáticos debido a que presenta el receptor para la quemoquina CCR7 y la molécula de adhesión L-selectina o CD62L que permite la entrada a ganglio desde SP. La población CD56<sup>dim</sup> tiene la capacidad de circular e infiltrar tejidos inflamados –por expresión del receptor de quemoquina CXCR1- y de liberar gránulos citotóxicos<sup>2</sup>.

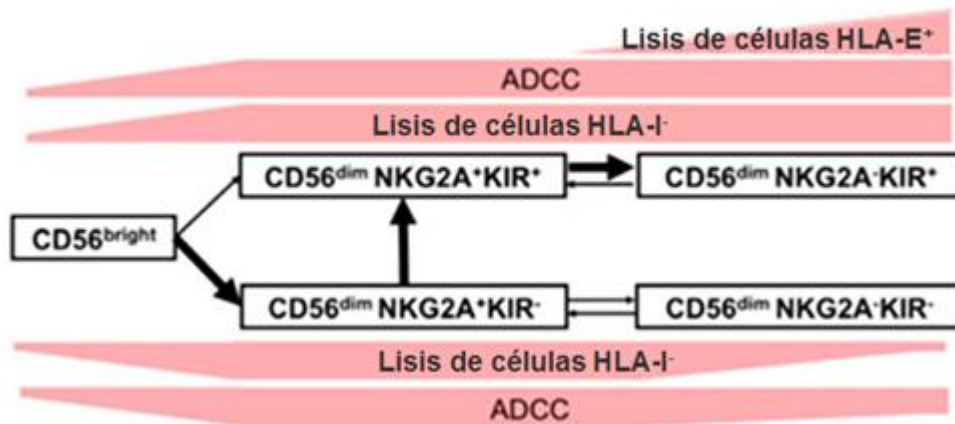


**Figura 15:** Identificación fenotípica de células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>. Imagen adaptada de Langers et al. 2012.

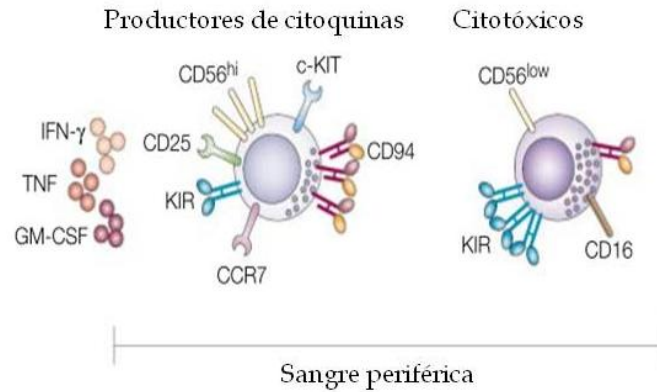
Las células NK se originan en médula ósea a partir de un progenitor linfóide común CD34<sup>+</sup> aunque existen estudios que afirman que ciertas poblaciones NK también pueden originarse en ganglio, hígado, timo y bazo. Adquieren marcadores de manera secuencial siendo unos de los primeros las moléculas CD161 y NKp44. El progenitor de células NK más temprano -comprometido con el linaje- expresa CD122 (cadena β del receptor de IL-2 e IL-15)<sup>63</sup>. Las células estromales de médula trans-presentan la IL-15, estimulando estos progenitores a precursores inmaduros de células NK que expresan receptores de tipo *killer cell Ig-like receptors* (KIR) y NKG2D. En este momento accederían a SP y, por expresión de

CCR7 y CD62L, migrarían a ganglio donde finalizarían su maduración. Las células CD56<sup>bright</sup> maduran a CD56<sup>dim</sup>, por acción de citoquinas liberadas por CD64<sup>65</sup>. Esta maduración parece estar orquestada por pérdida del receptor NKG2A y ganancia de KIRs. De esta manera, las células NK se diferenciarían de CD56<sup>bright</sup> con alta expresión de NKG2A y baja de KIRs, evolucionando a CD56<sup>dim</sup>NKG2A<sup>-</sup>KIR<sup>+</sup> a través de una serie de estadios intermedios fenotípicos, algunos de ellos reversibles, que determinan sus capacidades funcionales<sup>66</sup> (Figuras 16 y 17).

Asimismo, se habla de una maduración continua en SP, como sufren los linfocitos T, que luego de abandonar médula y ganglio, las células NK adquieren nuevos marcadores tales como *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)*<sup>63</sup>.



**Figura 16:** Modelo de diferenciación de células NK. Los distintos estadios presentan capacidad diferencial de atacar células blanco que expresan HLA-I en membrana, o en particular HLA-E. ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Imagen adaptada de Béziat et al. 2010.

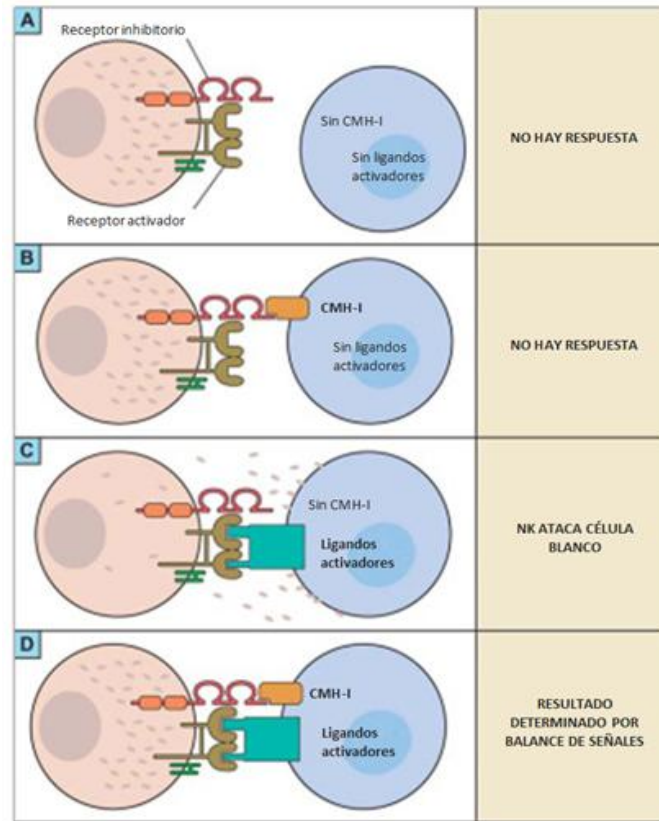


**Figura 17:** Esquema de las poblaciones CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> en SP. Imagen adaptada de Colucci et al. 2003<sup>67</sup>.

La activación de células NK puede producirse por acción de citoquinas proestimuladoras como IFN-I, IL-2, IL-15, IL-12 o IL-18 que, en el contexto orgánico, serían liberadas por monocitos, macrófagos y CDs. Dicha estimulación incrementa su propia producción de IFN $\gamma$ ; favorece un fenotipo de memoria (en subsiguientes estimulaciones la respuesta de células NK es mayor y puede perdurar meses)<sup>68</sup> y; disminuye el umbral de activación mediado por receptores activadores. De esta manera, la exposición a citoquinas, volvería a las células NK más respondedoras al mismo tiempo que desencadenaría señales de supervivencia y expansión clonal. La IL-15, en particular, es necesaria para la sobrevivencia de las células NK, como ocurre para los linfocitos T de memoria, aunque no es requerida para la activación celular<sup>69</sup>.

La activación de células NK ocurre, a su vez, por contacto directo con células infectadas por microorganismos o células transformadas, en las que reconocen moléculas de superficie, ligandos de sus receptores activadores o inhibitorios. Los primeros se unen a moléculas inducidas por estrés que generalmente se expresan por infecciones o daño en el ADN mientras que, los segundos se encargan de identificar principalmente moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (CMH-I), expresadas en casi la totalidad de las

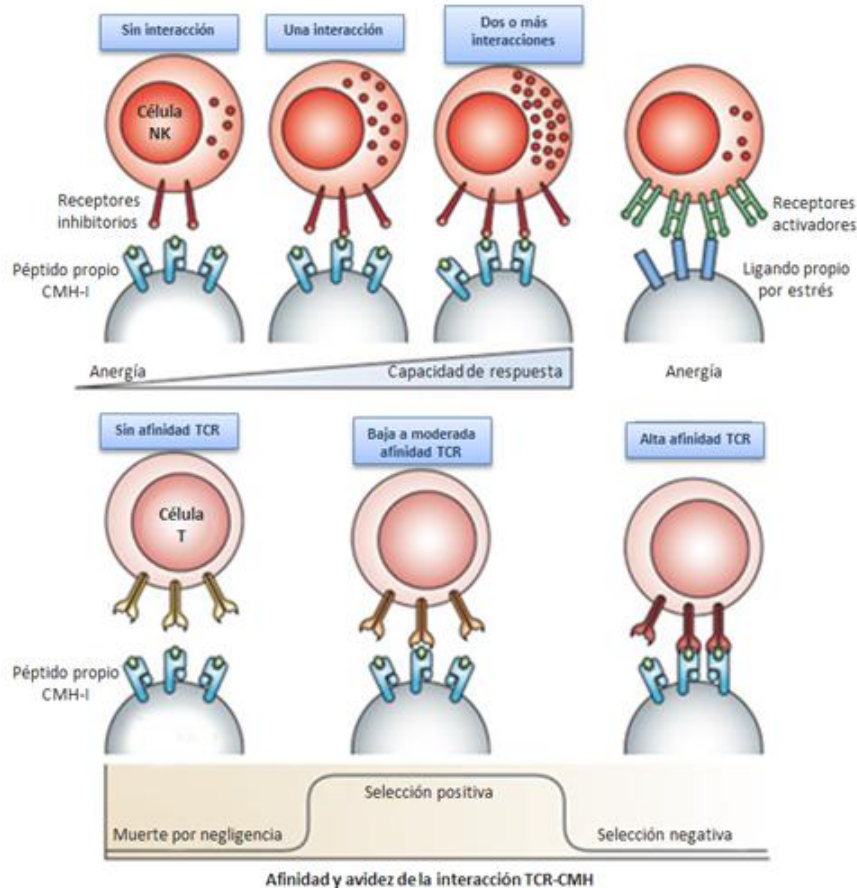
células normales del cuerpo. Esta configuración permite el reconocimiento de “lo propio” y evitaría el ataque de células normales y autoinmunidad. Esta premisa proviene de la hipótesis de *missing-self*, la que propone que los linfocitos NK proveen inmunovigilancia sobre células que disminuyen la expresión del CMH-I, evento que frecuentemente acompaña la transformación celular. Una aclaración importante es que, adicionalmente, debe existir una señal positiva, ya que los receptores inhibitorios no determinan la activación sino que frenan la señal de los activadores (Figura 18). Tal es el mecanismo que previene la lisis de glóbulos rojos, que no expresan CMH-I y, no obstante, no son atacados por células NK<sup>70</sup>.



**Figura 18:** Hipótesis de *missing-self*. **A.** Si las moléculas de la célula blanco no son reconocidas por ningún receptor NK no se produce respuesta. **B.** Si la célula NK recibe sólo una señal negativa no actuará sobre la célula blanco. **C.** Si la célula NK reconoce una señal positiva que no es frenada por una negativa, actuará sobre la célula blanco. **D.** Si la célula NK recibe señales positivas y negativas, la respuesta estará dada por el balance integrado de ambas. Imagen adaptada de Lanier 2005.



Para poder llevar a cabo este mecanismo de reconocimiento de lo propio y lo extraño, las células NK son sometidas -durante su desarrollo- a educación, proceso análogo al que reciben los linfocitos T en el timo, de acuerdo a la unión de sus receptores inhibitorios con el CMH-I de células estromales y hematopoyéticas. Si el reconocimiento de dicha molécula fallara, por la falta del receptor o por inhabilidad de éste de interactuar con el CMH-I, las células NK resultantes serían hipo-respondedoras. Además, la unión de un receptor activador con ligandos propios o congénitos llevaría a anergia. De esta manera, se genera tolerancia, la que es evidenciada por un 10% de células NK hipo-respondedoras en SP<sup>63</sup> (Figura 19).



**Figura 19:** Educación comparativa para células NK en médula ósea y linfocitos T en timo. Durante el desarrollo, ambos tipos celulares interactúan con el CMH-I y sufren selección positiva o negativa. Imagen adaptada de Sun & Lanier 2011.

***Integración de señales***

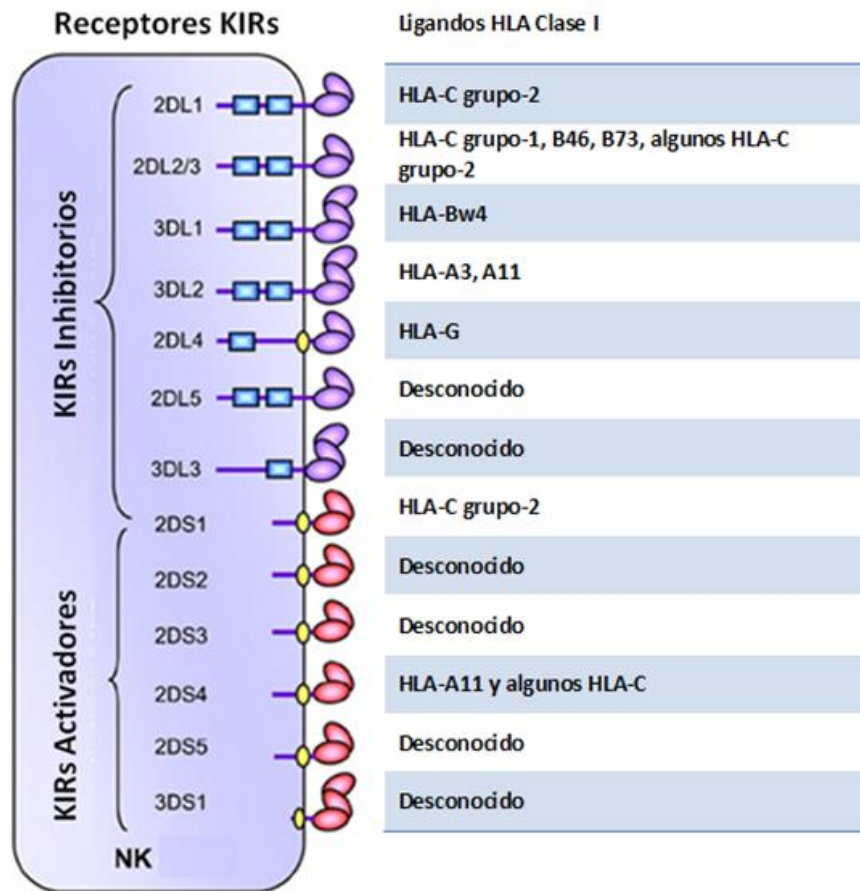
De acuerdo a la disposición génica, los principales receptores de células NK pueden clasificarse en KIRs, *leukocyte immunoglobulin-like receptors* (LILRs), *leukocyte-associated inhibitory receptors* (LAIR), *NK cell receptor complex* (NKC) y el receptor NKp46<sup>71</sup>.

***Receptores inhibitorios***

Dentro del repertorio de receptores inhibitorios se encuentran los que reconocen moléculas del CMH-I y los que reconocen otro tipo de moléculas. Todos ellos se caracterizan por un motivo citoplasmático común: *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM). Cuando los receptores encuentran sus ligandos, el residuo tirosina del ITIM es fosforilado y resulta en el reclutamiento de fosfatasa SHP-1 o SHP-2. Esto suprime la respuesta NK por desfosforilación de proteínas sustrato de las tirosin-quinasas ligadas a receptores activadores. El efecto es transiente y localizado espacialmente es decir que, no altera la capacidad de la célula NK de activarse por otro blanco que no presente ligandos inhibitorios<sup>72</sup>.

***KIRs (CD158)***

Los receptores que pertenecen a este grupo se caracterizan por ser poligénicos y polimórficos. Son de cadena simple, con una región extracelular -de dos o tres dominios de tipo inmunoglobulina- y una intracelular larga (L) con dominios ITIM asociados. Cada célula NK presenta entre uno y cinco receptores KIR por lo que existen múltiples combinaciones que varían de célula a célula y de individuo a individuo. Estos receptores reconocen distintas moléculas del CMH-I<sup>73</sup>. Dentro de este grupo se encuentran CD158a y CD158b (Figura 20).



**Figura 20:** Esquema de los receptores de tipo KIR y sus ligandos. Imagen adaptada de Rajalingam 2011<sup>74</sup>.

#### *CD94/NKG2A*

Forma parte de los receptores lectina tipo C. Consiste en un heterodímero unido por enlaces disulfuro entre CD94 -molécula invariante que carece de dominio citoplasmático- y NKG2A con dominios ITIM. Reconoce la molécula HLA-E, que interactúa principalmente con CD94<sup>75</sup>.

*CD85j (LIR-1, ILT2)*

Forma parte de los receptores LIR. Posee dominios ITIM y reconoce gran número de alelos de HLA-I clásicos y no clásicos, principalmente la molécula HLA-G asociada a  $\beta$ 2microglobulina<sup>76</sup>.

*CD161*

El receptor CD161 cumple un rol importante en las primeras etapas de la ontogenia NK. En células inmaduras, cumpliría un rol activador, asociado a secreción de citoquinas, que pierde en células maduras<sup>77</sup>. En éstas se vio que CD161 presentaría cierto efecto inhibitorio de la citotoxicidad, cuya regulación estaría dada por la composición de citoquinas del microambiente<sup>78</sup>.

El receptor CD161 se expresa, a su vez, en timocitos inmaduros en los que cumpliría, similarmente a células NK inmaduras, un rol regulatorio del crecimiento y funcionalidad<sup>79</sup>.

Asimismo, el ligando de CD161 *lectin-like transcript 1* es expresado por células de SP, células endoteliales y osteoblastos por lo que, se presume, tendría relevancia en *cross-talk* de células NK con otros tipos celulares durante la diferenciación<sup>80</sup>.

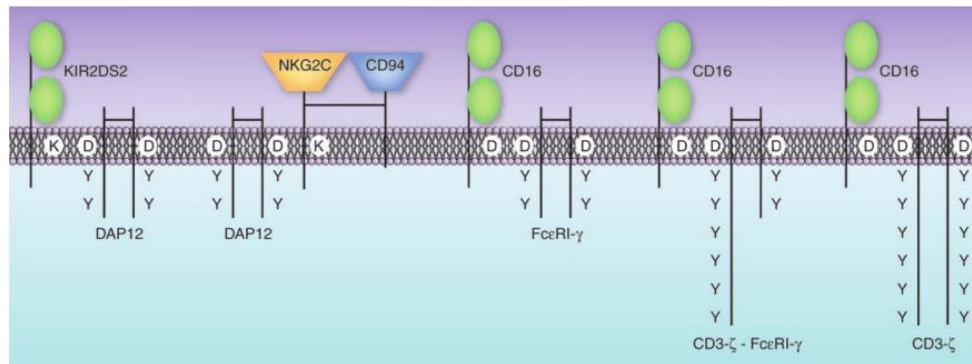
***Receptores activadores***

Las células NK no poseen un único receptor activador, como los linfocitos T y B, sino un conjunto de ellos. A excepción del CD16, ninguno de estos receptores solo es capaz de desencadenar la activación. Por esta razón, se los llama receptores co-activadores que colectivamente contrarrestan la señal negativa de los inhibitorios.

Los receptores activadores se asocian a distintas proteínas adaptadoras citoplasmáticas como CD3- $\zeta$  (NKp30 y NKp46), DAP10 (NKG2D) y DAP12

(NKp44, NKG2C, KIR2DS2) que contienen *immuno-receptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs). Los receptores y adaptadores se unen por cargas contrarias de aminoácidos en la región transmembrana. CD16 puede unirse tanto con la proteína CD3- $\zeta$  como con Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  (Figura 21).

El reconocimiento de los respectivos ligandos genera la fosforilación de las tirosinas del ITAM, lo que recluta las tirosin-kinasas Syk y ZAP-70 y permite la cascada de señalización. Las vías citotóxica y de producción de citoquinas estarían diferenciadas río abajo<sup>72</sup>.



**Figura 21:** Estructura de receptores de células NK con dominios ITAM. El CD16 puede formar homodímeros de CD3- $\zeta$  o Fc $\epsilon$ RI- $\gamma$  y los correspondientes heterodímeros. Las subunidades ITAM poseen residuos aspartato (D) en la región transmembrana que se asocian no covalentemente con lisina o arginina (carga contraria) de la porción transmembrana de los receptores (a excepción de CD16). Y: residuos tirosina de la porción intracitoplasmática de los dominios ITAM. Imagen adaptada de Lanier 2008.

### CD16

El receptor CD16 es un Fc $\gamma$ RIIIA -de afinidad intermedia- es decir que, reconoce los fragmentos constantes de inmunoglobulinas IgG y desencadena una señal activadora. Es el responsable de la ADCC producida por células NK<sup>81</sup>. La señal de este receptor induce no sólo citotoxicidad sino también liberación de IFN $\gamma$ .

*DNAM-1*

El receptor DNAM-1, también llamado CD226, forma parte de la familia de las inmunoglobulinas. Lo expresan principalmente células NK, linfocitos T y monocitos.

Sus ligandos son CD112 o *poliovirus receptor* (PVR) y CD155 o nectina-2, los que se encuentran ampliamente representados en tejidos y también en tumores. Su reconocimiento aumenta tanto la citotoxicidad como la liberación de citoquinas por las células NK. La activación a través de DNAM-1 estaría regulada por receptores inhibitorios de reconocimiento de HLA-I.

Este receptor cumple un rol trascendental en migración de distintos tipos celulares facilitando su adherencia a células endoteliales y a través de uniones celulares<sup>70</sup>.

*RECEPTORES DE CITOTOXICIDAD NATURAL (NCR)*

Este grupo de receptores pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y se expresa exclusivamente en células NK. Al activarse, promueven tanto citotoxicidad como liberación de citoquinas. Presentan baja homología entre sí e incluyen a NKp30, NKp44, NKp46 y NKp80<sup>71</sup>.

**-NKp30:** Expresado todas las células NK de SP. Reconoce el ligando B7H6.

**-NKp44:** Se expresa sólo en células NK activadas. Posee un dominio ITIM por lo que bajo ciertas circunstancias sería capaz de generar una señal inhibitoria. Reconoce hemaglutininas virales, no se conoce con exactitud sus ligandos en células tumorales.

**-NKp46:** Expresado en todas las células NK de SP, en algunos casos se lo considera marcador de la población. Reconoce hemaglutininas virales, no se conoce con exactitud sus ligandos en células tumorales.

*NKG2D*

El receptor NKG2D se expresa en células NK, linfocitos T y macrófagos. La unión de NKG2D con sus respectivos ligandos induce degranulación aunque no es suficiente para producir IFN $\gamma$ . Este receptor constituye un complejo hexamérico, un homodímero asociado con dos homodímeros de las proteínas adaptadoras DAP10. Reconoce las moléculas *MHC class I chain-related molecules A and B* (MICA y MICB) -codificadas dentro del CMH- y las *UL16-binding proteins* (ULBP). Generalmente se encuentran basalmente expresados en tejidos sanos y se inducen por estrés<sup>82</sup>.

*CD94/NKG2C*

Contraparte del dímero CD94/NKG2A. Reconoce el mismo ligando y presenta residuos ITAM aunque con una afinidad menor<sup>83</sup>.

*KIRs (CD158)*

Estructura similar a los KIRs inhibitorios aunque el dominio citoplasmático es corto (S) (Figura 20).

**Otros receptores**

**TOLL:** Las células NK presentan *tol-like receptors*, receptores clave de la inmunidad innata<sup>84</sup>.

**FasL:** Receptor de muerte, pertenece a la familia de TNF. Genera apoptosis en células que expresan la molécula Fas.

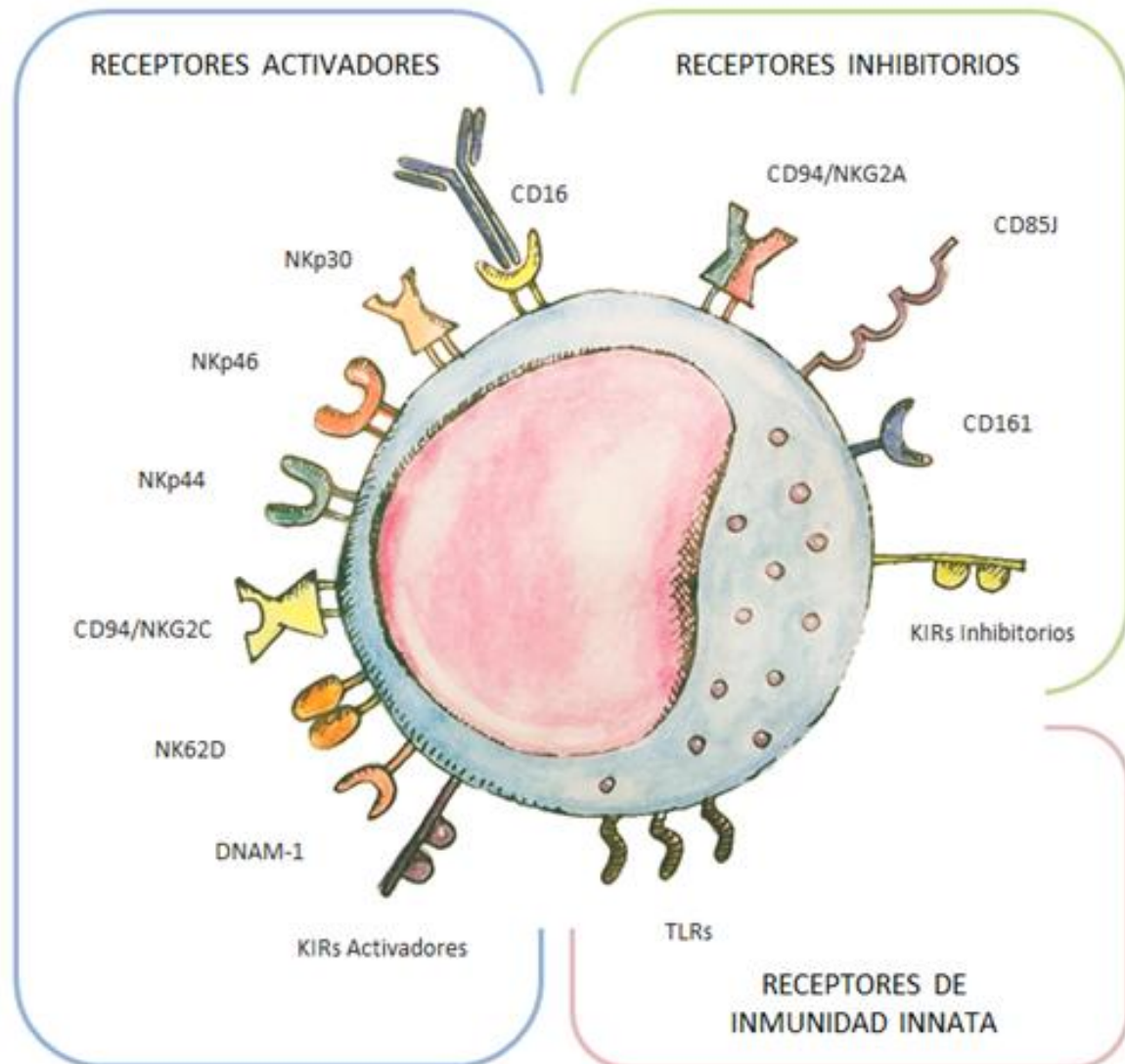
**TRAIL:** Receptor de muerte, pertenece a la familia de TNF. Transduce señales apoptóticas a células tumorales a través de DR4 y DR5<sup>85</sup>.

**Tim-3:** Marcador de diferenciación expresado principalmente en CD56<sup>dim</sup>. Se induce por activación con citoquinas y regularía negativamente la citotoxicidad<sup>86</sup>.

**CD57:** Marcador de diferenciación. Las células NK que expresan CD57 son menos respondedoras a citoquinas y proliferan en menor medida aunque tienen mayor capacidad citotóxica<sup>87</sup>.

**TIGIT:** Receptor inhibitorio que reconoce PVR o CD112. Expresado en células NK y en todos los *subsets* de linfocitos T. Posee mayor afinidad por CD112 que el receptor DNAM-1<sup>88</sup>.





**Figura 22:** Esquema de receptores expresados por células NK. Una célula NK no expresa todos los receptores de manera simultánea, cada célula presenta 3-5 receptores activadores y 3-5 receptores inhibitorios.

## FUNCIÓN CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK

### ***Degranulación: liberación de granzimas y perforinas***

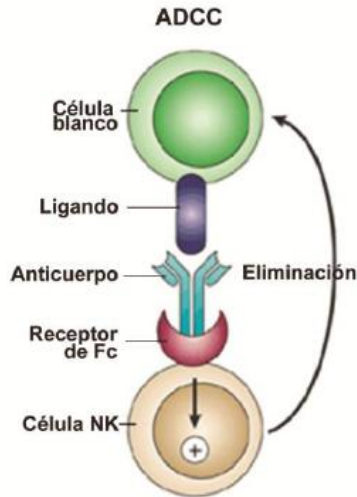
La liberación de granzimas y perforinas es la forma más rápida de lisar células tumorales. Mediante una sinapsis lítica, la célula NK se asocia con la célula blanco y, en la unión, secreta estas moléculas que inducen apoptosis. De esta manera, la degranulación es un proceso vectorial que involucra la reorganización del citoesqueleto y la movilización intracitoplasmática de gránulos citotóxicos.

Las granzimas son serin-proteasas que activan la vía de las caspasas mientras que las perforinas son proteínas desestabilizantes de membrana.

Existen dos mecanismos por los cuales la célula blanco es lisada. El primero implica la formación de un poro en su membrana plasmática y la entrada de granzimas. De acuerdo al segundo, las granzimas forman un complejo con las perforinas, junto con proteínas de alto peso molecular, que sería endocitado por la célula blanco a través de los receptores de manosa 3 fosfato. Una vez dentro de la vacuola, las perforinas se activarían, formarían poros en la membrana vacuolar y permitirían el acceso de las granzimas al citoplasma con la consiguiente activación de caspasas. Estos mecanismos son similares a los desplegados por linfocitos T citotóxicos<sup>71</sup>.

### ***ADCC***

El proceso de ADCC implica el reconocimiento del fragmento Fc de una IgG por el receptor CD16 (Figura 23), desencadenando la liberación de gránulos citotóxicos y la producción de IFN $\gamma$ . Existen al menos dos polimorfismos en el receptor Fc de células NK que estaría asociado a la respuesta clínica diferencial en tratamientos con AMs a causa del potencial ADCC<sup>89</sup>.



**Figura 23:** Esquema de actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Imagen adaptada de Yokoyama & Plougastel 2003.

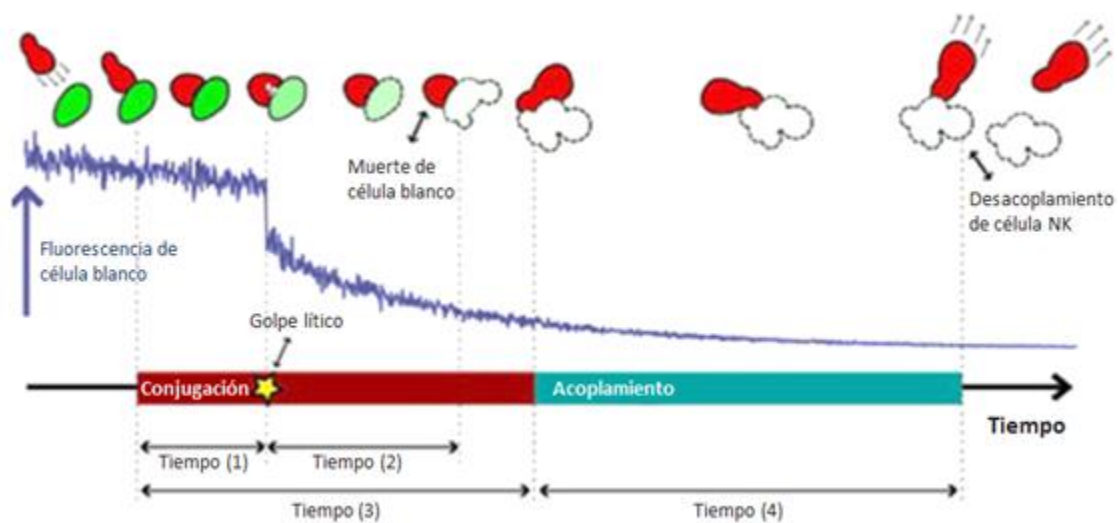
## SINAPSIS LÍTICA

La función citotóxica de las células NK está dada por la formación de una sinapsis lítica que determina la correcta secreción de granzimas y perforinas y la consecuente lisis de la célula blanco. Este proceso se encuentra altamente regulado por elementos del citoesqueleto (microtúbulos y filamentos de actina). Existe gran heterogeneidad entre células NK en cuanto a la efectividad en el reconocimiento de células blanco y el tiempo que requieren para lizarlas. La cantidad de gránulos exocitados correlaciona con una muerte más rápida de la célula atacada, caracterizada por necrosis, a diferencia de una muerte apoptótica producida por una interacción más prolongada. Una célula NK promedio es capaz de matar 4 células tumorales en 16hs<sup>90</sup>.

Si bien luego de una sinapsis y degranulación, pueden continuar buscando nuevos blancos y lizarlos, eventualmente la depleción de gránulos citotóxicos podría llevar las células NK al agotamiento. No obstante, existiría una subpoblación –poco caracterizada– de células NK de mayor tamaño que formarían

más uniones con células blanco, serían responsables de mayor cantidad de muertes y más resistentes al agotamiento<sup>90</sup>.

El proceso completo se desarrolla en distintas etapas: migración (involucra múltiples interacciones celulares), reconocimiento (las células NK reciben señales activadoras) y conjugación (la adhesión se torna más firme), golpe lítico (liberación de enzimas) y acoplamiento (Figura 24)<sup>91</sup>.



**Figura 24:** Fases de la inmunovigilancia NK. Las células NK (en rojo) migran hasta formar conjugados con células blanco (en verde) desencadenando la lisis de ésta –evidenciada por pérdida de fluorescencia intracelular de calceína-. En azul se muestra la intensidad de fluorescencia de calceína que muestra un claro decrecimiento luego del golpe lítico. En el eje y la línea de tiempo relativo para cada fase. Imagen adaptada de Vanherberghen et al. 2013.

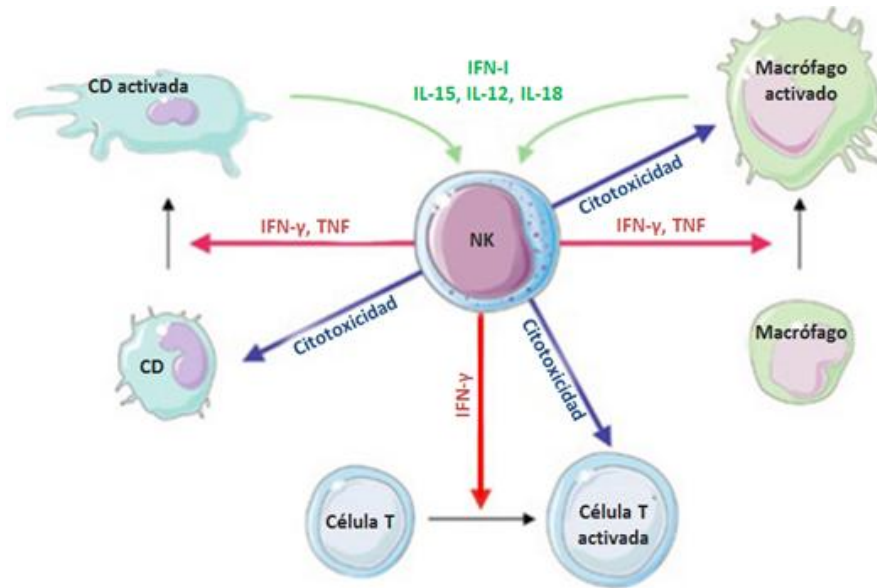
INTERACCIÓN CON OTRAS POBLACIONES INMUNES: CD, CÉLULAS T, MACRÓFAGOS

Así como los linfocitos T, las células NK requieren una estimulación previa o *priming* para activarse completamente. Este proceso ocurriría en ganglio linfático y estaría orquestado por CD provenientes del tejido inflamado que transpresentarían IL-15 a células NK *naive*<sup>92</sup>.

Asimismo, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18 -secretadas por CD, linfocitos T o macrófagos principalmente- estimulan, en tejidos periféricos o en ganglio, proliferación, citotoxicidad y liberación de citoquinas en células NK (Figura 25).

En ganglio linfático, las células NK activadas secretan IFN $\gamma$  que induciría una respuesta CD4<sup>+</sup> de tipo Th1 mientras, estos linfocitos, liberarían IL-12 lo que, a su vez, mantendría la estimulación de células NK. Paralelamente a su activación, las células NK podrían generar la apoptosis de linfocitos T en tejidos inflamados, a menos que expresen suficientes cantidades de CMH-I. Adicionalmente, los linfocitos Treg son productores de TGF- $\beta$ , citoquina inhibidora de la función NK. En este sentido, la interacción NK-T consiste en una regulación de la respuesta, no sólo estimulación de la misma<sup>2</sup>.

Las células NK tienen la capacidad de matar CD inmaduras que no expresan HLA-E. No obstante, la liberación de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  favorecería su maduración y posterior producción de IL-12. De esta manera, las células NK influirían en la homeostasis de la población de CD. Por otro lado, la lisis de células infectadas o tumorales por parte de células NK promovería la fagocitosis por CD y presentación de antígenos provenientes de dichas células apoptóticas. Esto llevaría a una fuerte respuesta adaptativa involucrando CD4<sup>+</sup> (mediante presentación por CMH-II) y CD8<sup>+</sup> (mediante presentación por CMH-I -presentación cruzada-)<sup>93</sup>.



**Figura 25:** Regulación de la respuesta inmune por células NK. Éstas pueden inducir la maduración de CD, macrófagos y linfocitos T (flechas rojas). A su vez, las células NK pueden lisar CD inmaduras, CD4<sup>+</sup> y macrófagos activados (flechas azules). Imagen adaptada de Vivier et al. 2008.

#### TERAPIAS QUE INVOLUCRAN CÉLULAS NK

Existen múltiples modelos *in vivo* en los que se estudia la administración de bajas dosis de IL-2 como potencial estimulante de la citotoxicidad de células NK en el contexto de tumores sólidos. Dicho tratamiento fue aprobado por la FDA en ensayos en pacientes con distintas patologías y, si bien en algunos casos se vio una respuesta clínica, los resultados no fueron concluyentes. La IL-2 activaría principalmente la población CD56<sup>bright</sup> -por presentar un receptor para IL-2 de alta afinidad- que se sabe desarrolla más un efecto regulador que citotóxico. Por tal razón, se propusieron combinatorias de IL-2 con otro tipo de factores como IL-12 o IL-15 que tendrían un efecto sinérgico. Asimismo, como las células tumorales y macrófagos asociados a tumor generan grandes cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducirían apoptosis o anergia de linfocitos T o células NK, se plantearon tratamientos combinatorios con anti-oxidantes que restablecerían el

efecto de IL-2. La administración conjunta de IL-2, IFN $\alpha$  o GM-CSF resultó prometedora<sup>94</sup>. Ciertos efectos adversos de la administración de IL-2 como la amplificación de la población Treg podría ser evitado e incluso contrarrestado por la IL-15<sup>95</sup>.

La IL-21 promueve la proliferación y maduración de múltiples leucocitos, incluyendo las células NK, por lo que también se la incluye en esquemas terapéuticos. Incrementa la expresión de CD16 y estimula la producción de IFN $\gamma$  y granzimas y perforinas<sup>96</sup>.

Los interferones de tipo I ( $\alpha$  y  $\beta$ ) constituyen un gran estímulo para las células NK induciendo proliferación y citotoxicidad. La administración conjunta de IFN $\alpha$  y AMs mostró un incremento de la ADCC, debida a células NK y macrófagos<sup>97</sup>.

Las drogas inmunomodulatorias (IMiD) como talidomida, lenalidomida y pomalidomida constituyen una nueva clase de medicamentos que estimulan linfocitos T y células NK. La talidomida aumenta el número de células NK en SP sugiriendo que existe mayor proliferación o migración<sup>98 99</sup>.

Los inhibidores del proteasoma como bortezomib actualmente se utilizan en diversas patologías. Una característica esencial es que, entre otros efectos, inhibe en células tumorales la capacidad de exponer en membrana moléculas del CMH y, a su vez, incrementaría de la expresión de Fas y DR5 (ligandos de los receptores de muerte FasL y TRAIL respectivamente). Esto las vuelve más susceptibles al ataque por células NK<sup>100</sup>.

Por otro lado, existen agentes que promueven la expresión de ligandos del receptor NKG2D en células tumorales, como inhibidores de histonas deacetilasas. Este incremento ocurre a nivel transcripcional, no afecta células normales y presentaría baja toxicidad por lo que resulta un enfoque interesante<sup>101</sup>.

Asimismo, existen anticuerpos bi-específicos diseñados para ligar transientemente células del sistema inmune a antígenos tumorales expresados en

la superficie. Esto resulta en la activación de las células inmunes –células NK o linfocitos T- y lisis de las células blanco. En CCR generalmente se utilizan anticuerpos que reconocen el antígeno CEA<sup>102</sup>.

## HIPÓTESIS

El CCR constituye uno de los cánceres de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial. Si bien ha sido estudiado desde múltiples enfoques inmunológicos, aún la quimioterapia continúa siendo la principal terapia para estos pacientes, con alta tasa de recaída.

Las células NK constituyen una importante barrera inicial al crecimiento tumoral y en los últimos años se han desenmascarado nuevos conceptos que podrían llevarnos a un mejor entendimiento de estas células. Ya no únicamente como defensores del ataque de virus, sino como una combinación de inmunidad innata y adaptativa con grandes similitudes a los linfocitos T.

Sabiendo que las células NK -especialistas en detectar células tumorales- circulan en sangre, tejidos periféricos y ganglios linfáticos patrullando, planteamos la hipótesis de que la presencia tumoral -en pacientes con CCR- inactiva, mediante mecanismos inmunosupresores, el normal desempeño de estas células, promoviendo así el escape tumoral.



OBJETIVOS GENERALES

Esclarecer el rol de las células NK en la inmunovigilancia del CCR, con el fin de comprender la relevancia clínica de estas células en el control tumoral, la progresión y la metástasis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Caracterizar fenotípica y funcionalmente células NK infiltrantes al tumor y de sangre periférica en pacientes con CCR.
- 2- Estudiar la relación entre fenotipo y función en células NK de pacientes con CCR.
- 3- Buscar factores inmunosupresores que afecten el status de células NK.
- 4- Evaluar la expresión de ligandos reconocidos por receptores de células NK en distintos modelos de estudio.
- 5- Estudiar *in vitro* la susceptibilidad de las células tumorales de CCR al tratamiento con drogas quimioterapéuticas y su impacto en la lisis por células NK.
- 6- Evaluar la relevancia de las células NK en el control inmunológico de la diseminación en pacientes con CCR.
- 7- Estudiar *in vitro* posibles combinaciones para incrementar la eficacia terapéutica.

# Materiales y Métodos

### MUESTRAS DE PACIENTES CON CCR Y DONANTES SANOS

Los objetivos planteados en esta tesis y la dinámica propuesta para la obtención de muestras de pacientes con CCR aprobados por el Comité de ética del Instituto Alexander Fleming (IAF). Los pacientes brindaron consentimiento informado para la utilización en investigación de las muestras.

Noventa y cuatro pacientes fueron incluidos en este estudio, de estadios I-IV según la clasificación TNM, sin presentar enfermedades colorectales concomitantes. Las muestras fueron tomadas al momento de la cirugía llevada a cabo en el Servicio de Cirugía del IAF. El criterio de inclusión implicó haber brindado consentimiento informado, tener más de 18 años y la disponibilidad de obtención de SP.

Treinta pacientes recibieron QT como tratamiento neoadyuvante previo a la cirugía mientras que el resto no tuvo exposición a QT luego del diagnóstico.

De cada paciente se obtuvo SP (3-15 ml) y tejido (tumor y mucosa normal adyacente) cuando fue posible. Como dichas muestras son limitadas, no todos los ensayos pudieron llevarse a cabo en todos los pacientes.

Asimismo, se analizaron tacos tumorales (tejido embebido en parafina) del Servicio de Patología del IAF.

Como controles, fueron analizadas muestras de SP de DS, obtenidas en el Servicio de Hemoterapia del IAF.

En la tabla 4 se muestra la distribución poblacional de la cohorte de pacientes y DS incluidos en el estudio.

| Características de los pacientes |                             |    |
|----------------------------------|-----------------------------|----|
| Sexo                             | Hombre                      | 47 |
|                                  | Mujer                       | 47 |
|                                  | ND                          | -  |
| Edad                             | <50                         | 20 |
|                                  | ≥50                         | 69 |
|                                  | ND                          | 5  |
| Localización                     | Colon derecho o transversal | 19 |
|                                  | Colon izquierdo             | 40 |
|                                  | Recto                       | 30 |
|                                  | ND                          | 5  |
| Estadio                          | I                           | 11 |
|                                  | II                          | 31 |
|                                  | III                         | 27 |
|                                  | IV                          | 18 |
|                                  | ND                          | 7  |
| Grado histológico                | Bien diferenciado           | 66 |
|                                  | Pobrememente diferenciado   | 19 |
|                                  | ND                          | 9  |
| Neoadyuvancia                    | Presenta                    | 30 |
|                                  | No presenta                 | 56 |
|                                  | ND                          | 8  |

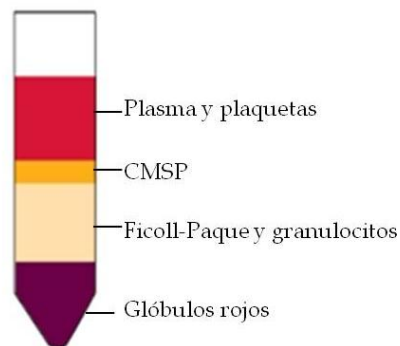
**Tabla 4:** Características clínicas e histológicas de pacientes con CCR  
Abreviación: ND= no disponible.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SP (CMSP)

Las muestras de SP fueron recolectadas en jeringas heparinizadas y las células mononucleares aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

La sangre fue diluida en partes iguales con PBS 1x y sembrada (hasta 20 ml) sobre el Ficoll-Paque (10 ml), en tubos de 50 ml. Se centrifugaron los tubos a 1500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Se tomó la interfase blanquecina (Figura 26) correspondiente a las CMSP - monocitos y linfocitos- y se lavó con 40 ml de PBS 1x centrifugando nuevamente a 1500 rpm por 5 minutos con el fin de eliminar restos de Ficoll-Paque. Finalmente, se re-suspendió la fase de CMSP en PBS 1x y se realizó el conteo en cámara de Neubauer.



**Figura 26:** Gradiente de densidad Ficoll-Paque luego de centrifugación para separación de componentes de SP.

### PURIFICACIÓN DE CÉLULAS NK

Las células NK fueron purificadas por selección negativa a partir de la población de CMSP mediante el kit de purificación NK (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Re-suspensión en 200  $\mu$ l de buffer MACS (PBS 1X, pH 7.2; BSA al 0,5%; y EDTA 2mM) cada  $50 \times 10^6$  CMSP.
- Adición de 50  $\mu$ l de *cocktail* de anticuerpos biotinilados (se unen a todo tipo de células de SP excepto células NK) e incubación por 7 minutos en hielo.
- Adición de 150  $\mu$ l de buffer MACS.
- Adición de 100  $\mu$ l de *cocktail* de *beads*. Incubar 12 minutos en hielo.
- Adición de 5 ml de buffer MACS y centrifugación a 1500 rpm por 10 minutos. Re-suspensión en 500  $\mu$ l de buffer MACS.
- Separación magnética en columnas colocadas sobre soporte imantado. Las columnas fueron previamente humectadas con 500  $\mu$ l de buffer MACS.
- Recolección de eluido de células no marcadas. Cuantificación y evaluación de pureza posteriormente mediante citometría de flujo.
- De desear recolectar la fase no-NK, se separan las columnas del soporte magnético y se eluye con buffer MACS.

### DISGREGACIÓN MECÁNICA DE MUESTRAS TUMORALES

Las muestras tisulares fueron seccionadas por médicos del Servicio de Patología del IAF, tomando parte tumoral y de mucosa adyacente macroscópicamente sana—a distancia mínima de 6 cm del tumor-.

Los tejidos fueron disgregados de forma mecánica a trozos de 1mm y colocados separadamente en placas MW24 en medio RPMI - 10% suero fetal

bovino (sfb) *over night* (ON). Los fragmentos de tejido liberan las células infiltrantes de su interior y, luego de la incubación, el medio fue colectado, lavado con PBS 1x y filtrado por filtros de poro de 40 µm obteniendo así una suspensión celular.

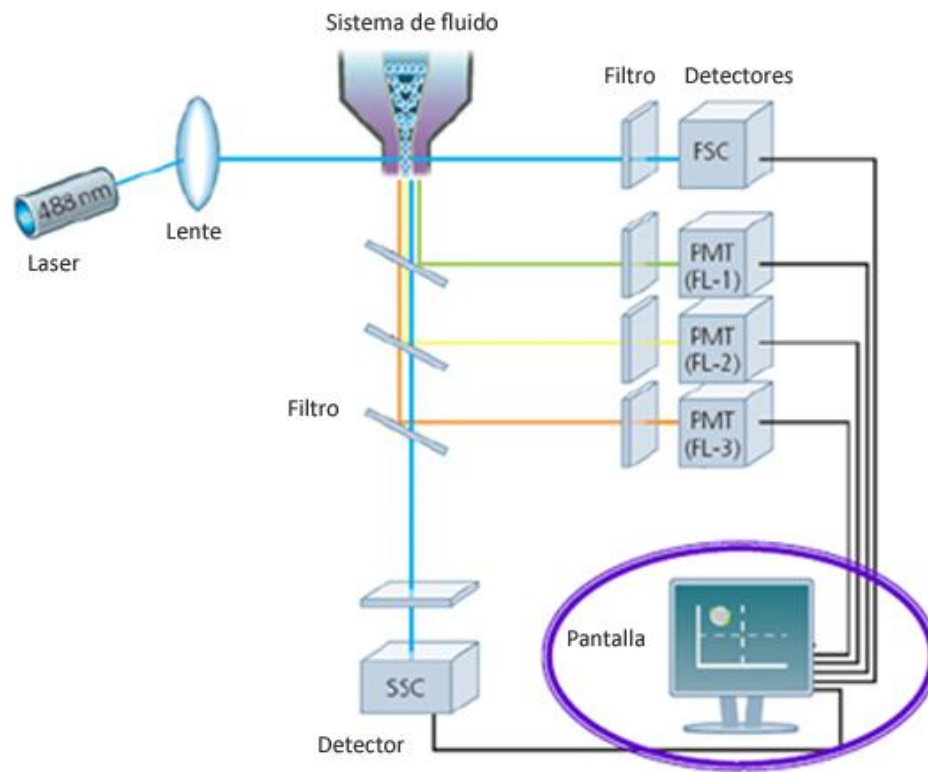
#### CITOMETRÍA DE FLUJO –FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)

La citometría de flujo se entiende en contraposición a la citometría estática -el microscopio-, como una herramienta que permite evaluar poblaciones y características celulares con alta capacidad de cuantificación. Analiza partículas individuales que emitan fluorescencia de manera multiparamétrica es decir que, es posible evaluar simultáneamente múltiples variables.

El principio funcional implica la medición de dispersión de la luz de una determinada fuente, mediante detectores, en el área de registro -donde se encuentra la célula-.

Los citómetros están compuestos por un sistema de fluidos -que contienen las células en suspensión-, una fuente de luz -a una determinada longitud de onda-, un sistema óptico -filtros y detectores- y, un sistema informático de adquisición de datos (Figura 27). Los datos recolectados por el citómetro son visualizados en forma de *dot plots* -diagramas de puntos- o en forma de histogramas, representados en escala lineal o logarítmica con respecto a la intensidad de la señal recibida.

Para detectar moléculas de interés en células de estudio, éstas son *marcadas* por anticuerpos específicos conjugados a fluorocromos que, excitados con determinada longitud de onda, emiten en otra que es capturada por el sistema de lentes. En la tabla 5 se detallan los anticuerpos utilizados, los fluorocromos correspondientes, la marca comercial y el clon.



**Figura 27:** Sistemas que componen un citómetro.



| Antibody        | Fluorochrome | Brand          | Clone     |
|-----------------|--------------|----------------|-----------|
| CD3             | FITC         | BD Biosciences | UCHT1     |
| CD3             | APC-H7       | BD Biosciences | SK7       |
| CD56            | APC          | BD Biosciences | NCAM 16.2 |
| CD56            | BV421        | BD Biosciences | NCAM 16.2 |
| CD16            | PE           | BD Biosciences | 3G8       |
| NKG2D (CD314)   | PE           | BD Biosciences | 1D11      |
| DNAM-1 (CD226)  | PE           | BD Biosciences | DX11      |
| NKp30 (CD337)   | PE           | BD Biosciences | P30-15    |
| NKp44 (CD336)   | PE           | BD Biosciences | p44-8.1   |
| NKp46           | PE           | BD Biosciences | 9E2/NKp46 |
| CD161           | PE           | BD Biosciences | DX12      |
| CD8             | PE           | BD Biosciences | RPA-T8    |
| CD158a          | PE           | BD Biosciences | HP-3E4    |
| CD158b          | PE           | BD Biosciences | CH-L      |
| NKG2A           | PE           | R & D System   | 131411    |
| CD85j           | PE           | BD Biosciences | GHI/75    |
| CD94            | PE           | BD Biosciences | HP-3D9    |
| CD107a          | PE           | BD Biosciences | H4A3      |
| CD107a          | FITC         | BD Biosciences | H4A3      |
| IFN- $\gamma$   | PE           | BD Biosciences | 4S.B3     |
| TRAIL           | PE           | BD Biosciences | RIK-2     |
| PD-1            | APC          | BD Biosciences | MIH4      |
| PDL-1           | APC          | Biologend      | 29E.2A3   |
| CD57            | BB515        | BD Biosciences | NK-1      |
| HLA-DR          | PerCPcy5.5   | BD Biosciences | G46-6     |
| TIM-3           | BB515        | BD Biosciences | 7D3       |
| NKp30 blocking  | -----        | R & D System   | 210845    |
| NKp46 blocking  | -----        | R & D System   | 195314    |
| DNAM-1 blocking | -----        | R & D System   | 102511    |
| NKG2D blocking  | -----        | R & D System   | 149810    |

**Tabla 5:** Anticuerpos monoclonales utilizados, fluorocromos correspondientes, marca comercial y clon.

#### MARCACIÓN DE ANTÍGENOS DE MEMBRANA

Se colocaron  $2,5 \times 10^5$  células lavadas con PBS 1x en tubos de FACS en un volumen de 50  $\mu$ l. Se adicionaron los anticuerpos correspondientes a la concentración determinada por la titulación de los mismos. Se incubó 30 minutos a

4-8°C al resguardo de luz. Luego se adicionó 1 ml de PBS 1x y centrifugó 5 minutos a 1500 rpm. Las células fueron re-suspendidas en 200 µl de PBS y analizadas por FACS.

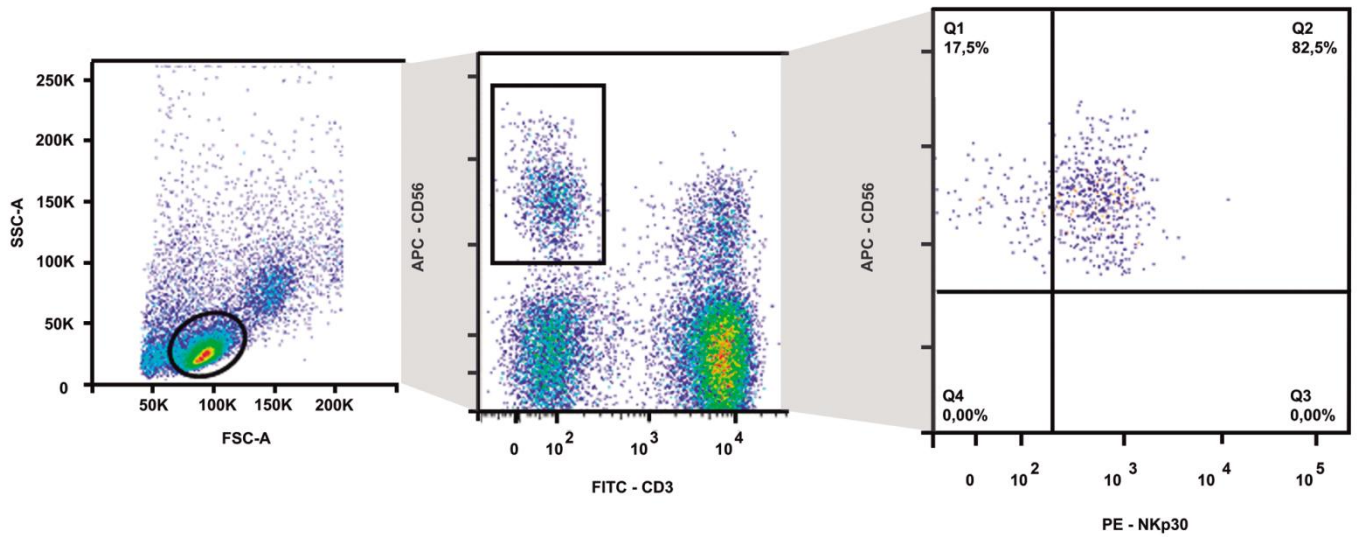
#### MARCACIÓN DE ANTÍGENOS INTRACELULARES

Para los casos en los que la molécula a detectar presentaba una localización citoplasmática,  $2,5 \times 10^5$  células lavadas fueron pre-incubadas con 250 µl de *Cytofix-Cytoperm* 1x (BD Biosciences) a 4°C durante 20 minutos. Esta solución fue lavada dos veces con 250 µl de *Perm Wash* 1x (BD Biosciences) y centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos. El *pellet* resultante fue marcado con el anticuerpo correspondiente e incubado a 4°C por 30 minutos. Se adicionó nuevamente *Perm Wash* y se centrifugó 5 minutos a 1500 rpm, se descartó el sobrenadante y se re-suspendió en 200 µl de PBS.

#### ADQUISICIÓN DE MUESTRAS

La adquisición de muestras se llevó a cabo en un citómetro FACS Calibur o FACS Canto II utilizando el *software Cellquest Pro* o el *software FACSDiva*.

La población linfoide se seleccionó en primera instancia a partir del *dot plot* SSC (proporcional a complejidad celular) vs FSC (proporcional a tamaño celular). Subsiguientemente, se seleccionó la región CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> y dentro de ésta, se analizaron los marcadores correspondientes a células NK (Figura 28). Las poblaciones de células NK dim y bright fueron delimitadas por presencia o ausencia de expresión de CD16.



**Figura 28:** Estrategia de selección de población de células NK.

Para los casos en los que se analizaron otras poblaciones, se consideró la región CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup> correspondiente a linfocitos T y, las células NKT como los *dots* doble positivos para ambos marcadores. Cabe mencionar que cuando se analizó la composición de muestras linfocitarias infiltrantes a tejidos tumorales, se adicionó el marcador CD45 como identificación leucocitaria preponderantemente linfocitaria.

En líneas generales, se utilizó el marcador PE para aquellas moléculas que se expresan con menor intensidad debido a que éste sería uno de los más sensibles.

El análisis de expresión de receptores fue llevado a cabo con el programa *FACSDiva* o FlowJo 7.6. Se determinó para cada molécula el porcentaje de expresión cotejado con el isotipo de la clase correspondiente en cada caso. La razón entre la intensidad media de fluorescencia (IMF) de un marcador y la de su isotipo permitió comparar intensidades de expresión entre distintas muestras.

## LÍNEAS CELULARES

Se utilizaron las líneas celulares humanas K562, DLD-1 y HT-29, obtenidas de la *American type culture collection* (ATCC: CCL-243, CCL-221 y HTB-38 respectivamente).

K562 corresponde a una línea celular no adherente derivada de leucemia mieloide crónica, considerada *target* canónico de células NK. La misma fue cultivada en placas con medio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado con 10% sfb (Natocor) y 1% penicilina-estreptomina (Invitrogen).

Las líneas DLD-1 y HT-29, adherentes, corresponden a cáncer de colon y fueron mantenidas en *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10% sfb, 2 mM de glutamina, 3,5 mg/ml de bicarbonato de sodio, 4,5 mg/ml de glucosa y 1% de penicilina-estreptomina.

DLD-1 presenta mutación para el gen KRAS, así como HCT-116 mientras que la línea celular HT-29 es *wild type* (wt) para KRAS pero presenta la mutación V600E en el gen BRAF.

Todas las líneas se cultivaron a 37°C y en atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>.

## TESTEO DE MICOPLASMA INTRACELULAR (HOECHST)

Mientras se mantuvieron en cultivo, a todas las líneas celulares se les realizó la técnica de *Hoescsh* con el fin de descartar posible contaminación con micoplasmas intracelulares.

Las células fueron re-suspendidas sobre un cubre-objetos embebido en medio de cultivo por 24 hs a 37°C. Se adicionó al día siguiente 1 ml de metanol-ácido acético en relación 3:1 y se incubó durante 10 minutos. Se retiró completamente el medio y nuevamente se adicionó metanol-ácido acético (2 ml) por otros 10 minutos. Se lavó con PBS 1x y se adicionó 4 µl del colorante *Hoescsh*

diluido en PBS, incubando 3-4 minutos resguardado de la luz. Se retiró el cubre-objetos y fue “montado” en 15-20  $\mu$ l de solución de montaje. Finalmente, el preparado se observó en microscopio bajo el filtro WU (luz ultravioleta).

Esta tinción permite colorear de azul el ADN, de esta manera se distinguen los núcleos celulares y, de encontrarse un granulado azulado en citoplasma se sospecharía de contaminación con micoplasma.

#### DETERMINACIÓN DE VIABILIDAD CELULAR

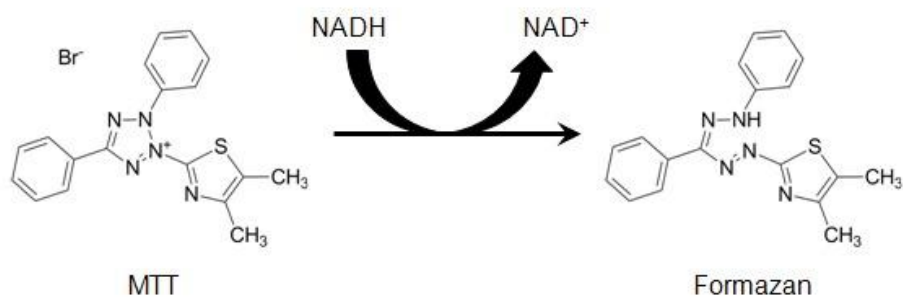
Para determinar la viabilidad celular, se realizaron recuentos de células evaluando su integridad por exclusión del colorante azul-tripán ya que, las células vivas cuya membrana se encuentra intacta no se colorean.

#### ENSAYOS DE CRECIMIENTO CELULAR *IN VITRO* (MTT)

Con el fin de evaluar proliferación y susceptibilidad a distintas drogas se realizaron ensayos de crecimiento de líneas celulares *in vitro*. El compuesto 3-(4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT- Sigma-Aldrich) de coloración amarilla es reducido, por células metabólicamente activas –más precisamente por enzimas deshidrogenasas- a formazán, de color violeta (Figura 29). Éste se acumula como precipitado insoluble dentro de las células. Cuando las células mueren, pierden la habilidad de convertir MTT en formazán. De esta manera, existe una relación lineal entre la cantidad de células vivas y la de formazán, que puede medirse por espectrometría. La intensidad de la señal, dependiente del tiempo del ensayo, da indicio de la proliferación y viabilidad. Previamente a su cuantificación, el formazán intracelular debe ser solubilizado, siendo su absorbancia máxima cerca de 570 nm<sup>103</sup>.

El protocolo incluyó los siguientes pasos:

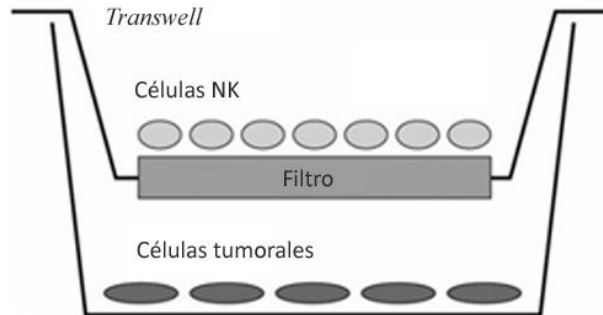
- Cultivo de células en placas MW96
- Lavado con 200  $\mu$ l de PBS de cada *well*
- Adición de 200  $\mu$ l de reactivo MTT (1 mg/ml)
- Incubación durante 1h 30' a 37°C
- Remoción de MTT
- Adición de 200  $\mu$ l de isopropanol -lisa las células-
- Incubación durante 1h30' a 37°C -para disolver el formazán-
- Medición en espectrofotómetro a 570nm.



**Figura 29:** Estructuras del compuesto MTT y formazán.

#### CO-CULTIVO DE CMSP Y CÉLULAS TUMORALES

Las CMSP y células tumorales fueron co-cultivadas en medio RPMI-10% sfb en presencia de 100U/ml de IL-2 como dosis de “mantenimiento”, durante 5 días, en una relación efector-*target* (E:T) de 2,5:1. Estos cultivos se realizaron en placas MW24 con y sin *transwell*, que implica una separación física entre ambos tipos celulares (Figura 30). Luego del co-cultivo, fueron evaluadas tanto características fenotípicas de células NK como de las líneas tumorales.

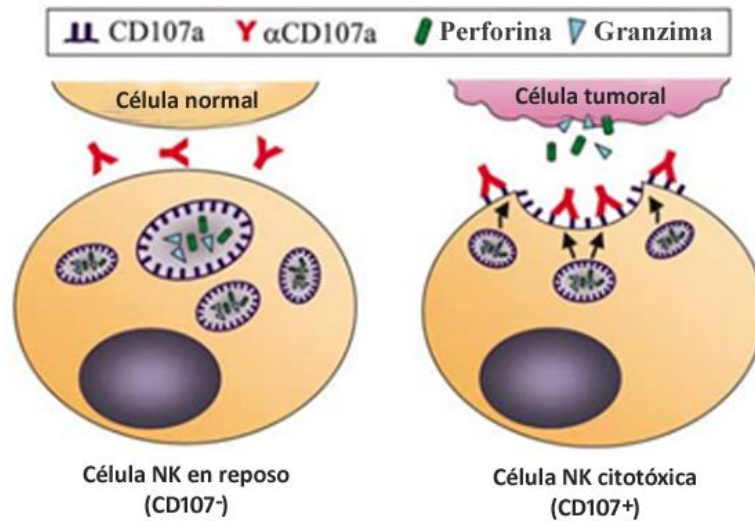


**Figura 30:** Esquema de ensayos de co-cultivos con transwell.

#### ENSAYOS DE DEGRANULACIÓN Y PRODUCCIÓN DE IFN $\Gamma$

Como mencionamos anteriormente, la degranulación de células NK, es decir la liberación de gránulos de granzimas y perforinas, constituye una de las principales vías de ataque a células blanco. En este proceso, se ha identificado a la molécula CD107a como indicador de citotoxicidad.

Los gránulos citotóxicos son transportados intracelularmente a través del citoesqueleto al sector de la sinapsis lítica. La membrana de éstos se fusiona con la plasmática liberando el contenido enzimático al espacio lítico. CD107a (LAMP-1) es una de las glicoproteínas más abundantes de estos gránulos citotóxicos que se halla usualmente en la cara interna pero que, al liberarse las enzimas el medio extracelular, se expresa transientemente en la superficie celular (Figura 31). Constituiría una barrera física de la organela que prevendría la propia degradación<sup>104</sup>.



**Figura 31:** La proteína CD107a no se expresa en células NK no activadas mientras que, luego de la activación, se encuentra temporalmente en la membrana plasmática y resulta detectable por AMs. Imagen adaptada de Uhrberg 2005.

Se han diseñado ensayos con el fin de detectar CD107a y así, cuantificar la activación de células NK al mismo tiempo que, puede medirse producción intracitoplasmática de citoquinas inflamatorias, en nuestro caso, IFN $\gamma$ .

Se co-cultivaron  $10^6$  CMSP con células K562 en una relación E:T 10:1 durante 6 horas a 37°C. Desde el inicio del co-cultivo se adicionaron 5  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD107a (BD Biosciences). A la hora de incubación, se añadió 1  $\mu$ l de *Golgi-stop* (BD Biosciences), en los casos en que se quisiera medir citoquinas intracitoplasmáticas, y el cultivo continuó las restantes 5 horas. Este reactivo impide la liberación de IFN $\gamma$  y, de esta manera, hace posible su medición intra-celularmente. Al finalizar la incubación, se recolectaron las células y lavaron con 1 ml de PBS 1x. Se realizó la marcación de las moléculas de membrana CD3 y CD56 –que permiten definir la población NK– durante 30' a 4°C, se lavó nuevamente con PBS y luego se fijaron las células con la solución Cytfix/Cytoperm incubando durante 20' y lavando con el buffer *Perm/Wash*. Posteriormente, se adicionó anti-IFN $\gamma$  y se incubó durante 30' en heladera. Luego del último lavado con *Perm/Wash*, se



resuspendió en PBS y las muestras se analizaron al citómetro. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células positivas para el marcador IFN $\gamma$  o CD107a sobre la población de células NK. La secreción de IFN $\gamma$  y la degranulación basales fueron determinadas en ausencia de *targets* y citoquinas.

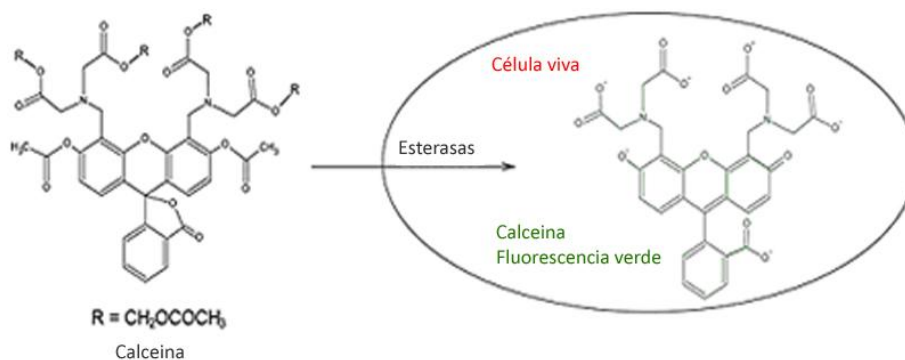
#### ENSAYOS FUNCIONALES DE LISIS

La medición de lisis de células tumorales se llevó a cabo mediante la cuantificación de calceína fluorescente liberada al medio por las mismas. Tanto las células HT-29 como DLD-1 fueron utilizadas como *targets* y, por lo tanto, preincubadas durante 30' con calceína (Calcein-AM; Molecular Probes, Invitrogen Life Technology) a 37°C. El compuesto penetra en las células vivas ya que atraviesa la membrana pasivamente y resulta sustrato de enzimas estererasas que la vuelven fluorescente -verde- (Figura 32). La calceína fluorescente permanece en el compartimento intracelular mientras la célula es viable y, si la célula muere o desencadena procesos apoptóticos que comprometan la integridad de la membrana, la calceína será liberada al medio. De esta manera, mediante un fluorímetro fue posible cuantificar la muerte celular en co-cultivos de células NK (efectores) y células tumorales (*targets*).

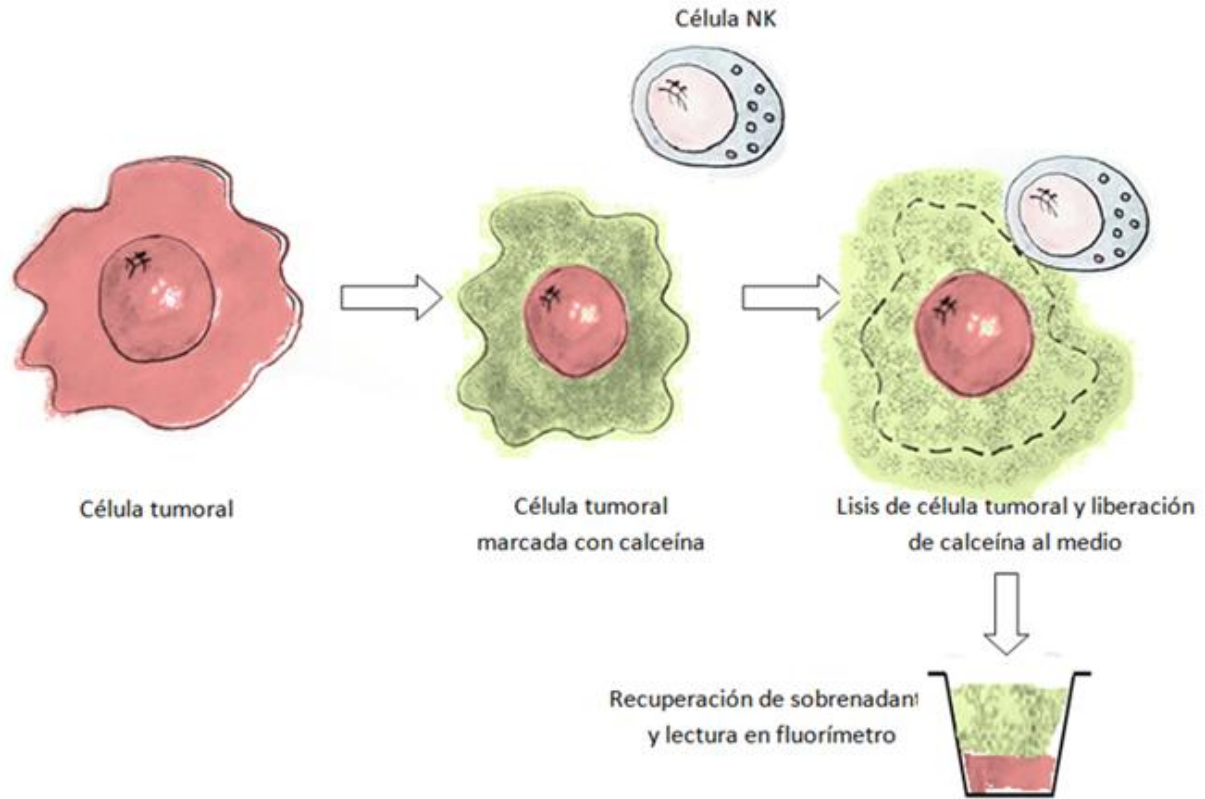
En placas MW96 -con pocillos en U- se incubaron por triplicado CMSP, normalizadas al porcentaje de células NK, y células tumorales, en una relación E:T 2,5:1 en un volumen total de 200  $\mu$ l. Un replicado correspondió a lisis espontánea (sólo células *target*) y otro a lisis máxima (células *target* en presencia del detergente Triton X-100 al 1%). Se realizó una incubación de 4 hs a 37°C y 5% CO $_2$ , luego de la cual se centrifugó la placa (5 minutos a 1500 rpm), se tomaron los sobrenadantes de cada *well* (150  $\mu$ l), se trasvasaron a una placa negra (Greiner, Sigma-Aldrich) y fueron analizados por fluorimetría (OPTIMA-BMG Labtech) (Figura 33).

El porcentaje de lisis específica por células NK fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lisis} = \frac{\text{Fluorescencia experimental} - \text{Fluorescencia espontánea}}{\text{Fluorescencia máxima} - \text{Fluorescencia espontánea}} \times 100$$



**Figura 32:** Transformación intracelular de la calceína debido a enzimas estererasas.

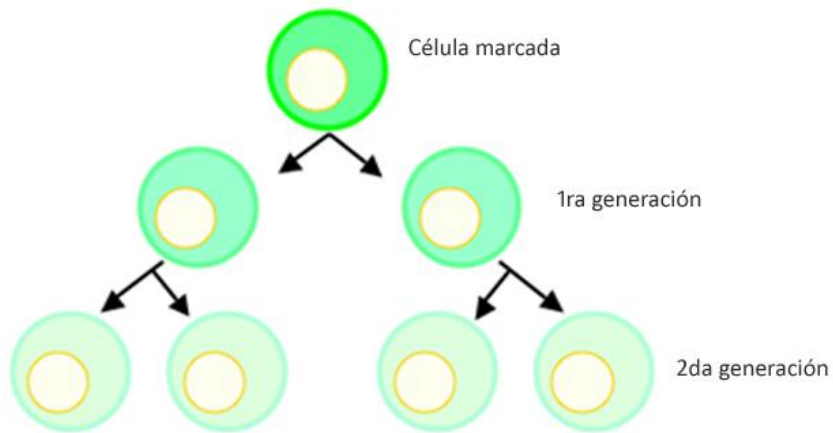


**Figura 33:** Esquema de ensayo de medición de lisis de células tumorales.

#### ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CON CFSE

En ensayos de co-cultivo con células tumorales, las CMSP fueron previamente marcadas con 5  $\mu\text{M}$  de CFSE (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular probes) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tinción implica la medición de proliferación como dilución del colorante que, atraviesa fácilmente la membrana lipídica y puede permanecer en el citoplasma unido covalentemente a aminos sin mostrar efectos colaterales en la viabilidad celular. En cada división de una célula inicialmente marcada con CFSE, la intensidad de fluorescencia se reduce a la mitad y así sucesivamente, lo que puede observarse en forma de picos que representan generaciones continuadas de células (Figura 34).

$10 \times 10^6$  CMSP se re-suspendieron en 1 ml de PBS y se adicionó 1  $\mu$ l de CFSE, se incubó en estufa durante 10 minutos. Se agregó medio RPMI-10% sfb (5 ml) y se centrifugó dos veces. Finalmente, las células -ya marcadas- fueron cultivadas en condiciones usuales.



**Figura 34:** Representación esquemática de pérdida de fluorescencia de CFSE a medida que las células proliferan.

#### TRATAMIENTOS CON CITOQUINAS Y AMS *IN VITRO*

Las CMSP o células NK fueron incubadas ON en medio suplementado con citoquinas estimuladoras: 1000 unidades (U)/ml de *recombinant human* (rh) IL-2 o bien 10 ng/ml de rh IL-15 (Prepro Tech Inc.). Asimismo, se realizaron incubaciones previas a ensayos funcionales con lenalidomida 10  $\mu$ M (LC Laboratories). Cabe mencionar que, en cada caso, parte de las células se mantuvieron en cultivo sin suplementos como control de dichos tratamientos.

Con el fin de evaluar el efecto del AM Cetuximab sobre las células de CCR y su reconocimiento por células NK, las primeras fueron pre-incubadas con el anticuerpo 30 minutos antes del ensayo funcional de lisis explicado anteriormente.

Se utilizó como control de isotipo, en la misma concentración (1 µg/ml), el anticuerpo irrelevante rituximab (IgG1) que reconoce la molécula CD20 (linfocitos B), no presente en células tumorales.

Se utilizó un AM que reconoce la molécula PDL-1, en concentración de 1 µg/ml.

#### DROGAS QUIMIOTERAPÉUTICAS

Las drogas quimioterapéuticas 5-fu y oxa se adicionaron a cultivos de células tumorales realizados durante 48 hs. Se utilizaron distintas concentraciones correspondientes a las *inhibitory concentratios* IC25 y IC50 - cuánta droga es necesaria para inhibir el 25 o el 50% respectivamente de la viabilidad celular-. Cabe aclarar que la IC25 e IC50 son específicas para cada línea celular y para cada droga.

Con el fin de emular las concentraciones plasmáticas de drogas alcanzadas en pacientes a los que se las administra, se incorporó la relación entre la concentración *in vitro* y la correspondiente *in vivo* de la siguiente manera:

$$\text{RAUC: } \frac{\text{concentración } in vitro (\mu\text{g/ml}) * \text{ tiempo de incubación (h)}}{\text{AUC}}$$

AUC

Donde:

AUC: Área bajo la curva de un gráfico de concentración de la droga en plasma en función del tiempo. Representa la exposición total a la droga. Es específica de cada droga y se expresa en las unidades µg h/ml.

RAUC: razón del área bajo la curva

Si

RAUC>1 la concentración *in vitro* es mayor que la *in vivo*

RAUC<1 la concentración *in vitro* es menor que la *in vivo*

RAUC: 1 las concentraciones se corresponden

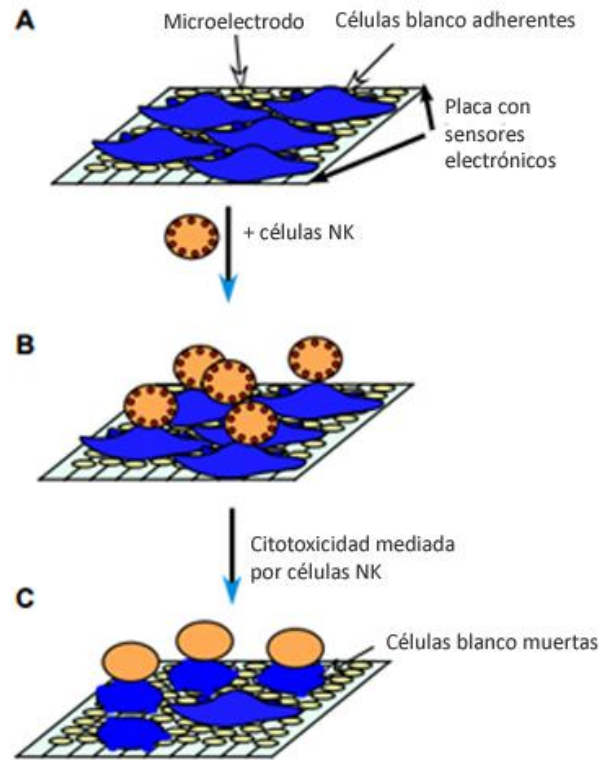
Para oxa el valor de AUC estipulado es 71,5<sup>105</sup> mientras que para 5-fu, 11,29<sup>106</sup>.

#### ENSAYOS EN XCELLIGENCE

La lisis por células NK de las líneas celulares DLD-1 y HT-29 fueron, a su vez, efectuadas por *xCELLigence System* (Roche), ensayo para células adherentes sin marcaciones y monitoreado en tiempo real<sup>107</sup>. Se basa en la medición eléctrica de la impedancia a través de micro-electrodos integrados al fondo de placas de cultivo *E-plates*. Dicha impedancia es registrada mediante un parámetro adimensional denominado *cell index* (CI) que provee información cuantitativa del status de las células adheridas. De esta manera, se plaquearon inicialmente células tumorales que se adhirieron al fondo de la placa, al día siguiente se adicionaron al medio las células efectoras capaces de lisar a las primeras. Si las células tumorales mueren, pierden adherencia y es traducido en un cambio de CI.

Fueron sembradas 15000 células DLD-1 y 25000 HT-29 por *well* en 100  $\mu$ l de medio RPMI-10% sfb, su adhesión fue monitoreada por 5 hs, momento en el cual, en algunos casos, fueron adicionadas las drogas oxa y 5-fu. Células NK purificadas de DS y pre-activadas ON con IL-2 fueron agregadas en 50  $\mu$ l/*well* en una relación E:T 1:1 a las 24 hs. Se midió la impedancia correspondiente a los co-cultivos cada 15 minutos hasta 500 minutos totales. Los resultados, expresados como CI, fueron normalizados (CIn) mediante RTCA Software (Roche) y el porcentaje de lisis específica fue calculado de la siguiente manera:

$$\% \text{ Lisis: } \frac{(\text{CIn (sin efectores)} - \text{CIn (con efectores)})}{\text{CIn (sin efectores)}} \times 100$$



**Figura 35:** Método para la medición de lisis de células blanco por células NK. (A) las células se adhieren a la base con micro-electrodos que transmiten una señal de impedancia representada como CI. (B) Adición de células NK efectoras no detectadas por el sensor al no adherirse. (C) La lisis de células blanco es detectada por el CI debido a cambios morfológicos y la pérdida de interacción con el fondo de la palca. Imagen adaptada de Zhu et al. 2006.

#### BLOQUEOS DE RECEPTORES DE CÉLULAS NK

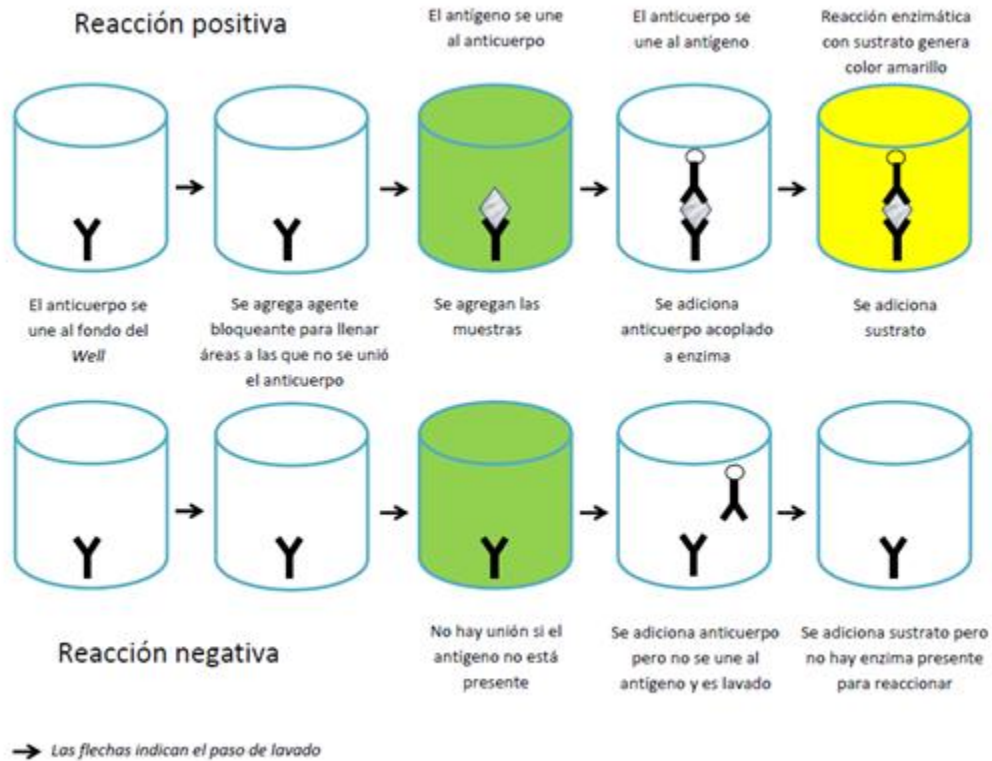
Con el fin de evaluar el rol individual de distintos receptores, en algunos cocultivos se utilizaron anticuerpos bloqueantes que reconocen específicamente los receptores NKp30, NKp46, NKG2D y DNAM-1 (R&D System).

ENSAYOS DE ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Los ensayos de ELISA permiten detectar moléculas en sobrenadantes celulares o plasma de pacientes mediante la fijación de un anticuerpo al fondo de una placa y la utilización de enzimas involucradas en una reacción colorimétrica.

El anticuerpo de captura diluido en *coating buffer* fue adherido a la cada *well* de placas MW96 de alta adsorción (100  $\mu$ l) y se realizó una incubación *over night* (ON) a 4°C. Al día siguiente, se aspiró el buffer, se lavó 3 veces con 200  $\mu$ l de *wash buffer* y se realizó una incubación durante 1 h con *assay diluent* (PBS 10% sfb) que “bloquea” áreas no cubiertas por anticuerpo unido. Luego, se lavó nuevamente y se sembró 100  $\mu$ l de cada muestra -por triplicado- incubando 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó 5 veces y se adicionó *working detector* (anticuerpo de detección y reactivo enzimático) por 1 h. Se lavó nuevamente y se agregó 100  $\mu$ l de solución sustrato (TMB), luego de 30 minutos en oscuridad, se adicionó 50  $\mu$ l de *stop solution* (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N) y se leyó en lector de placas a 450 nm (Figura 36). A la densidad óptica (DO) de cada punto experimental se le restó la del blanco (*well* sin muestra) y se normalizó de acuerdo a la curva estándar de la molécula a medir.





**Figura 36:** Pasos esquemáticos del test ELISA para la detección de antígenos en plasma humano.

Los test ELISA realizados para la detección de las moléculas solubles HLA-E y HLA-G fueron caseros mientras que para TGF $\beta$  se utilizó un kit comercial (BD).

### INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Se realizó IHQ de tacos tumorales fijados en formol 4%, deshidratados por graduación creciente de alcoholes e incluidos en parafina. Los cortes correspondientes fueron des-parafinados, re-hidratados por secuencia de distintos alcoholes de graduación decreciente. Debido a que la fijación del tejido puede alterar la estructura proteica y generar *cross-linking* de aminoácidos, fue necesario realizar una recuperación de epítopos antigénicos mediante calor. La actividad

peroxidasa endógena –que puede comprometer la especificidad de la tinción- fue bloqueada por incubación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2% en metanol durante 10 minutos. Luego del bloqueo de los cortes con suero para evitar interacciones inespecíficas, se incubó con el anticuerpo primario anti-NKp46 ON a 4°C y 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario. La reacción fue relevada con el sustrato enzimático 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Finalmente, los cortes fueron contra-teñidos con hematoxilina –tiñe intensamente los núcleos celulares- , des-hidratados nuevamente y montados.

Los preparados fueron analizados por microscopía óptica (Olympus BX40), fotografiados y cuantificados por 7 campos 20x no superpuestos con el programa Image J (*National Institutes of Health*).

#### EXTRACCIÓN DE ARN DE TEJIDOS TUMORALES Y LÍNEAS CELULARES

Se extrajo ARN de muestras congeladas, tanto de la línea celular DLD-1 como de tejidos tumorales y de mucosas normales de pacientes con CCR. En este último caso, los tejidos fueron disgregados por un homogeneizador. A todas las suspensiones se adicionó Trizol (Invitrogen) –extrae ARN y ADN- y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó cloroformo, se incubó unos minutos y se centrifugó 15 minutos a 12000 g. Se extrajo la fase acuosa –conteniendo el ARN- y se adicionó isopropanol 100% que permite su precipitación. Se centrifugó nuevamente y se agregó 1 ml de etanol 75%, dejando ON a -20°C. Al día siguiente, se centrifugó y se dejó secar el *pellet* para re-suspender posteriormente en H<sub>2</sub>O destilada apirógena y guardar a -80°C.

RT-PCR

Con el fin de realizar la cuantificación relativa de ARN mensajero del gen TGF $\beta$  de las muestras de la línea celular DLD-1 y de muestras tisulares, se retro-transcribió el ARN total extraído mediante RT-PCR. Se utilizó la enzima *SuperScript II Reverse Transcriptase* (Invitrogen) y en cada reacción se partió de 1  $\mu$ g de ARN total -cuantificado en NanoDrop (Thermo Scientific). Se obtuvo ADN copia (ADNc) utilizando *random primers* mediante la reacción con la siguiente secuencia: desnaturalización 65°C, hibridación de *primers* 25°C, activación de enzima 42°C, inactivación de enzima 70°C.

PCR CUALITATIVA

Con el fin de amplificar los productos obtenidos mediante RT-PCR, se realizaron PCR cualitativas de ADNc con los siguientes *primers* diseñados específicamente para TGF $\beta$  con el programa BLAST (National Library of Medicine):

*Forward* 5'GTACCTGAACCCGTGTTGCT 3'

*Reverse* 5'CTAAGGCGAAAGCCCTCAAT 3'

(Invitrogen)

Se utilizó la enzima Taq pol (Promega) siguiendo instrucciones del fabricante en termociclador. Se utilizaron los siguientes parámetros de reacción: desnaturalización 95°C 30'', hibridación de *primers* 58°C 30'' y extensión 72°C 1 minuto.

Q-PCR

Se realizó PCR cuantitativa en tiempo real del ADNc de las muestras de la línea DLD-1 y los tejidos tumorales en termociclador. Se utilizó *SYBR universal Master Mix* (Applied Biosystems) y los niveles relativos de expresión de TGF $\beta$  se determinaron por el método de  $\Delta\Delta C_t$  utilizando la expresión del gen  $\beta$ -actina como normalizador. Los parámetros de reacción incluyeron inactivación de contaminantes a 50°C durante 2 minutos, activación de enzima a 95°C por 2 minutos y 40 ciclos de: separación de hebras 95°C 15'' e hibridación de *primers* 58°C 1 minuto.

Los *primers* de TGF $\beta$  son los ya mencionados y los correspondientes a  $\beta$ -actina son los siguientes:

*Forward* 5' CCAGAGGCGTACAGGGATAG 3'

*Reverse* 5' CCAACCGCGAGAAGATGA 3'

(Invitrogen)

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA

Se realizó electroforesis en gel de agarosa de productos de PCR y q-PCR con el fin de confirmar la identidad de ADNc obtenido mediante dichas reacciones. Se prepararon geles 3% agarosa con Tris Acetato EDTA (TAE) y se adicionó 5  $\mu$ l de *gel red* -marcador de ácidos nucleicos-. Se sembraron 10  $\mu$ l de cada muestra y 5  $\mu$ l de marcadores de peso molecular. La corrida se realizó a 80v durante 40 minutos. Finalmente, fue observado bajo luz UV.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados son presentados como media  $\pm$  desvío estándar ( $\sigma$  medida de dispersión).

Las comparaciones entre pacientes y DS fueron realizadas mediante *test t* de 2 colas en los casos en los que los datos presentaron distribución normal y, en los que no, mediante el *test Mann-Whitney* no paramétrico.

Los ensayos funcionales fueron analizados mediante *test t* pareado comparando diferentes tratamientos *in vitro* sobre el mismo grupo de muestras.

Las correlaciones entre diferentes variables fenotípicas y funcionales fueron evaluadas mediante *test Pearson* -cuando las muestras presentaron distribución normal- o *Spearman* -cuando las muestras no presentaron distribución normal-.

Las comparaciones de grupos múltiples se realizaron con la prueba de análisis de varianza ANOVA de un factor con *test* de comparaciones múltiples.

Las curvas de sobrevida fueron confeccionadas de acuerdo al método Kaplan-Meier.

En todos los casos, se verificó que la distribución muestral cumpliera los supuestos de cada prueba. Se consideró estadísticamente significativo un  $p < 0,05$  y los resultados se indicaron con la siguiente denominación:

\* $p < 0,05$

\*\* $p < 0,01$

\*\*\* $p < 0,001$

Para el análisis estadístico y representación gráfica de los resultados se utilizó el programa *GraphPad Prism 6* para *Windows* (GraphPad Software Inc.).

ANÁLISIS DE CLUSTERING

Con el fin de analizar los datos de manera simultánea, se utilizó el programa *MultiExperiment Viewer* (MeV v4.2), el que permite el ingreso de matrices de datos y efectuar un análisis de *clustering* es decir, algoritmos de agrupamiento.

Se ingresó una matriz de datos de receptores de células NK de pacientes y DS y, se realizó un agrupamiento jerárquico no supervisado con la métrica *Pearson squared*.

Asimismo, se consideraron diversos datos clínicos de los pacientes y se evaluó si dichas características pudieran estar asociadas a la expresión diferencial de los receptores en las células NK en análisis supervisados.

# Resultados

## CAPÍTULO I: ROL DE CÉLULAS NK EN EL MICROAMBIENTE TUMORAL

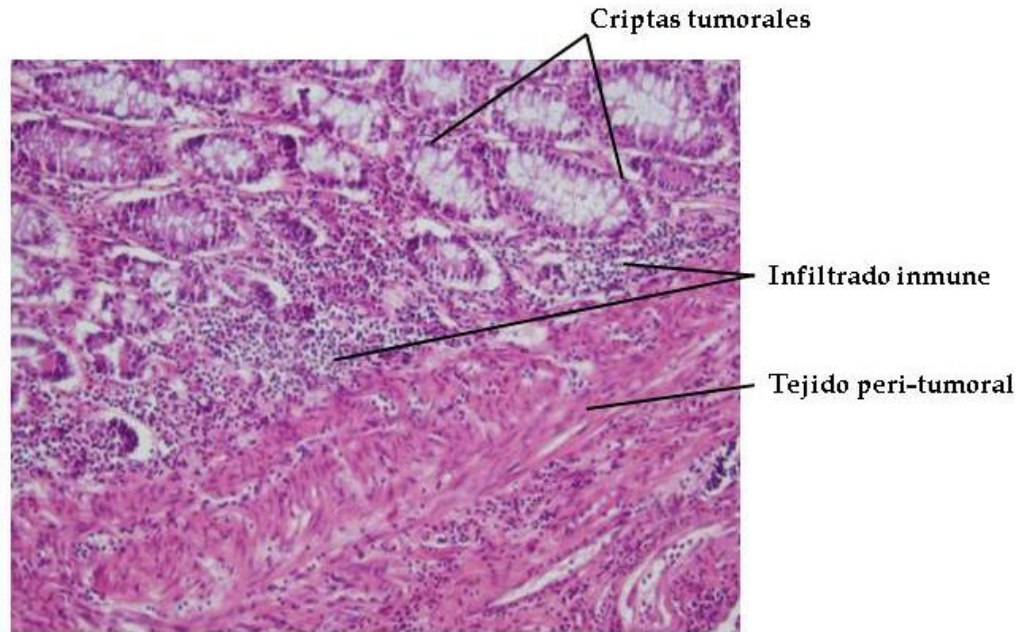
### ***1.1 Evaluación de la presencia de células NK en tumores primarios mediante IHQ***

Para establecer el rol de células NK en el microambiente tumoral, en primer lugar, nos propusimos determinar si efectivamente se encontraban presentes en el infiltrado inflamatorio tumoral y peri-tumoral mediante IHQ de tejido de pacientes con CCR. Se analizaron 20 muestras de pacientes que no habían recibido tratamiento previo a la resección del tumor y se cuantificó el porcentaje de células NKp46<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> y su distribución. Si bien las células NK se definen por expresión del marcador CD56, otros tipos celulares pueden expresar esta molécula tales como células NKT y células epiteliales. Por esta razón, se consideró más apropiada la utilización del receptor NKp46 como indicador de células NK.

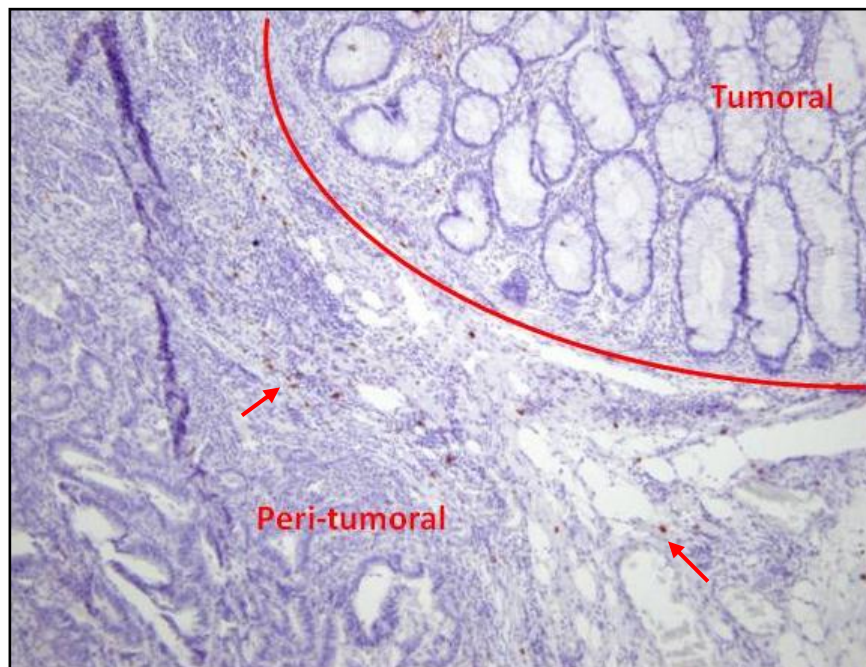
En todos los casos analizados, se realizó una tinción por hematoxilina-eosina (HE) de los cortes tisulares. Esta técnica permite visualizar de manera integral los tejidos y la infiltración inmune (Figura 37). Asimismo, pudimos corroborar el nivel de diferenciación tisular.

Observamos que las células NK se encuentran presentes en el infiltrado tumoral, en tejido peri-tumoral y en márgenes invasivos. En la Figura 38 se muestra de manera representativa una imagen de IHQ de un tumor primario de CCR y en la Figura 39 una fotografía en mayor aumento que permite visualizar la tinción principalmente de membrana de una célula NK. Los puntos marrones representan las células NKp46<sup>+</sup>.

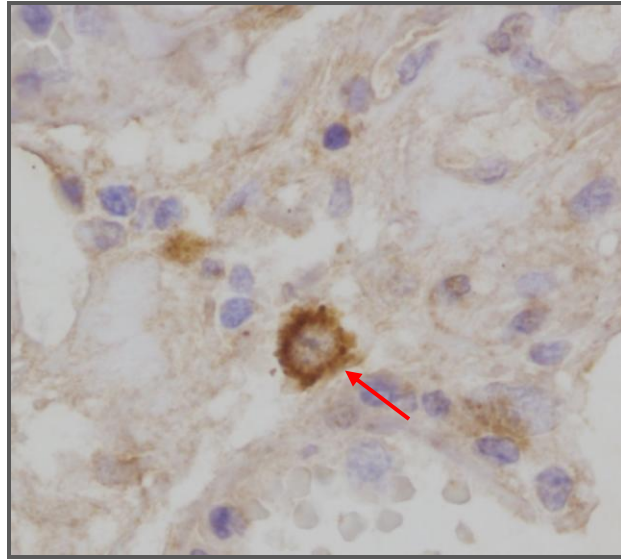




**Figura 37:** Tinción de H-E de corte tumoral de CCR. Se visualizan las criptas tumorales, el tejido peri-tumoral e infiltrado inmune en aumento 100x.

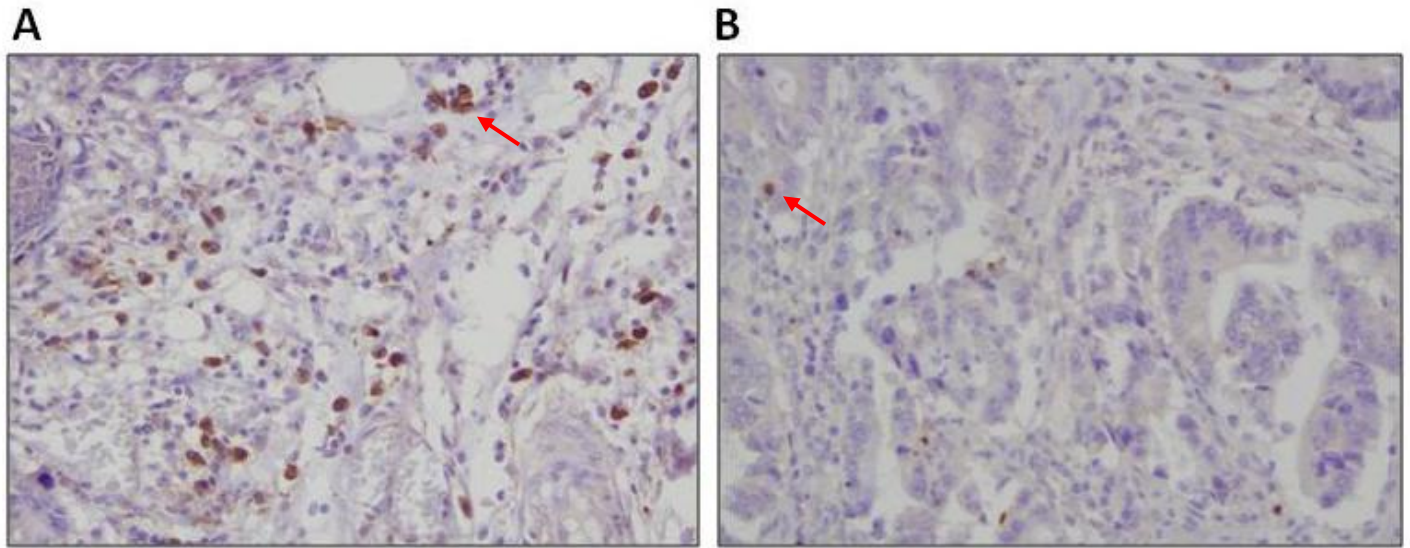


**Figura 38:** Se analizó presencia de células NK por IHQ de NKp46 (marca marrón) en tejidos tumorales y peri-tumorales de CCR. Imagen representativa en aumento 100x.



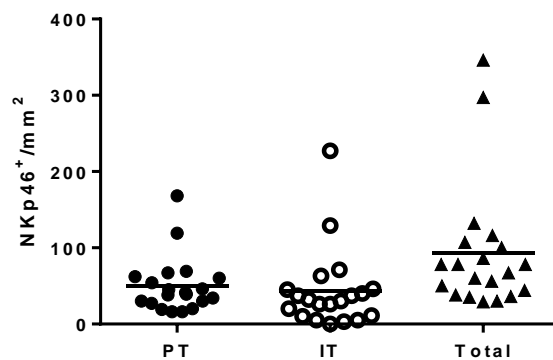
**Figura 39:** IHQ de NKp46 en tejido tumoral de CCR en aumento 400x. Se observa una célula NK teñida en marrón.

La expresión de NKp46 en tejido, es decir la presencia de células NK en el infiltrado inmune, fue variable de una muestra a otra tanto en número como en tamaño (Figura 40). Generalmente, el infiltrado peri-tumoral se caracterizó por células voluminosas teñidas más intensamente mientras que, el intra-tumoral presentó células NKp46<sup>+</sup> pequeñas y con marca débil.

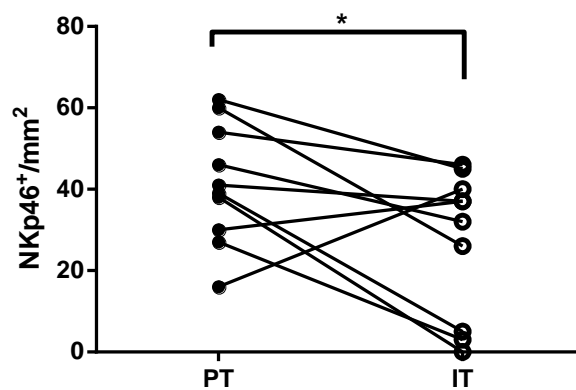


**Figura 40:** IHQ de células NK (marca marrón) en tejido tumoral. (A) Sección tumoral de paciente con CCR que presenta alto índice de infiltración de células NKp46<sup>+</sup> y (B) Sección tumoral que presenta bajo índice de infiltración de células NKp46<sup>+</sup>. Ambas fotografías fueron tomadas por microscopio óptico en aumento 200x.

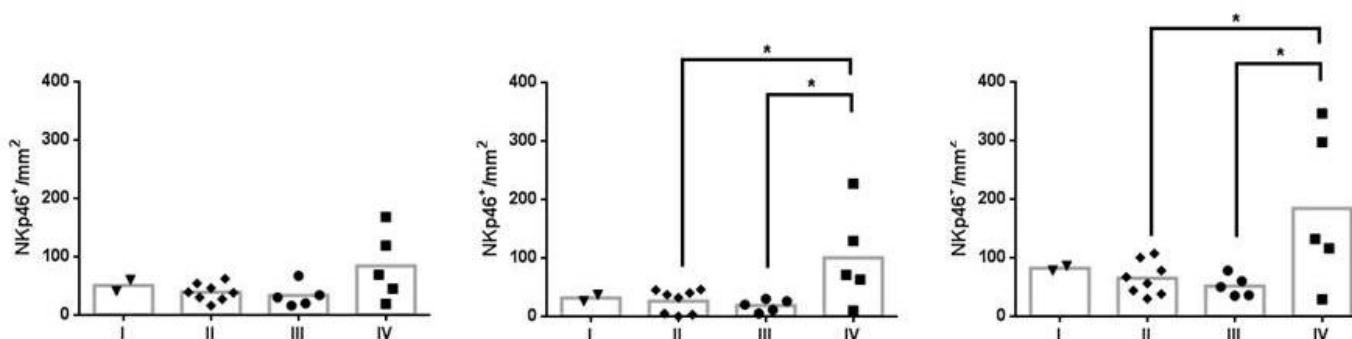
Se analizó la frecuencia de células NK por mm<sup>2</sup> de tejido tumoral, peri-tumoral y la suma de ambas. Presentaron medias de 50; 43,2 y 93,2 NKp46<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> respectivamente sin diferencia aparente en su distribución (Figura 41). No obstante, para estadios tempranos de la enfermedad (I-II), se observó que el infiltrado de células NK es mayor en el tejido peri-tumoral (Figura 42) mientras que, en estadios tardíos (III-IV) no se observaron diferencias entre ambos compartimentos. Los niveles de infiltración total y, particularmente de células NK intra-tumorales, se vieron aumentados en tejidos de pacientes de estadio IV, lo que implicaría una mayor respuesta inflamatoria al tumor (Figura 43).



**Figura 41:** Frecuencia de células NK peri-tumorales (PT), intra-tumorales (IT) y la sumatoria de ambos (Total) para cortes tisulares de pacientes con CCR.



**Figura 42:** Frecuencia de células NK en tejido peri-tumoral (PT) e intra-tumoral (IT) de pacientes con CCR de estadios tempranos (I-II). Para la comparación estadística entre ambos compartimentos se utilizó *t-test* pareado. \* $p < 0,05$

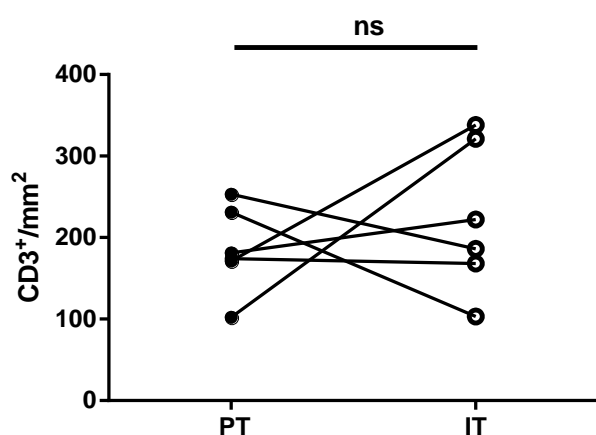


**Figura 43:** Presencia de células NK en tejido peri-tumoral (PT) –panel izquierdo-, intra-tumoral (IT) –panel medio- y la sumatoria de ambos (Total) –panel derecho- de acuerdo a estadificación de la enfermedad (I,II,III y IV). Para la comparación estadística entre estadios se utilizó test ANOVA. \* $p < 0,05$

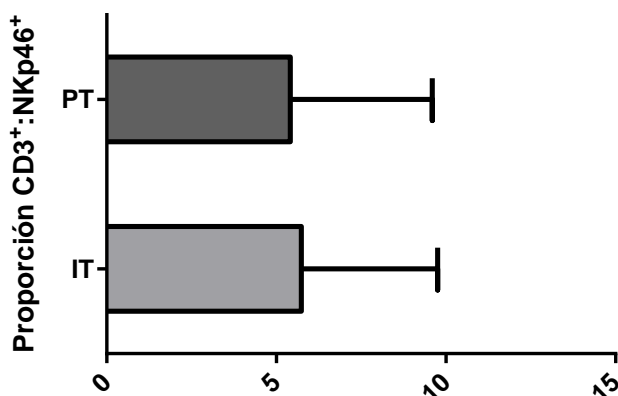
Teniendo en cuenta que diversas condiciones clínicas de los pacientes al momento del diagnóstico o cirugía podrían estar implicadas en alteraciones de la infiltración inmune al tumor, se analizó si existía relación entre células NKp46<sup>+</sup> infiltrantes y la edad, la localización tumoral (colon derecho, colon izquierdo y recto), los niveles séricos del antígeno carcinoembrionario (CEA), el tamaño tumoral y la presencia de invasión vascular linfática (IVL). En todos los casos, la frecuencia de células NK resultó independiente de dichas variables.

El infiltrado inmune puede, a su vez, comprender múltiples tipos celulares como macrófagos, CD8 y linfocitos T en distintas composiciones. Se analizó la presencia de estos últimos en algunos especímenes, mediante IHQ con el marcador CD3 debido a que diversos trabajos postulan la frecuencia de células T como marcador pronóstico<sup>108</sup>, en particular el *subset* de memoria<sup>1</sup>. Se observó que el infiltrado de linfocitos T es mayor al correspondiente de células NK (media: 223 células/mm<sup>2</sup> intra-tumoral y 185 células/mm<sup>2</sup> peri-tumoral), sin presentar diferencias significativas en su distribución (Figura 44). Asimismo, se calculó la proporción de células CD3<sup>+</sup> en relación a las células NKp46<sup>+</sup> con el fin de analizar

la correspondencia entre ambos tipos celulares en tejido tumoral y peri-tumoral, presentando valores similares para ambos compartimentos, aunque el número de muestras analizadas fue bajo (Figura 45).



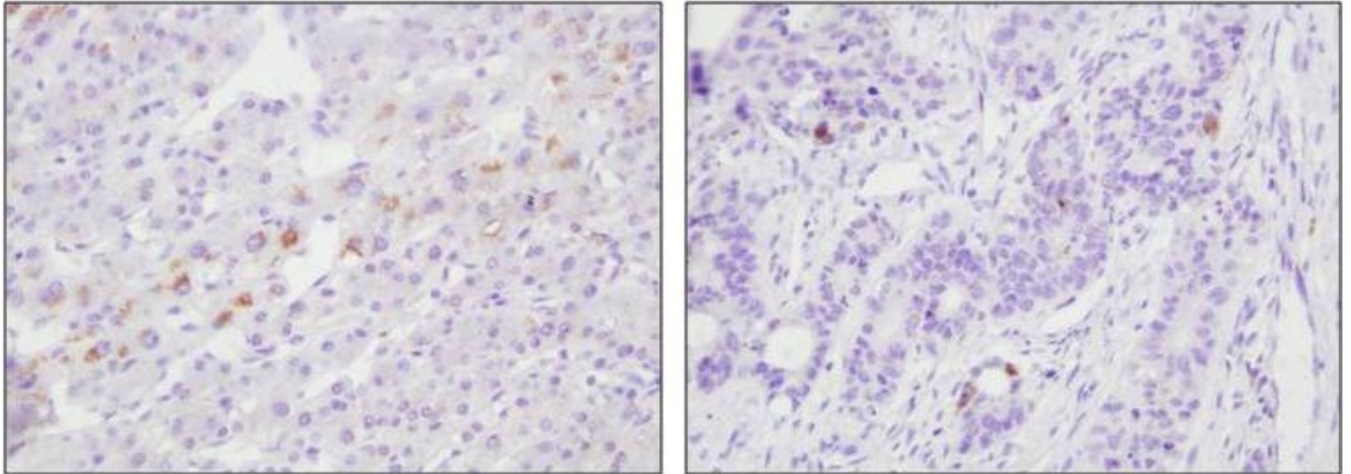
**Figura 44:** Frecuencia de linfocitos T en tejido peri-tumoral (PT) e intra-tumoral (IT) de pacientes con CCR. Para la comparación estadística entre ambos compartimentos se utilizó *t - test* pareado.



**Figura 45:** Proporción de células CD3+:NKp46+ en tejido peri-tumoral (PT) e intra-tumoral (IT) de pacientes con CCR. N=6

Las metástasis hepáticas -pacientes con CCR estadio IV- también pueden presentar infiltración de células NK, cumpliendo potencialmente un rol en la defensa anti-tumoral. En la Figura 46 se muestra de manera representativa una

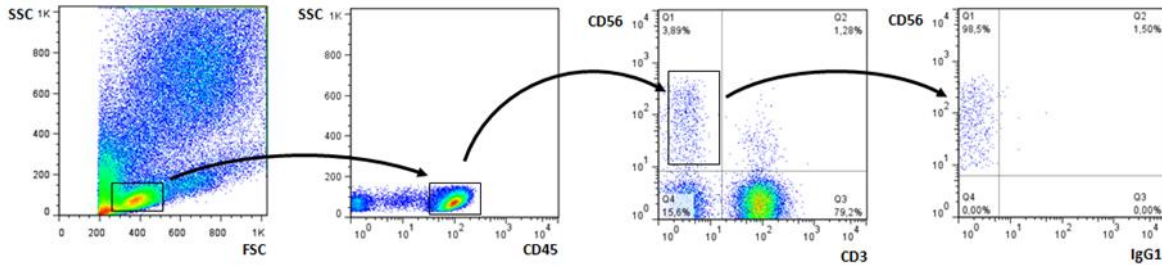
imagen de IHQ de tejido metastásico con presencia de células NKp46<sup>+</sup>, en mayor medida en el compartimento peri-tumoral.



**Figura 46:** Presencia de células NK en metástasis hepática de CCR. **Panel izquierdo:** compartimento peri-tumoral. **Panel derecho:** compartimento intra-tumoral. Las marcas marrones representan células NKp46<sup>+</sup>. Las imágenes fueron tomadas en aumento 200x.

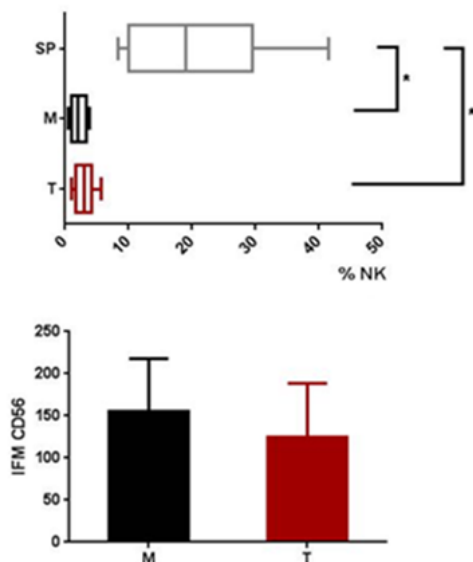
### **1.2 Evaluación *ex vivo* de células mononucleares infiltrantes al tumor**

Una vez determinada la presencia de células NK en el nicho tumoral, nos propusimos realizar una evaluación *ex vivo* mediante citometría de flujo de las mismas, a partir de 20 muestras sólidas de pacientes con CCR obtenidas al momento de la cirugía. Mediante la marcación de las moléculas CD45, CD3 y CD56 pudieron definirse las poblaciones leucocitarias (CD45<sup>+</sup>) y los *subsets* de linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>), células NKT (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y, células NK (CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>). Como valor de referencia al infiltrado tumoral se caracterizó, en los casos en los que fue posible, el infiltrado de mucosa normal adyacente y las poblaciones correspondientes de SP (Figura 47).



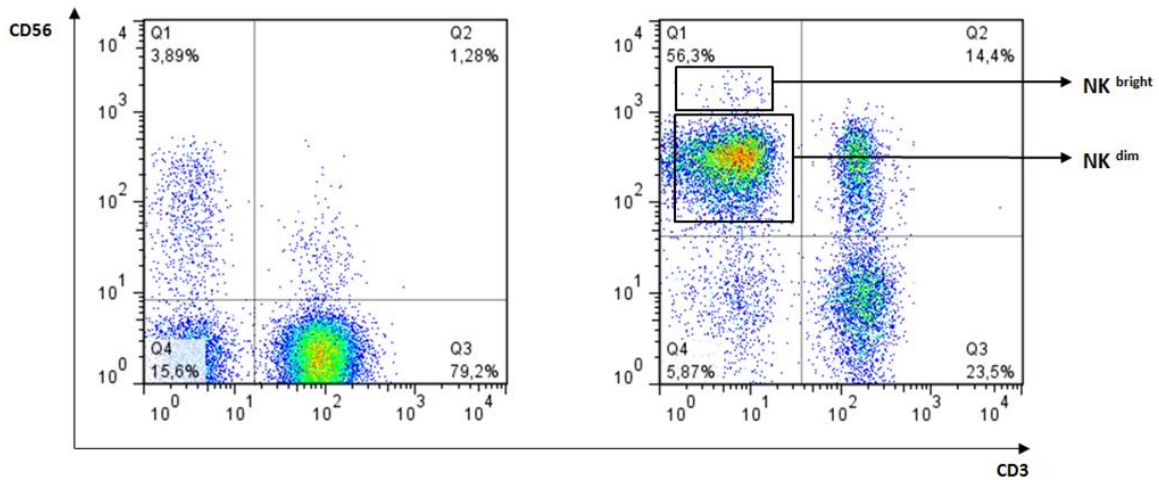
**Figura 47:** Estrategia de selección de la población de células NK de SP y evaluación de receptores de membrana mediante citometría de flujo.

En primer lugar, observamos que el porcentaje de células NK disminuye drásticamente en tejido con respecto al compartimento de SP. Mientras que en este último representa el  $18,06 \pm 9,95\%$ , en tumor y mucosa adyacente presenta el  $3,00 \pm 1,52\%$  y  $2,12 \pm 1,33\%$  respectivamente. No sólo el tumor y la mucosa no difieren significativamente en porcentaje de células NK infiltrantes sino que, tampoco difieren en intensidad de expresión de CD56 en membrana -medido como IFM-, lo que indicaría que las células NK son capaces de acceder al microambiente tumoral y a su periferia y que, en ambos casos, se trata de células en estado de madurez similar<sup>109</sup> (Figura 48). Cabe mencionar que la población NK infiltrante a tejido no presentó una sub-división clara en *subsets* NK<sup>dim</sup> y NK<sup>bright</sup>, contrariamente a lo que ocurre en SP (Figura 49).



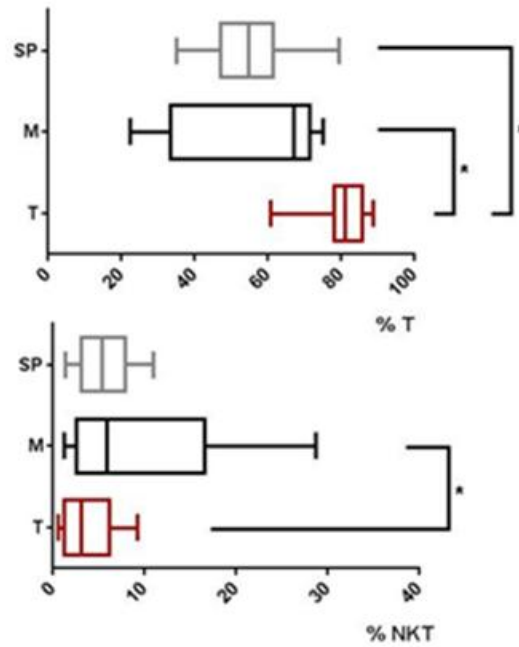
**Figura 48:** Arriba. Porcentaje de células NK en SP, mucosa normal adyacente (M) y tumor (T). Se grafica el mínimo y el máximo, la raya dentro del recuadro corresponde a la mediana de la población. Abajo. Intensidad de fluorescencia media del marcador CD56 en células NK de mucosa normal (M) y tumor (T).





**Figura 49:** Dot plots ejemplificadores de poblaciones linfocitarias infiltrantes al tumor (Izquierda) y de SP (Derecha). Las células NK de SP se diferencian claramente en NK<sup>dim</sup> y NK<sup>bright</sup>.

A su vez, observamos que existe mayor porcentaje de linfocitos T en el infiltrado tumoral – con una media de  $80,52 \pm 7,41\%$  – que en SP y tejido adyacente. Esto implica que, si bien las células NK acceden al tumor, las células T lo harían en mayor medida. Consecuentemente con el aumento porcentual de linfocitos T, el infiltrado tumoral presentó una disminución en porcentaje de células NKT con respecto a la mucosa normal (Figura 50).



**Figura 50:** Arriba. Porcentaje de células T en SP, mucosa normal adyacente (M) y tumor (T). Se grafica el mínimo y el máximo, la raya dentro del recuadro corresponde a la mediana de la población. Abajo. Porcentaje de células NKT en SP, mucosa normal adyacente (M) y tumor (T).

Con el fin de caracterizar las células NK que tienen la capacidad de infiltrar el tejido tumoral, analizamos mediante citometría de flujo la expresión en membrana de receptores activadores e inhibitorios correspondientes a esta población celular. Se analizaron nuevamente como control, tejidos de mucosa normal y de SP. En la Figura 51 se muestran a modo de ejemplo *dot-plots* correspondientes a las distintas poblaciones leucocitarias y a cuatro receptores de células NK para los tres compartimentos analizados.

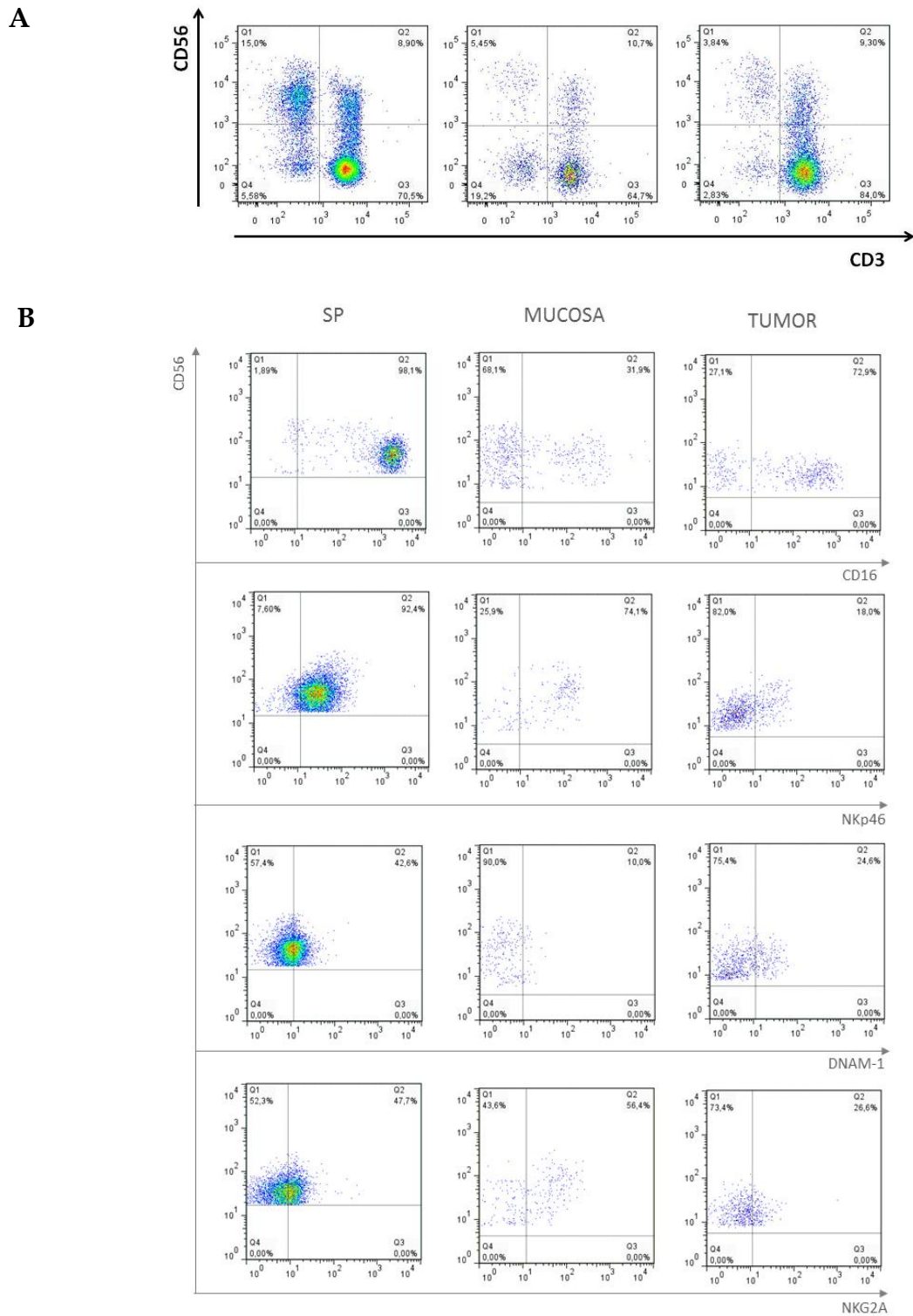
Pudimos observar que existe en células NK del tejido, tanto tumoral como de mucosa adyacente, una mayor dispersión y una marcada disminución en la expresión de los receptores activadores CD16 y DNAM-1 y, una moderada reducción de NKp30, con respecto a valores de referencia de SP. Los receptores CD16 y DNAM-1, efectores preponderantes de la respuesta citotóxica, se expresaron en menos del 40% de las células NK infiltrantes lo que implica una fuerte reducción en la fracción activadora. Asimismo, vimos una pérdida de más de 50% de expresión de los receptores KIRs CD158a y CD158b -de reconocimiento de moléculas del CMH- mientras que el nivel de los receptores inhibitorios NKG2A y CD85j se mantuvo equivalente al correspondiente de SP. Por otro lado, las células NK infiltrantes expresaron el receptor NKp44, molécula presente únicamente en células activadas<sup>110</sup>, mientras que en las células NK de SP no se expresa (Figura 52).

Existe, a su vez, una regulación exclusiva del compartimento tumoral, identificada por una significativa disminución de los receptores activadores NKG2D y NKp46, presentando las células NK de mucosa normal un fenotipo intermedio entre tumor y SP. Para los receptores CD94 y CD161 se observó también una desregulación en el infiltrado tumoral con respecto a SP y la mucosa presentó porcentajes entre ambos (Figura 52). En el primer caso, se trata de una molécula que forma heterodímeros tanto activadores -mediante unión con NKG2C- como inhibitorios -mediante unión con NKG2A-. Si la expresión de

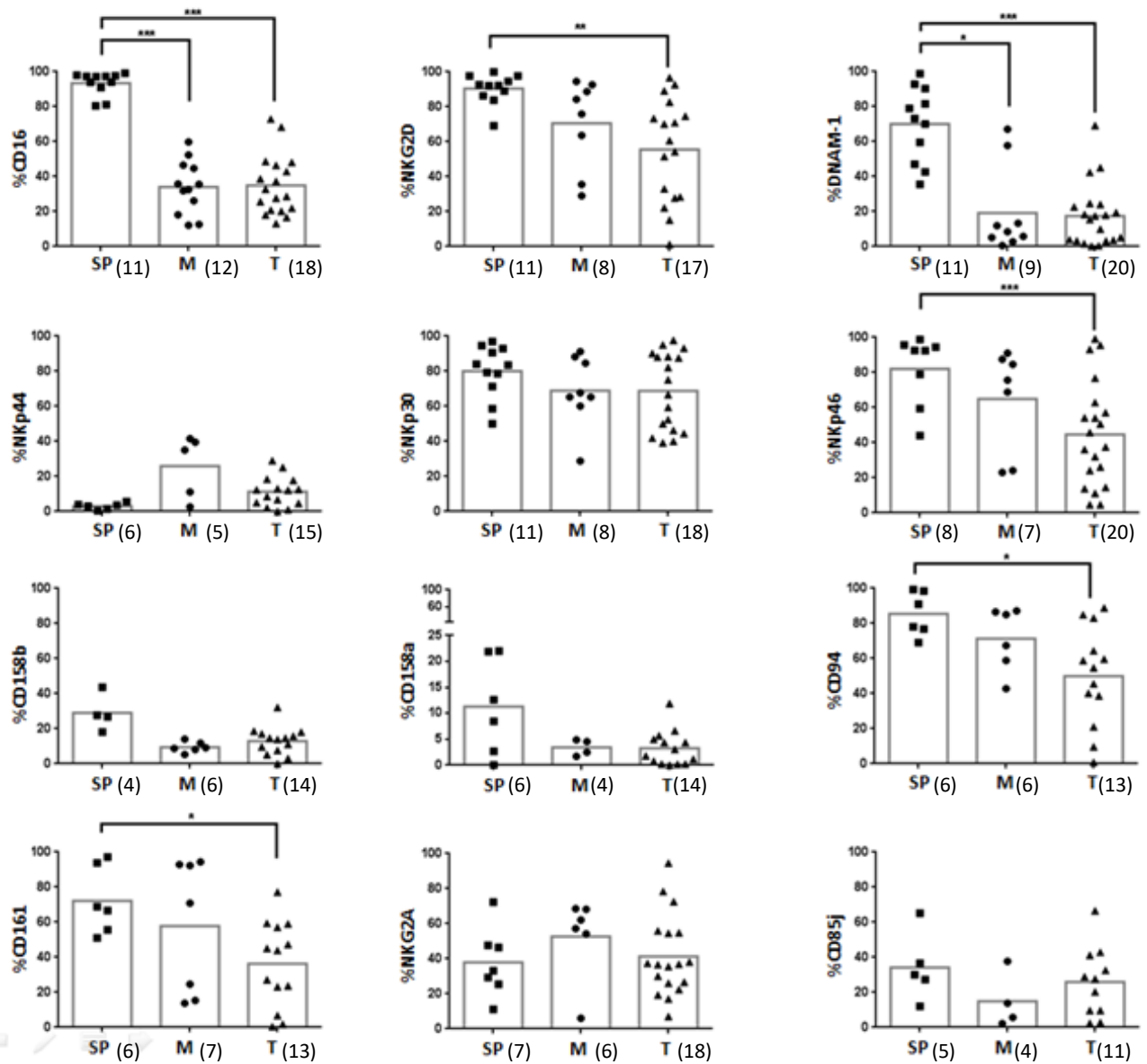
NKG2A es invariante, podría implicar una menor disponibilidad de molécula libre para unirse en forma de heterodímero activador. El rol de CD161 no es tan claro y parecería estar modulado por citoquinas del microambiente.

Esta evaluación multi-paramétrica de células NK infiltrantes permitió definir un perfil tolerogénico de las mismas, con menor expresión de receptores activadores, conservación de los inhibitorios, y menor capacidad de reconocimiento de lo propio.

Cabe mencionar que, en base a estos resultados, la utilización de NKp46 como marcador de células NK puede resultar controversial cuando se desea estudiar muestras tisulares debido a la potencial subestimación de su cuantificación por desregulación de expresión del receptor. No obstante, constituye aún un marcador excluyente de la población de células NK.



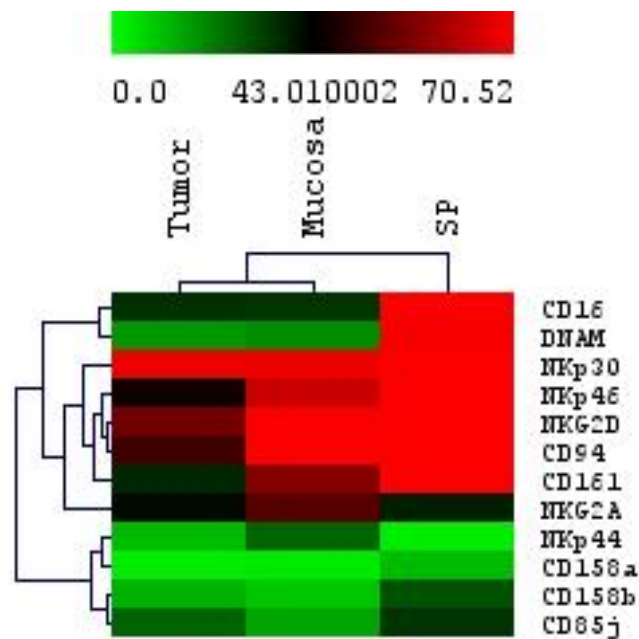
**Figura 51:** **A.** *Dot-plots* ejemplificadores de poblaciones leucocitarias. **B.** *Dot-plots* ejemplificadores de receptores activadores CD16, NKp46 y DNAM-1 y el inhibitorio NKG2A de células NK de SP, mucosa y tumor de paciente con CCR.



**Figura 52:** Expresión de receptores de células NK en SP, tumor (T) y mucosa normal adyacente (M) de pacientes con CCR. Para el análisis estadístico se utilizó el *test Wilcoxon* para muestras pareadas no paramétricas y el *t test* pareado para muestras con distribución normal. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,01$

Con el fin de analizar los receptores de células NK en los tres compartimentos tisulares en su conjunto, realizamos un análisis de *clustering* o agrupamiento de datos mediante el programa MeV-calcula algoritmos de

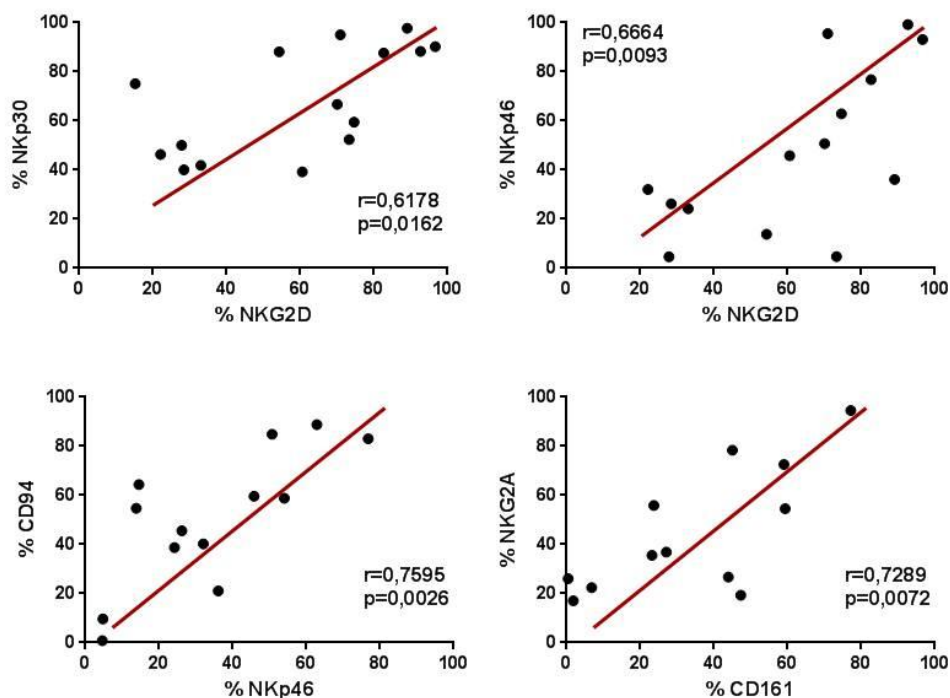
agrupamiento a partir de matrices de datos- de todas las muestras analizadas. Observamos que, al realizar un árbol de semejanza, el tejido tumoral y la mucosa normal se asociaron entre sí en mayor medida que la SP (Figura 53). Asimismo, los receptores que permitieron diferenciar los tres compartimentos de manera significativa fueron CD16, NKG2D, NKp44, NKp46, CD94, CD161, DNAM-1 y CD158b ( $p < 0,05$ ). El tumor se caracterizó por baja expresión de estos receptores, la mucosa por expresión intermedia mientras que la SP presentó alta expresión de los mismos.



**Figura 53:** Análisis de agrupamiento de datos para muestras tumorales, de mucosa normal adyacente o SP de pacientes con CCR. El análisis fue llevado a cabo con el programa MeV comparando medias de cada grupo -métrica Euclideana-.

Al evaluar los niveles de expresión de los receptores de células NK intra-tumorales en su conjunto, hallamos una correlación positiva entre algunos receptores activadores. Tal es el caso del par NKG2D-NKp30 y NKG2D-NKp46, lo

que presumiblemente indica que comparten mecanismos de regulación. A su vez, la expresión de NKp46 correlacionó positivamente con la correspondiente a CD94. Como contraparte, observamos una correlación en los niveles de expresión del receptor inhibitorio NKG2A y de CD161, lo que indicaría un desbalance fenotípico integral (Figura 54).

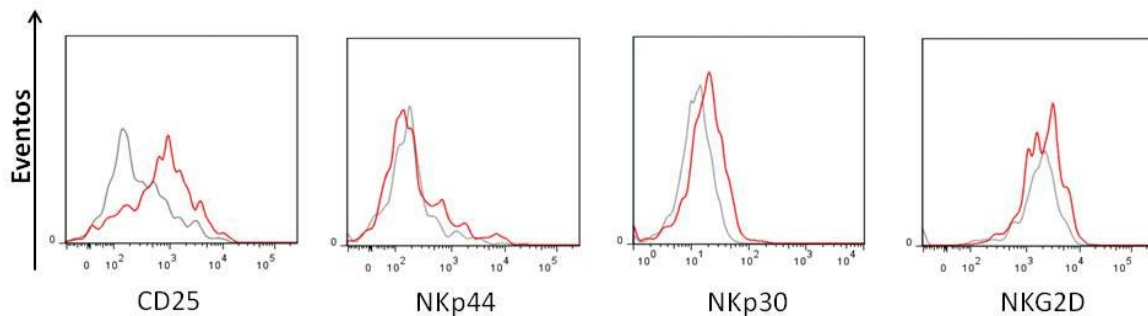


**Figura 54:** Correlaciones positivas entre la expresión de receptores de células NK intra-tumorales. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante *test Spearman* o *Pearson* de acuerdo a normalidad de la muestra. Los coeficientes  $r$  y el valor de  $p$  se indican en cada gráfico.

Teniendo en cuenta la desregulación de expresión de receptores de células NK en el microambiente tumoral, nos propusimos determinar si esas células mantenían la capacidad de estimulación por citoquinas inflamatorias como IL-15<sup>69</sup>.

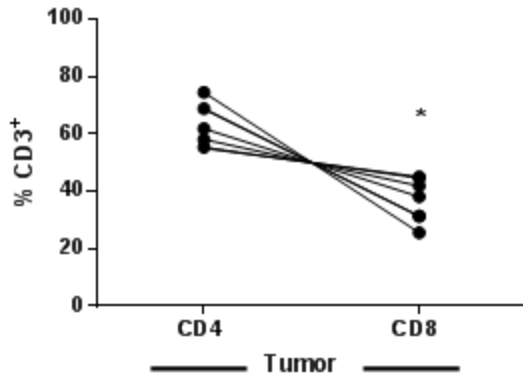


Adicionamos IL-15 ON y posteriormente medimos marcadores de activación y niveles de expresión de receptores activadores en células NK intra-tumorales. Observamos gran variabilidad entre distintas muestras, aunque en algunos casos fueron susceptibles de una estimulación moderada, evidenciada por incremento en la expresión de NKp44, NKp30 y NKG2D post-incubación, pero sin alcanzar significación estadística. Asimismo, observamos un incremento en la expresión del marcador CD25 -receptor de IL-2- que aumenta luego de la activación celular<sup>111</sup>. En la Figura 55 se muestran histogramas ejemplificadores.



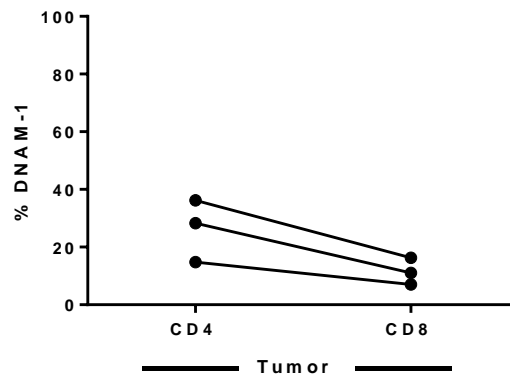
**Figura 55:** Histogramas ejemplificadores de la regulación por IL-15 de receptores de células NK intra-tumorales (N=3). Gris: control; rojo: adición de IL-15.

En 7 muestras de tejido pudimos realizar, a su vez por citometría de flujo, determinación de las poblaciones CD4<sup>+</sup> -*helper*- y CD8<sup>+</sup> -*citotóxicos*- dentro del *subset* de linfocitos T y observamos que, mientras en la mucosa normal adyacente ambas se presentan cerca del 50%, intra-tumoralmente existe mayor infiltrado de células CD4<sup>+</sup> (Figura 56). Esto implicaría una dificultad de los linfocitos citotóxicos de penetrar al microambiente tumoral y, por lo tanto, menor probabilidad de lisis de células tumorales.



**Figura 56:** Infiltrado de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en tumores de pacientes con CCR. La estadística fue realizada mediante *test Wilcoxon* para muestras pareadas no paramétricas.

Los linfocitos T de SP expresan marcadores propios de las células NK tales como DNAM-1; que funciona como molécula co-estimuladora<sup>112 113</sup>. Pudimos ver, en algunos casos, que las células T mantienen la expresión del receptor incluso en el microambiente tumoral. En este *subset* de datos, los linfocitos CD4<sup>+</sup> intra-tumorales presentan moléculas de DNAM-1 en superficie mientras que los CD8<sup>+</sup> presentan una baja expresión (Figura 57).

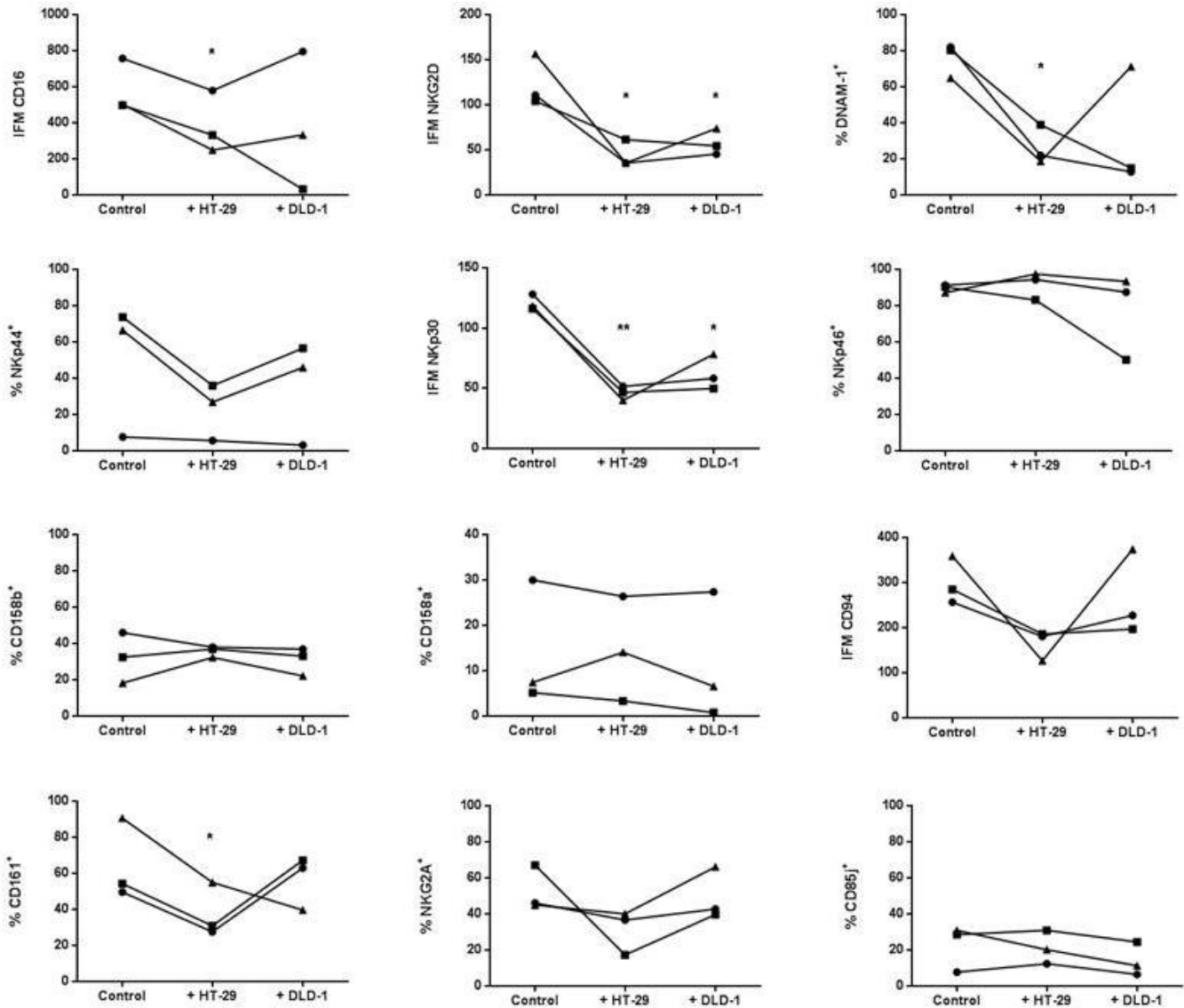


**Figura 57:** Expresión del receptor DNAM-1 en linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> intra-tumorales.

### **1.3 Evaluación de la inmunosupresión mediada por células tumorales sobre células NK mediante co-cultivos *in vitro*.**

Una vez determinado el perfil desregulado de las células NK intra-tumorales –disminución de receptores activadores y mantenimiento de receptores inhibitorios-, nos propusimos determinar si dicha característica era producto de la interacción física con células tumorales, o mediada por citoquinas propias del microambiente tumoral. Dada la escasez de células infiltrantes en el tejido, realizamos co-cultivos durante 5 días de células NK purificadas de SP obtenidas de DS con las líneas tumorales de CCR HT-29 y DLD-1 con el fin de emular *in vitro* el ambiente tumoral. Evaluamos mediante citometría de flujo la variación de expresión de diversos receptores de membrana, tanto en porcentaje como en IFM, luego del co-cultivo (Figura 58). Si bien existió variabilidad entre DS, las líneas tumorales indujeron la alteración del fenotipo normal, evidenciada por disminución en la expresión de los receptores activadores CD16, NKG2D, DNAM-1 y NKp30. La modulación parecería ser diferencial entre las líneas, lo que implicaría variaciones antigénicas o de perfil de liberación de moléculas potencialmente inmunosupresoras entre ambas. La línea HT-29 produjo la disminución de CD161, característica también de células NK infiltrantes al tumor. La expresión de los receptores inhibitorios no se modificó significativamente en el ensayo.

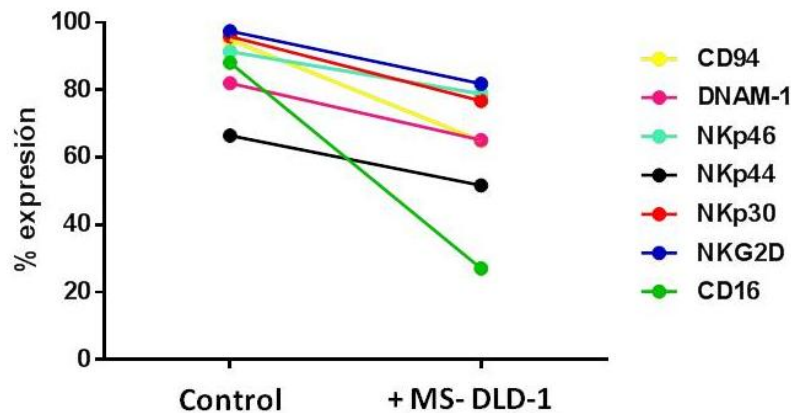
## RESULTADOS



**Figura 58:** Modulación del fenotipo de células NK de SP de DS mediante co-cultivos de 5 días con las líneas tumorales HT-29 y DLD-1 en relación 2,5:1 E:T. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

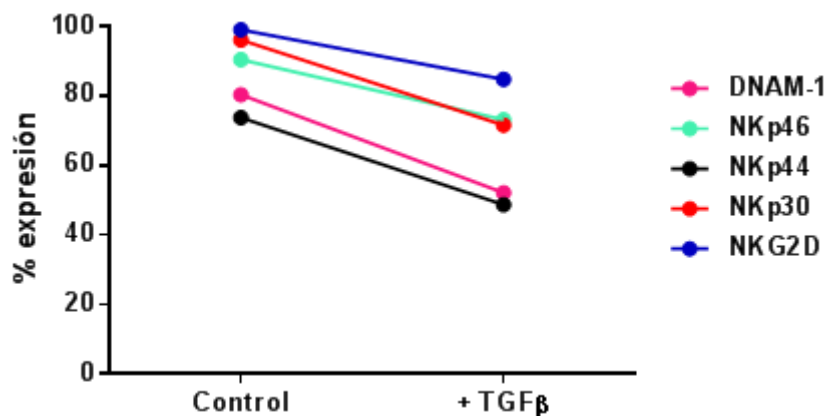
Teniendo en cuenta que la modulación del fenotipo de células NK puede ser causada tanto por contacto físico con antígenos presentes en la superficie de células tumorales como por liberación de factores por las mismas, evaluamos el efecto de mediadores solubles producidos por la línea DLD-1 –evitando mediante *transwells* el contacto directo- en aquellos casos en los que se observó variación en niveles de

expresión de receptores. Efectivamente, los factores solubles fueron capaces de modular, en un experimento, los receptores analizados aunque probablemente no sean responsables de la totalidad del efecto inmunosupresor ejercido sobre las células NK y existan efectos adicionales dependientes de contacto directo (Figura 59).



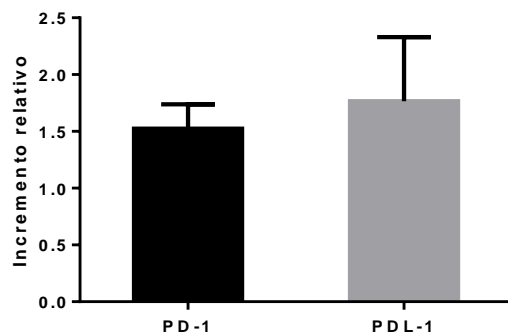
**Figura 59:** Modulación de la expresión de receptores de células NK de DS mediante interacción con mediadores solubles (MS) producidos por la línea celular DLD-1 durante 5 días.

Una de las moléculas inmunosupresoras, ampliamente asociada a procesos carcinogénicos y que tendría un peso aún mayor en el contexto del CCR, que consideramos potencial responsable de la modulación del fenotipo de células NK es TGF- $\beta$ . De esta manera, incubamos células NK de DS en presencia de la molécula recombinante y analizamos posteriormente la expresión de receptores activadores (Figura 60). Observamos un efecto negativo sobre los niveles de NKG2D, los NCR y DNAM-1 siendo este último el más afectado.



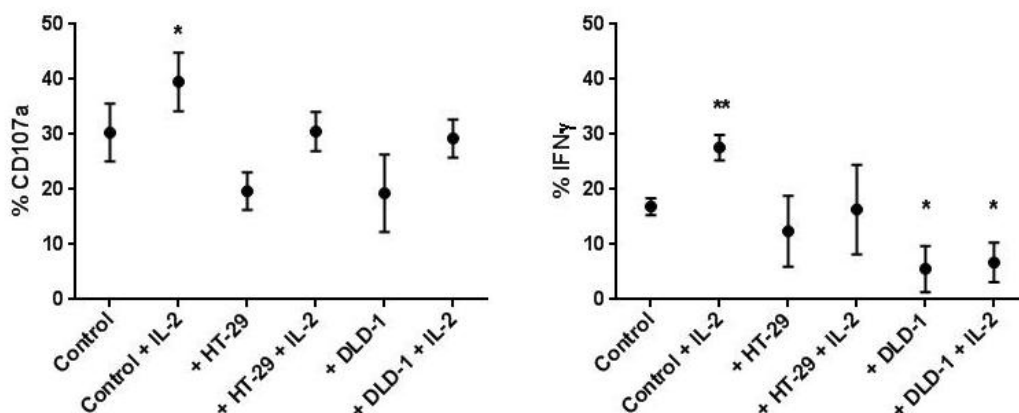
**Figura 60:** Modulación de la expresión de receptores activadores de células NK de DS mediante adición de TGFβ recombinante. N=1

Las células NK ejercen su acción sobre células blanco debido al balance integrado de señales de activación e inhibición constituido principalmente por los receptores activadores e inhibitorios mencionados. No obstante, el eje PD-1/PDL-1 de arresto de la activación podría cumplir un papel importante intrínsecamente y mediante interacción con otras células del sistema inmune<sup>114</sup>. Por esta razón, evaluamos su expresión en células NK de 3 DS y el impacto de la interacción con la línea DLD-1 en co-cultivos de 5 días (Figura 61). A pesar de la variabilidad entre donantes, observamos un aumento de expresión de ambas moléculas en todos los casos luego del co-cultivo con DLD-1, lo que implicaría un aporte adicional al contrarresto de activación inmune.



**Figura 61:** Incremento relativo de la expresión de PD-1 y PDL-1 en células NK de DS mediado por co-cultivos con la línea celular DLD-1. N=3

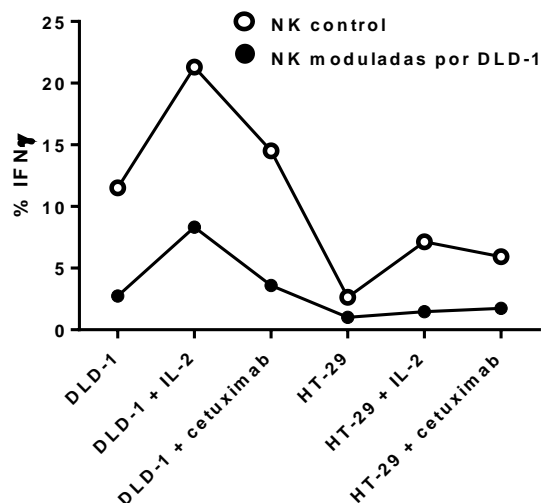
Con el objeto de determinar si la alteración del fenotipo de las células NK infiltrantes a tejido tumoral impacta en su función citotóxica y capacidad de liberar citoquinas inflamatorias; nuevamente emulando el contexto tumoral, realizamos ensayos funcionales a partir de células NK de DS moduladas mediante co-cultivos de 5 días con la línea DLD-1 o HT-29 (Figura 62). Se evaluó degranulación -expresión de molécula CD107a en membrana- y liberación de IFN $\gamma$  por citometría de flujo luego de un co-cultivo corto de 6 hs con la línea celular blanco K562. Se adicionó IL-2 como potenciador de la funcionalidad de células NK con el fin de evaluar su impacto en condiciones control y de tratamiento. Observamos una disminución de 11% -aunque no estadísticamente significativa- en la expresión de CD107a para células NK que habían sido cultivadas en presencia de las líneas tumorales. Asimismo, las células NK moduladas perdieron 5% y 10% de la capacidad de liberar IFN $\gamma$  luego del co-cultivo con HT-29 y DLD-1 respectivamente. Mientras las células NK control respondieron a IL-2 incrementando su porcentaje de degranulación y de liberación de citoquinas, la pérdida parcial de función de células NK moduladas, en ambos casos, no pudo ser revertida por IL-2.



**Figura 62:** Capacidad de degranulación y producción de IFN $\gamma$  frente al *target* K562 por células NK moduladas mediante co-cultivos con las líneas HT-29 o DLD-1, en presencia o ausencia de IL-2. N= 3 experimentos independientes. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

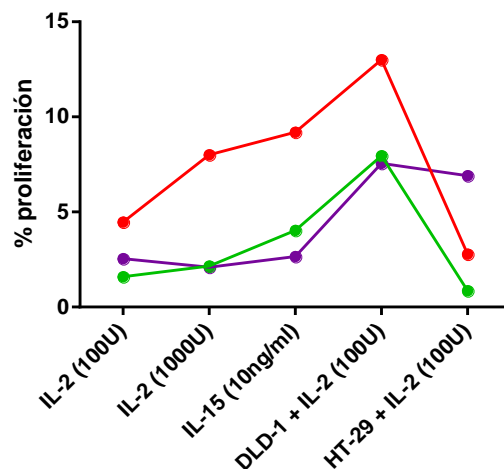
Teniendo en cuenta que la producción de IFN $\gamma$  se vio contundentemente alterada frente a células K562 para células NK moduladas por DLD-1, quisimos corroborar que el efecto fuera reproducible frente a otras líneas blanco, específicamente de CCR. De esta manera, enfrentamos células NK control de un DS y provenientes de co-cultivo con DLD-1 a las mismas líneas DLD-1 y HT-29 en una segunda oportunidad durante 6 hs, en presencia de IL-2 y el AM Cetuximab (Figura 63). Éste se une a la molécula EGFR en las células tumorales y su porción Fc gatilla la ADCC de células NK incrementando, a su vez, la producción de citoquinas inflamatorias. Observamos una drástica reducción en la producción de IFN $\gamma$  frente al *target* DLD-1 y una moderada frente a las células HT-29 en comparación al control. En ninguno de los dos casos la disminución pudo ser revertida por IL-2 o Cetuximab, concordando estos resultados con lo observado para la línea K562.





**Figura 63:** Producción de IFN $\gamma$  por células NK control o moduladas mediante co-cultivo de 5 días con DLD-1 de un DS. Las células fueron enfrentadas a los *targets* DLD-1 y HT-29, en presencia o ausencia de IL-2 y Cetuximab. N=1

Por último, evaluamos el índice proliferativo de células NK de SP de 3 DS luego de co-cultivarlas durante 5 días con las líneas celulares DLD-1 o HT-29 y en presencia de IL-2 o IL-15. Cabe mencionar que se consideró la concentración de 100U de IL-2 como concentración basal para el mantenimiento de las células en cultivo y, la concentración de 1000U como condición estimuladora. Observamos cierta proliferación moderada debida a las ILs (2 de 3 casos) y un aumento -mayor al doble- del índice proliferativo debido al co-cultivo con las células DLD-1, mientras que la línea HT-29 sólo en un caso generó proliferación de células NK (Figura 64).



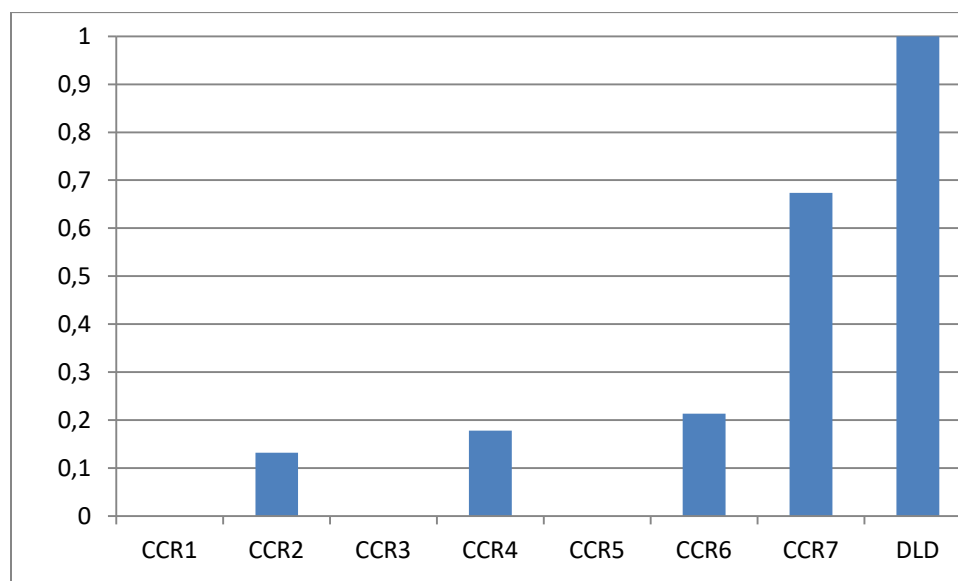
**Figura 64:** Porcentaje de proliferación de células NK de SP de DS luego de 5 días de co-cultivo en presencia de las líneas celulares DLD-1 o HT-29. Las células fueron mantenidas en condiciones basales (100U de IL-2) o estimulatorias (1000U de IL-2 o 10ng/ml de IL-15). Cada color representa un DS.

### 1.3 Evaluación por PCR de la expresión de TGF $\beta$ .

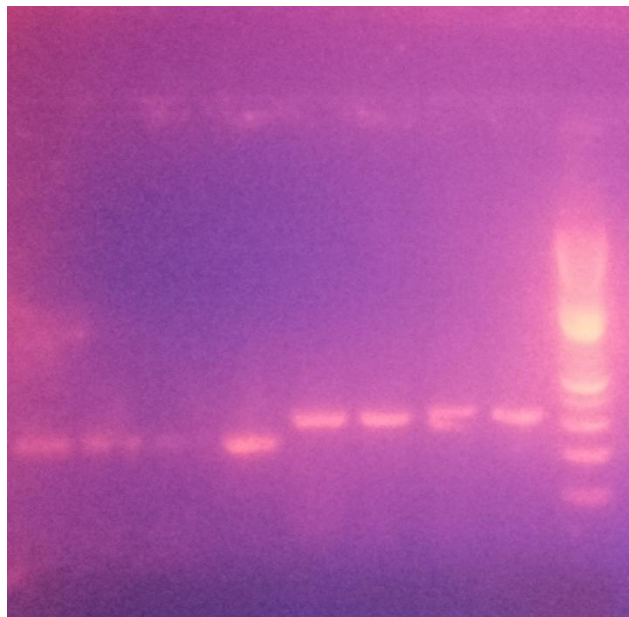
Con el fin de evaluar la presencia del factor inmunosupresor TGF $\beta$  en el microambiente tumoral, realizamos una extracción de ARN de muestras de tejido tumoral de pacientes con CCR, la retro-transcripción del mismo y PCR *real time*. Medimos  $\beta$ actina como gen control de cada muestra y consideramos la línea DLD-1 como control biológico. Mediante el método  $\Delta\Delta$ CT calculamos los valores relativos de TGF $\beta$  en cada muestra.

En primer lugar, observamos que las células DLD-1 presentaron altas cantidades de ARN mensajero correspondiente a TGF $\beta$ , lo que implicaría su secreción de manera constitutiva en cultivo, corroborando que el factor inmunosupresor forma parte de los mediadores solubles producidos por la línea de CCR y evaluados anteriormente.

Analizamos 7 muestras tumorales detectando niveles de ARN mensajero de TGF $\beta$  en 4 de ellas (Figura 65). No obstante, no podemos descartar que los 3 tumores restantes expresen TGF $\beta$  ya que sería necesario su análisis mediante un equipo *Bioanalyser* para la confirmación de la integridad de ARN. Procesamos los productos de las muestras que tuvieran cantidades detectables de TGF $\beta$  y de la línea DLD-1 en un gel de agarosa para visualizar la cantidad de pares de bases del ADN copia amplificado, corroborando que se trata de los productos deseados (Figura 66).



**Figura 65:** Niveles relativos de TGF $\beta$  en 7 muestras tumorales con respecto a la línea DLD-1, medidos por PCR *real time*.

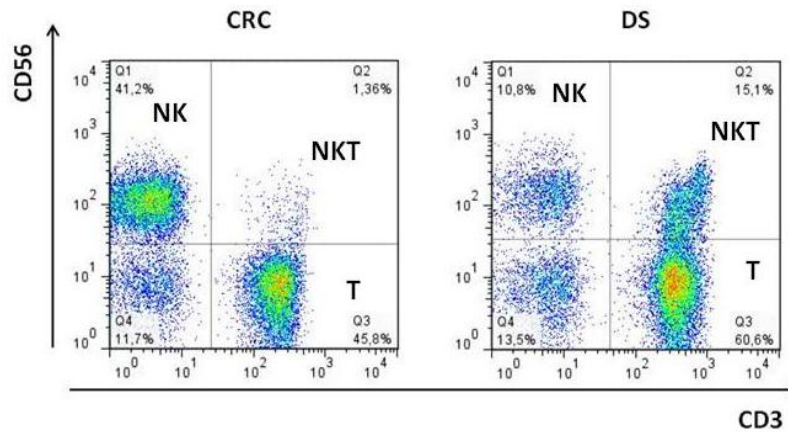


**Figura 66:** Gel de agarosa en el que fueron sembrados los productos de PCR *real time* en el siguiente orden: CCR2-TGF $\beta$ , CCR4-TGF $\beta$ , CCR6-TGF $\beta$ , DLD-1-TGF $\beta$ , CCR2- $\beta$ actina, CCR4- $\beta$ actina, CCR6- $\beta$ actina y DLD-1- $\beta$ actina. En la última fila se sembraron los marcadores de peso molecular. El transcripto de TGF $\beta$  es de 223 pb y el correspondiente a  $\beta$ actina de 317 pb.

## CAPÍTULO II: ROL DE LAS CÉLULAS NK DE SANGRE PERIFÉRICA EN EL CONTROL DE LA DISEMINACIÓN TUMORAL

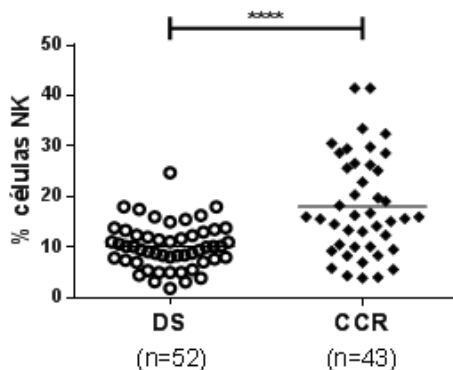
### ***2.1 Evaluación ex vivo de poblaciones linfocitarias de sangre periférica***

Con el fin de evaluar la participación de las células NK en el monitoreo y eliminación de las células tumorales que abandonan el nicho tumoral y migran periféricamente por vasos sanguíneos o linfáticos, analizamos muestras de SP de pacientes con CCR mediante citometría de flujo de acuerdo al esquema del apartado anterior -CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>-. Los pacientes fueron clasificados según estadificación TNM (ver Introducción) y sub-divididos en estadios tempranos -I y II- sin invasión ganglionar y, estadios tardíos -III y IV- con invasión ganglionar o metástasis a distancia. Se analizaron, en paralelo, 52 DS como cohorte de referencia. En la Figura 67 se muestran *dot-plots* ejemplificadores correspondientes a SP de paciente y de DS.



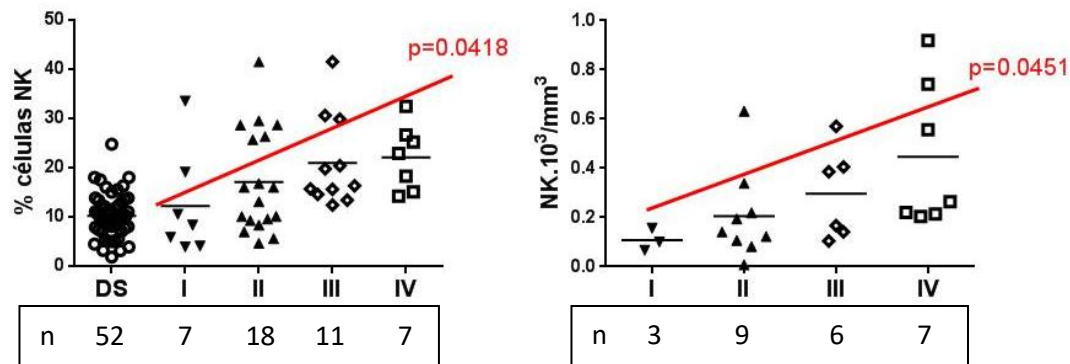
**Figura 67:** Dot-plots ejemplificadores de poblaciones linfocitarias de SP (células NK, células NKTlike y linfocitos T) de paciente con CCR y DS.

Analizamos el porcentaje de las poblaciones linfocitarias de células NK (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>), linfocitos T (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>) y células NKTlike (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) para ambos tipos de muestras. En primer lugar, observamos un aumento significativo de la proporción de células NK en SP de pacientes con respecto a DS (Figura 68). Teniendo en cuenta que la edad media de la cohorte de pacientes fue mayor que la correspondiente a DS (61.4 ± 12.0 y 38.0 ± 13.0 respectivamente, p < 0.0001) y que, se encuentra descrita una asociación positiva entre el porcentaje de células NK y la edad en DS<sup>115</sup>, confeccionamos un modelo de regresión lineal con el fin de dilucidar separadamente el efecto de la edad y de la presencia del cáncer como dos factores diferentes. La presencia de cáncer, independientemente de la edad, resultó en un incremento de 5,29% del porcentaje de células NK (p=0,016).



**Figura 68:** Porcentaje de células NK de SP para DS y pacientes con CCR. Para la comparación estadística se utilizó el test Mann-Whitney. \*\*\*\*p<0,0001

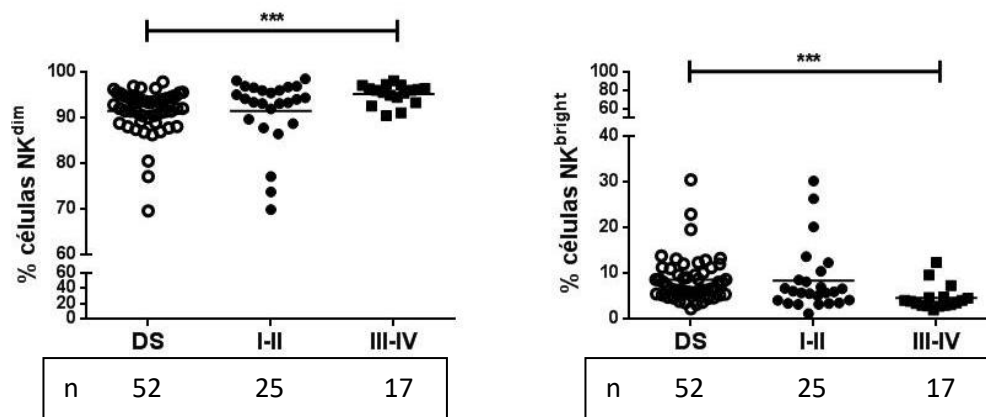
Al clasificar la cohorte de pacientes por estadio, observamos un incremento del porcentaje de células NK desde estadio I progresivamente hasta alcanzar los valores más altos en estadio IV evaluado mediante el test ANOVA con línea de tendencia (Figura 69). Asimismo, este incremento gradual se vio reflejado en el conteo absoluto de células NK, estudiado sólo en pacientes de los cuales se dispuso un hemograma realizado previamente a la cirugía. Cabe aclarar que el número absoluto de linfocitos totales medidos por  $\text{mm}^3$  no varió en SP de pacientes de distintos estadios ( $2,11 \pm 0,67$ ,  $1,76 \pm 0,63$ ,  $1,49 \pm 0,78$  y  $1,95 \pm 0,71 \cdot 10^3/\text{mm}^3$  para estadio I, II, III y IV respectivamente).



**Figura 69:** Izquierda. Porcentaje de células NK de SP de DS y de pacientes con CCR según estadio (I,II,III y IV). Se analizó estadísticamente mediante el test ANOVA con línea de tendencia ( $p < 0,05$ ). Derecha. Número absoluto de células NK de SP en pacientes con CCR según estadio (I,II,III y IV). Se analizó estadísticamente mediante el test ANOVA con línea de tendencia ( $p < 0,05$ ). Bajo cada gráfico se aclara el número de muestras.

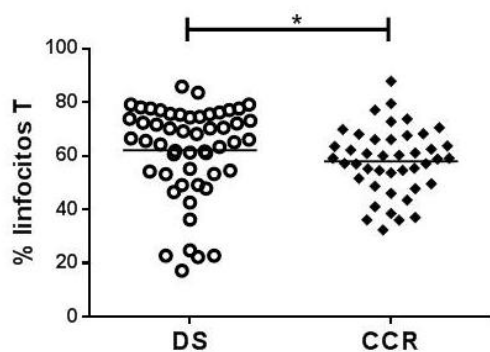
Dentro de la población de células NK de SP se analizaron las proporciones correspondientes a  $\text{CD56}^{\text{dim}}$  y  $\text{CD56}^{\text{bright}}$  para pacientes con CCR y DS (Figura 70). Si bien los valores medios fueron similares ( $\% \text{NK}^{\text{dim}}$   $93,06 \pm 6,240$  para pacientes y  $91,48 \pm 5,012$  para DS;  $\% \text{NK}^{\text{bright}}$   $6,78 \pm 6,01$  para pacientes y  $8,53 \pm 5,02$  para DS),

observamos un aumento significativo del porcentaje de células NK<sup>dim</sup> en pacientes de estadios tardíos de la enfermedad.



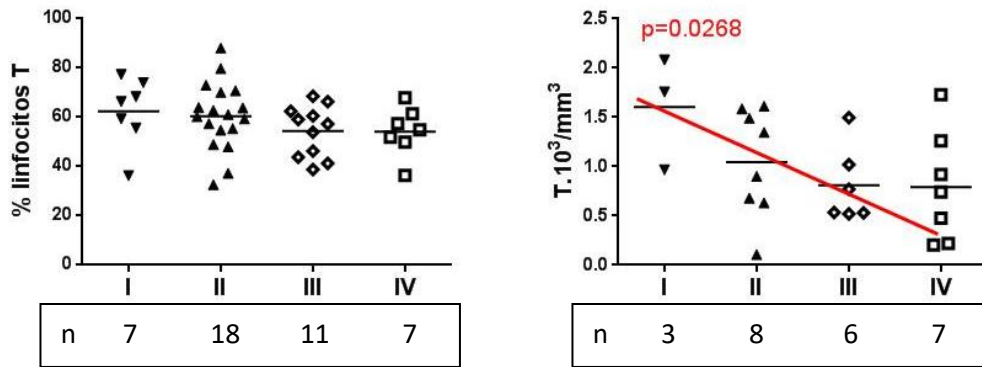
**Figura 70:** Porcentaje de células NK<sup>dim</sup> (Izquierda) y NK<sup>bright</sup> (Derecha) en muestras de DS y pacientes con CCR clasificados según estadios tempranos (I-II) y estadios tardíos (III-IV). En ambos casos se utilizó el test *Mann-Whitney* para la comparación estadística. \*\*\*p<0,001

Al evaluar el *subset* de linfocitos T de SP, observamos una ligera disminución de su porcentaje en pacientes con CCR con respecto a DS (Figura 71). Si bien dicho porcentaje no se vio afectado significativamente por el estadio de la enfermedad, el número absoluto de células T disminuyó de manera progresiva, evaluado nuevamente mediante el *test* ANOVA con línea de tendencia (Figura 72).



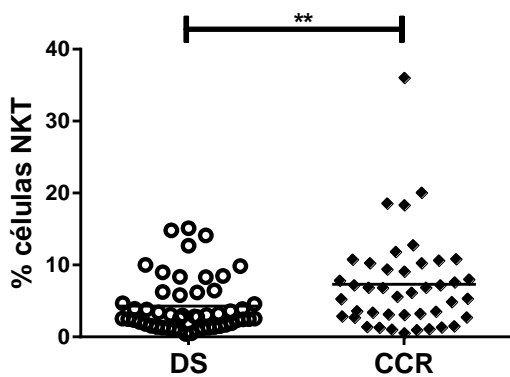
**Figura 71:** Porcentaje de linfocitos T de SP en la cohorte de DS (n=52) y pacientes con CCR (n=43). Se evaluó mediante el test *Mann-Whitney*. \*p<0,05



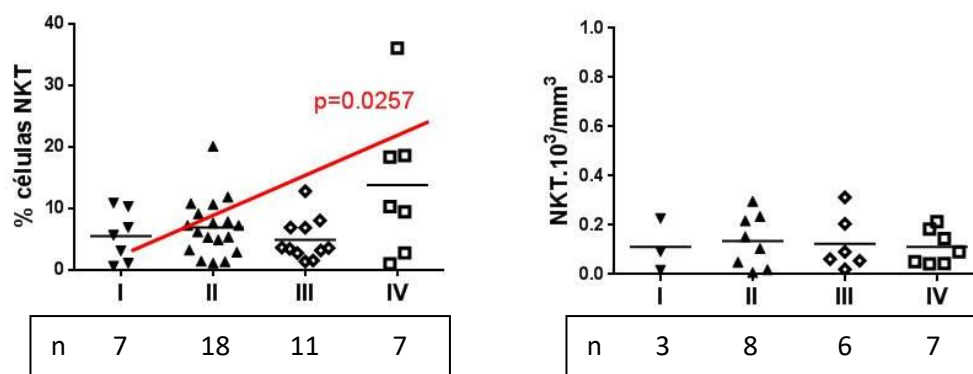


**Figura 72: Derecha.** Porcentaje de linfocitos T en SP de pacientes con CCR según el estadio de enfermedad (I,II,III y IV). **Izquierda.** Número absoluto de linfocitos T por mm<sup>3</sup> de SP de pacientes. Se evaluó estadísticamente mediante *test* ANOVA con línea de tendencia.

En cuanto a la población de células NKT de SP, observamos que mientras los pacientes con CCR presentaron una media de 7,30% ± 6,60, los DS presentaron un porcentaje menor de 4,30% ± 3,81 (Figura 73). Asimismo, se vio una tendencia al aumento del porcentaje de células NKT en pacientes según estadio de la enfermedad aunque no se vio reflejado por un aumento del número absoluto de estas células en SP (Figura 74).



**Figura 73:** Porcentaje de células NKT de SP de DS (n=52) y pacientes con CCR (n=43). La comparación estadística fue realizada mediante el *test* Mann-Whitney. \*\*p<0,01

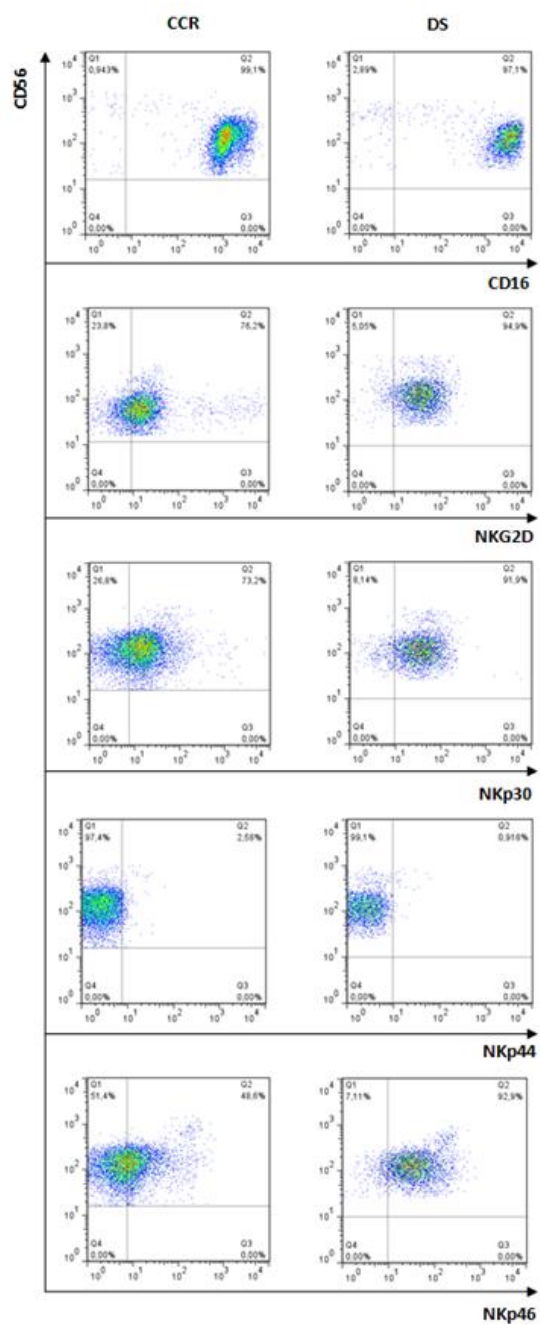


**Figura 74: Derecha.** Porcentaje de células NKT en SP de pacientes con CCR según estadio e la enfermedad (I,II,III y IV). Se realizó un *test* ANOVA con línea de tendencia. **Izquierda.** Número absoluto de células NKT de SP de pacientes con CCR según estadio. No se observaron diferencias significativas.

#### *Caracterización del fenotipo de células NK de pacientes con CCR en SP*

Evaluamos mediante citometría de flujo la expresión de receptores activadores e inhibitorios en las muestras de pacientes con CCR y DS (Figura 75 y 76). Los pacientes fueron nuevamente clasificados de acuerdo a estadios tempranos y tardíos y cotejados con la cohorte de DS (Figura 77). En primer lugar, determinamos que la mayoría de los receptores presentaron una mayor variabilidad inter-individual en la cohorte de pacientes y, por lo tanto, un rango mayor de niveles de expresión. Observamos una desregulación de la expresión de dichos receptores de células NK en pacientes desde estadios tempranos de la enfermedad, caracterizada por una menor expresión de los receptores activadores NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp46. Asimismo, se vio disminuida la expresión de los receptores CD94, CD161 y el KIR CD158a, de manera análoga a lo observado en células NK infiltrantes al tumor. Los receptores inhibitorios NKG2A y CD85j se vieron aumentados en pacientes de estadios tempranos. La expresión de NKp44 y

CD158b, así como la de la molécula CD8 -presente en células NK e indicador de activación- no se vio afectada en SP de pacientes con respecto a DS.



**Figura 75:** Dot plots ejemplificadores de receptores de células NK de SP de la cohorte de pacientes con CCR y de DS.

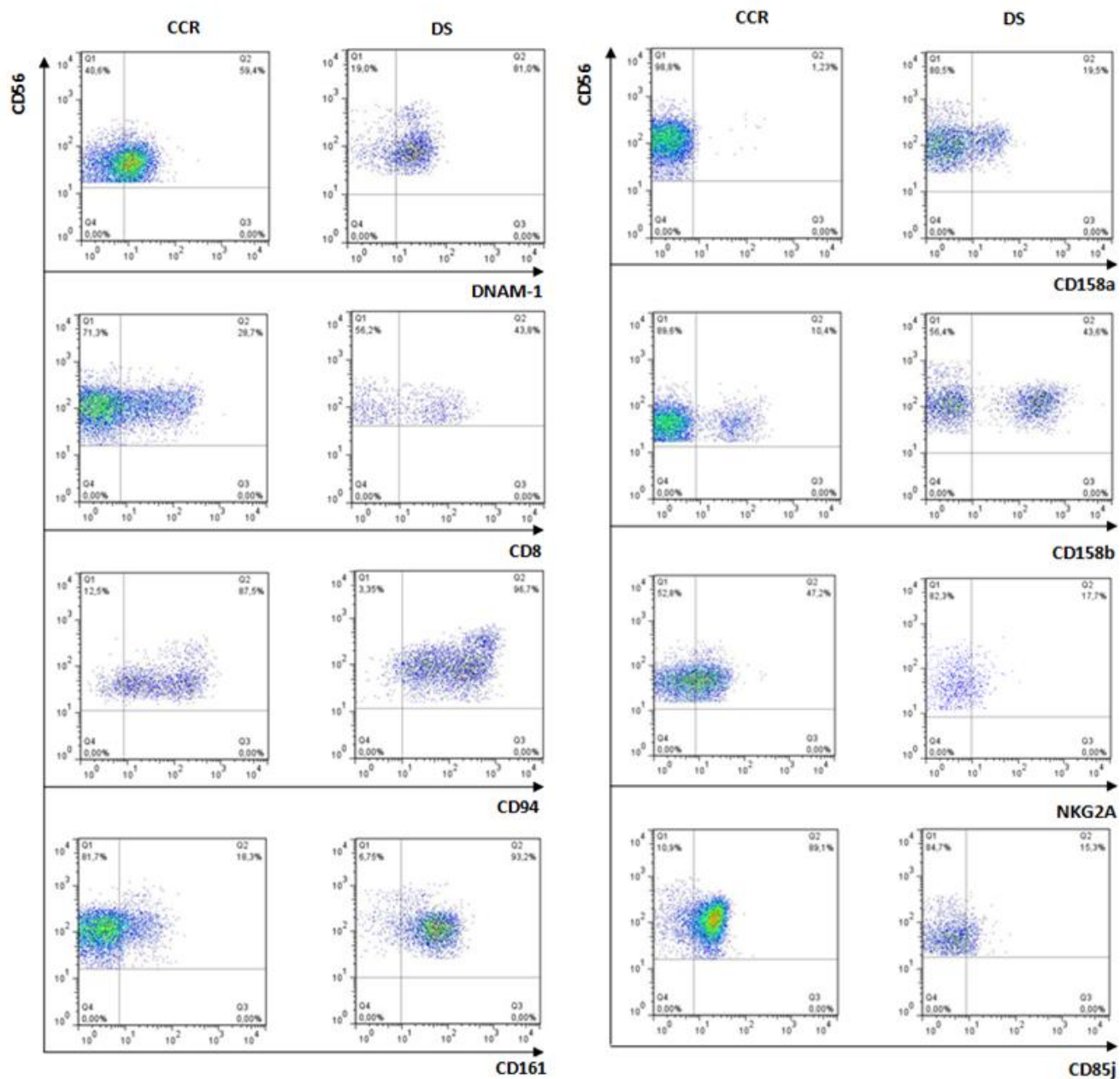
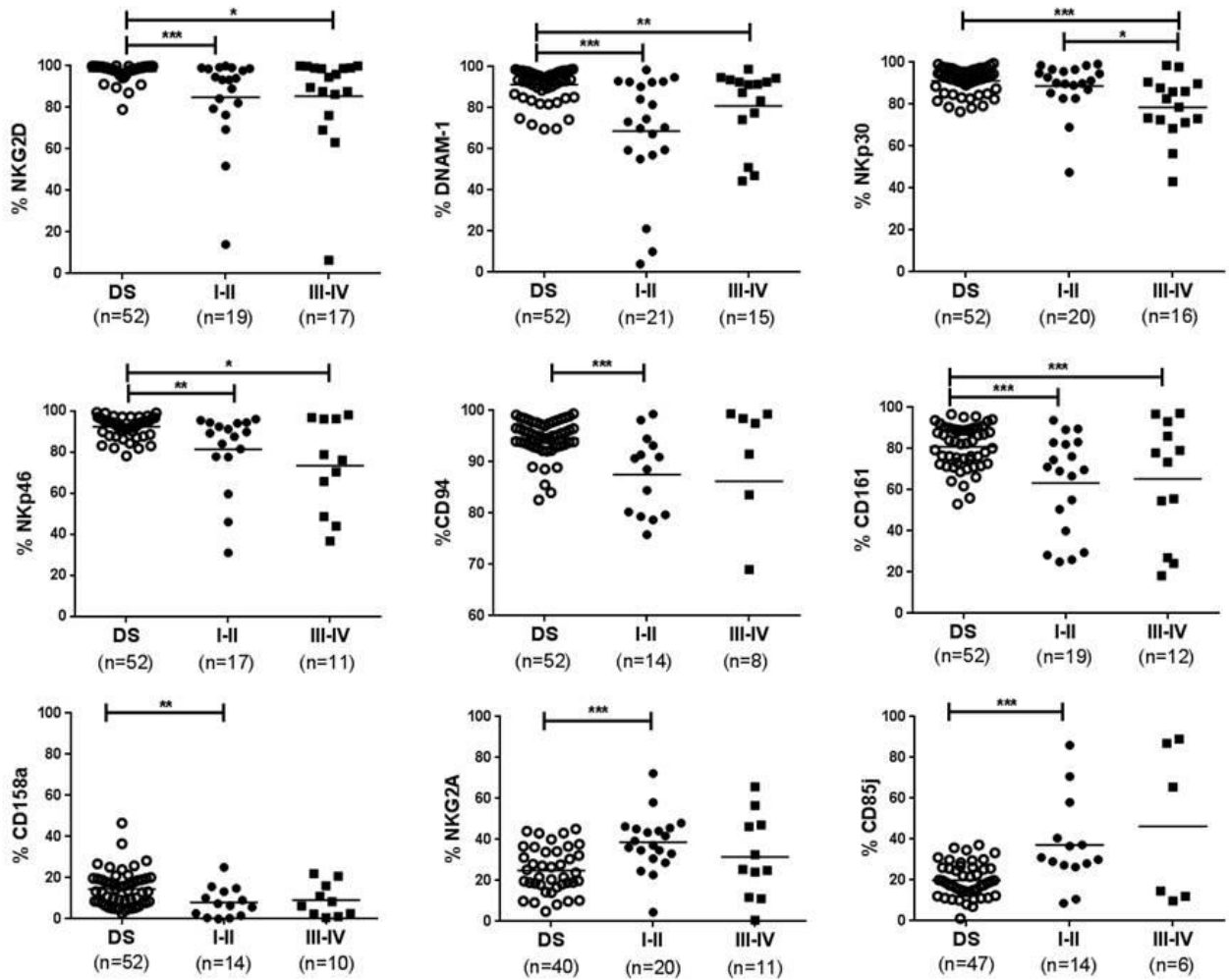
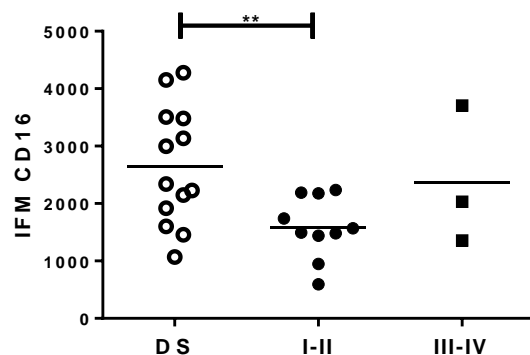


Figura 76: Dot plots ejemplificadores de receptores de células NK de SP en la cohorte de pacientes con CCR y de DS.



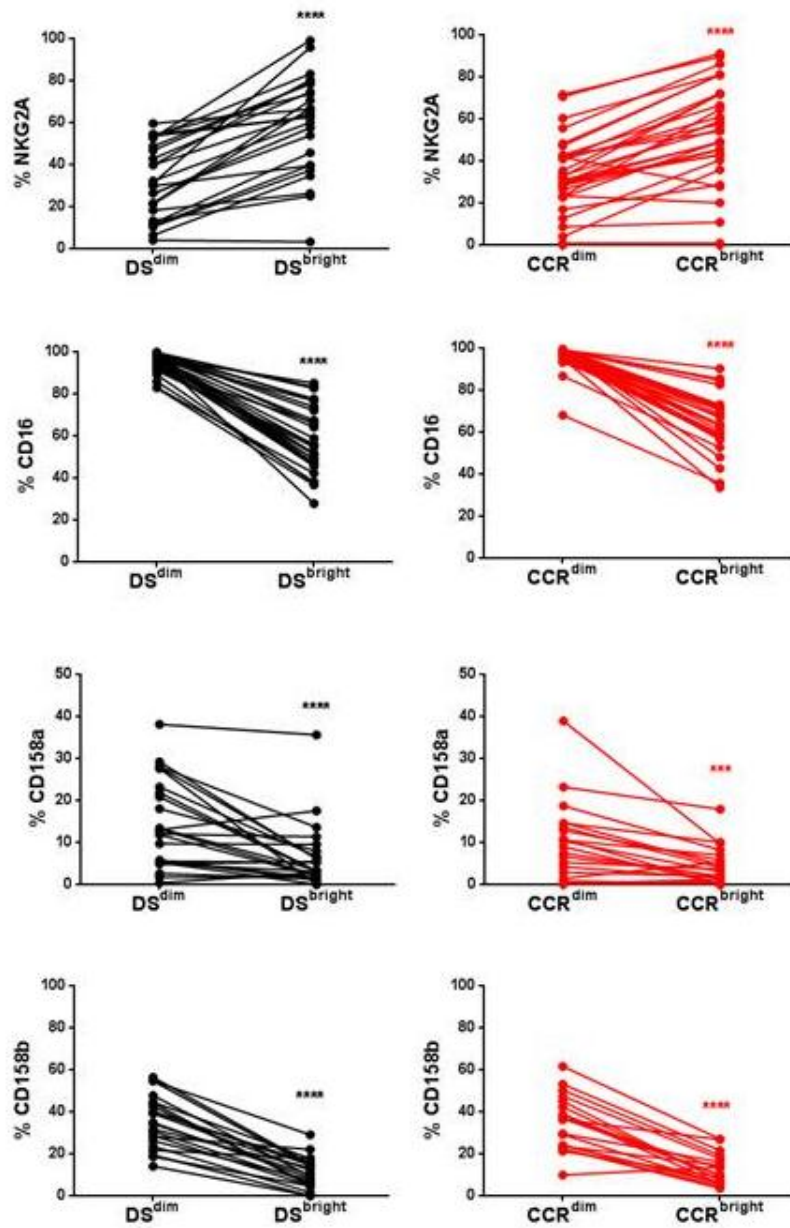
**Figura 77:** Fenotipo de células NK de SP de DS y de pacientes con CCR, clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV). Se indica en cada gráfico el número de muestras analizadas. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test* Mann-Whitney.\*p<0,05 \*\* p<0,01\*\*\*p<0,001.

Cabe mencionar que, si bien no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje de células que expresaron el receptor CD16, las células NK de pacientes con CCR presentaron menor expresión de la molécula por célula –desde estadios tempranos-, evidenciado por una disminución en la IFM con respecto a la correspondiente de DS (Figura 78).



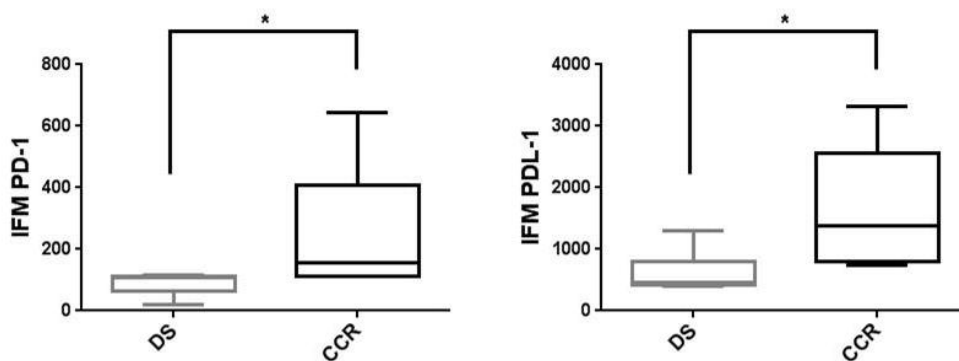
**Figura 78:** Intensidad de fluorescencia media (IFM), medida mediante citometría de flujo, del receptor CD16 en células NK de SP de DS y de pacientes con CCR clasificados según estadio. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test* Mann-Whitney. \* $p < 0,01$ .

Teniendo en cuenta que la diferencia en porcentaje de los *subsets* dim/bright de células NK fue marginal, que sólo ocurrió a partir de estadios tardíos y, que las diferencias de porcentaje de expresión de receptores fueron observadas desde estadios tempranos, éstas no se deberían a una variación de dichos *subsets* dim/bright. Se sabe que ciertos receptores son más expresados por un *subset* particular que por el otro. Tal es el caso del receptor CD16 –más expresado en células dim-, los KIRs –más expresados en células dim- y el receptor inhibitorio NKG2A –más expresado en células bright-. El patrón de expresión de estos receptores en los *subsets* dim/bright fue equivalente en la cohorte de pacientes y la de DS (Figura 79).



**Figura 79:** Expresión de los receptores NKG2A, CD16 y los KIRs CD158a y CD158b, en células  $NK^{dim}$  y  $NK^{bright}$  en las cohortes de DS (Izquierda) y de pacientes con CCR (Derecha).

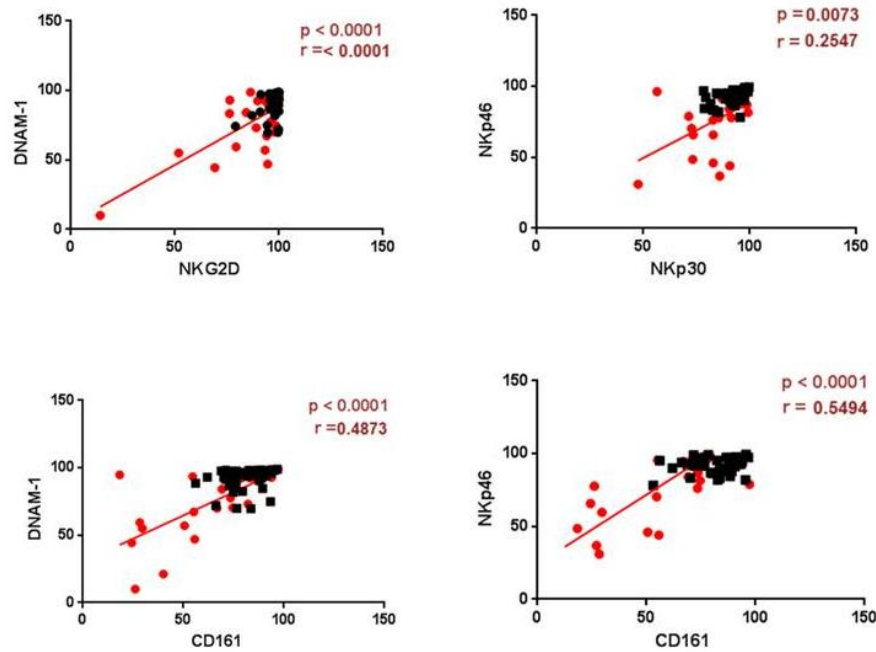
Además de los receptores característicos de la población de células NK, éstas pueden expresar en membrana las moléculas PD-1 y PDL-1 regulando su propia respuesta y la de otras poblaciones del sistema inmune<sup>114</sup>. Analizamos la expresión de estas moléculas en seis muestras de DS y de pacientes con CCR y observamos que, en estos últimos se encuentra incrementada (Figura 80). Este aumento de la expresión de *immune-checkpoints* implicaría un perfil de agotamiento<sup>116</sup>.



**Figura 80:** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de las moléculas PD-1 y PDL-1 en células NK de SP de DS y de pacientes con CCR. Se grafican el mínimo y el máximo muestral junto con la mediana. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test* Mann-Whitney. \* $p < 0,05$ .

Al evaluar los niveles de expresión de los distintos receptores de células NK en su conjunto, hallamos correlaciones positivas entre DNAM-1 - NKG2D, DNAM-1 - CD161, NKp46 - NKp30 y NKp46 - CD161 (Figura 81). Esta asociación de la expresión, ausente en DS - cohorte en la que la variabilidad muestral es menor-, podría implicar mecanismos compartidos de regulación entre los receptores mencionados.





**Figura 81:** Correlaciones positivas entre la expresión de distintos receptores de células NK de SP de pacientes con CCR (Rojo) o DS (Negro). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Pearson* –distribución muestral normal- o *Spearman* –distribución muestral no normal-. En cada gráfico se indican los coeficientes de regresión  $r$  y los valores de  $p$ .

Teniendo en cuenta que el porcentaje de células NK puede variar de acuerdo a la edad y al estadio de la enfermedad, evaluamos si otras características clínicas podrían influir en el status fenotípico de las células NK de pacientes con CCR. Clasificamos los pacientes de acuerdo a la localización del tumor –colon derecho, colon izquierdo y recto-, al nivel de CEA en plasma –elevado y bajo de acuerdo al valor de corte 5 ng/ml-, al grado de diferenciación tumoral –bien diferenciado y pobremente diferenciado-, a la invasión vascular-linfática –presente o ausente- y, finalmente, a la estadificación –estadios tempranos y tardíos-. Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 4. Sorprendentemente, las células NK de pacientes con tumores de tipo histológico pobremente diferenciado –

asociado a mal pronóstico- expresaron altos porcentajes de los receptores activadores NKG2D ( $p < 0,05$ ) y DNAM-1 -aunque estadísticamente no significativo- y, alta expresión de CD94 y CD161, alcanzando en todos los casos valores similares a los correspondientes de DS. A su vez, el receptor CD94 se expresó en mayor medida en células NK de pacientes con altos niveles plasmáticos de CEA, también asociado a mal pronóstico clínico. Por otro lado, la expresión de NKG2A y CD8 se vio disminuida ( $p < 0,05$  y  $p < 0,01$  respectivamente) en células NK de pacientes que presentaron invasión vaso-linfática -un potente marcador de peor pronóstico que es tenido en cuenta en la decisión terapéutica- alcanzando, para el caso de NKG2A, valores equivalentes a los de DS.

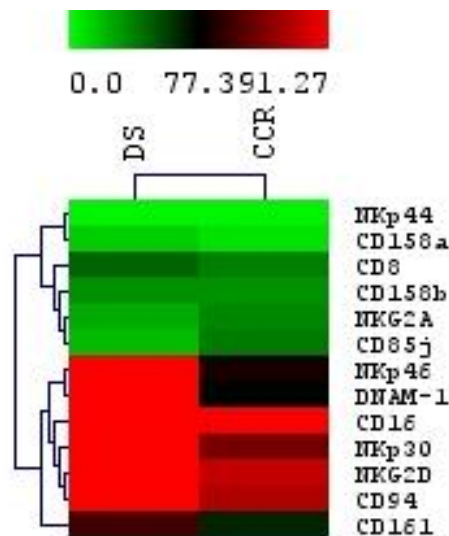
Cabe mencionar que no observamos asociaciones en la expresión de receptores con la edad o el sexo en la cohorte de DS mientras que, en el grupo de pacientes, observamos una tendencia no significativa de aumento del receptor CD85j con la edad.

RESULTADOS

|              |   | Localización  |                 |           | CEA          |           | Tipo histológico  |                              | IVL           |           | Estadios      |           |
|--------------|---|---------------|-----------------|-----------|--------------|-----------|-------------------|------------------------------|---------------|-----------|---------------|-----------|
|              |   | Colon Derecho | Colon Izquierdo | Recto     | Bajo         | Alto      | Bien diferenciado | Pobrementemente diferenciado | Ausente       | Presente  | I-II          | III-IV    |
| % Células NK | n | 7             | 24              | 12        | 20           | 15        | 37                | 6                            | 22            | 21        | 26            | 17        |
|              | % | 18.3±9.3      | 18.9±11.3       | 19.6±14.3 | 18.7±11.3    | 21.1±13.1 | 18.5±12.1         | 21.8±8.9                     | 20.7±13.3     | 17.2±9.6  | 17.1±13.3     | 21.8±8.1  |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | <b>0.0469</b> |           |
| % CD16       | n | 6             | 21              | 7         | 18           | 12        | 27                | 6                            | 17            | 16        | 20            | 13        |
|              | % | 89.2±6.8      | 93.4±5.0        | 96.3±2.2  | 93.3±4.7     | 93.2±5.6  | 92.8±5.7          | 94.5±3.5                     | 92.7±5.2      | 93.3±5.7  | 92.2±5.5      | 94.5±4.9  |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % NKG2D      | n | 9             | 19              | 8         | 23           | 13        | 28                | 8                            | 17            | 18        | 19            | 17        |
|              | % | 89.2±10.5     | 87.1±22.2       | 87.2±10.6 | 84.2±25.1    | 88.1±14.8 | 82.5±24.1         | 96.0±5.7                     | 89.2±12.7     | 81.1±28.4 | 84.9±21.3     | 85.4±23.3 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | <b>0.0168</b>     |                              | ns            |           | ns            |           |
| % NKp30      | n | 11            | 20              | 5         | 22           | 14        | 30                | 6                            | 16            | 19        | 20            | 16        |
|              | % | 83.9±12.7     | 85.4±14.2       | 79.5±18.1 | 82.6±15.2    | 86.0±11.7 | 86.2±13.7         | 78.8±15.0                    | 82.1±17.9     | 85.7±10.5 | 88.6±12.0     | 78.5±14.7 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | <b>0.0126</b> |           |
| % CD161      | n | 8             | 19              | 4         | 17           | 12        | 26                | 5                            | 16            | 15        | 19            | 12        |
|              | % | 63.2±14.8     | 65.3±30.0       | 60.1±21.3 | 62.0±27.2    | 70.0±23.1 | 61.1±25.7         | 79.4±17.2                    | 70.9±23.3     | 57.5±25.6 | 63.3±23.1     | 65.3±28.9 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % DNAM-1     | n | 7             | 25              | 4         | 20           | 14        | 30                | 6                            | 18            | 16        | 21            | 15        |
|              | % | 70.6±29.0     | 74.7±25.7       | 73.9±10.5 | 71.5±26.3    | 82.8±16.1 | 70.9±25.8         | 87.9±10.5                    | 78.3±16.9     | 68.3±32.2 | 68.7±27.6     | 81.0±18.6 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % NKp46      | n | 7             | 17              | 4         | 16           | 12        | 22                | 6                            | 15            | 13        | 17            | 11        |
|              | % | 77.5±24.1     | 80.2±17.8       | 71.4±28.0 | 77.0±23.0    | 81.7±16.4 | 76.4±22.0         | 83.7±10.1                    | 78.6±22.4     | 77.9±18.6 | 81.4±18.7     | 73.5±22.7 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % CD158a     | n | 6             | 12              | 6         | 13           | 9         | 20                | 3                            | 12            | 12        | 14            | 10        |
|              | % | 9.0±9.9       | 8.8±7.7         | 8.3±6.5   | 8.2±8.2      | 10.3±6.8  | 8.3±7.4           | 11.0±10.0                    | 8.9±8.2       | 8.2±7.0   | 8.1±7.3       | 9.2±8.1   |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % CD94       | n | 5             | 14              | 3         | 10           | 9         | 17                | 5                            | 12            | 9         | 14            | 8         |
|              | % | 87.3±12.8     | 86.3±12.7       | 90.2±9.8  | 83.9±13.4    | 93.8±5.2  | 84.5±12.0         | 95.8±6.4                     | 88.9±9.5      | 83.4±14.6 | 87.5±7.7      | 86.2±17.7 |
|              | p | ns            |                 |           | <b>0.035</b> |           | <b>0.0188</b>     |                              | ns            |           | ns            |           |
| % NKp44      | n | 6             | 14              | 4         | 13           | 9         | 17                | 7                            | 12            | 11        | 15            | 9         |
|              | % | 4.2±3.5       | 2.0±1.6         | 1.8±1.6   | 2.2±2.8      | 3.0±1.8   | 2.7±2.4           | 2.1±2.2                      | 3.3±2.7       | 1.7±1.8   | 2.5±2.5       | 2.6±2.1   |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % CD85j      | n | 4             | 13              | 3         | 11           | 7         | 20                | 0                            | 11            | 9         | 14            | 6         |
|              | % | 43.7±31.8     | 34.0±25.2       | 60.4±24.5 | 44.5±28.1    | 40.8±25.4 | 39.9±26.8         |                              | 39.1±23.4     | 40.9±31.9 | 37.2±21.4     | 46.3±38.4 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % CD158b     | n | 7             | 9               | 5         | 15           | 5         | 18                | 3                            | 11            | 10        | 14            | 7         |
|              | % | 30.4±9.9      | 33.7±16.9       | 33.7±18.0 | 31.3±14.7    | 33.0±13.9 | 32.9±15.5         | 34.9±7.8                     | 28.2±14.3     | 38.0±13.3 | 29.3±15.0     | 39.1±11.9 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | ns            |           | ns            |           |
| % CD8        | n | 3             | 10              | 4         | 9            | 6         | 17                | 0                            | 9             | 8         | 12            | 5         |
|              | % | 35.7±22.7     | 32.9±13.3       | 55.2±20.1 | 41.3±17.6    | 43.9±14.5 | 38.6±18.2         |                              | 49.3±15.6     | 26.6±12.9 | 41.8±19.6     | 31.2±12.9 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | <b>0.0054</b> |           | ns            |           |
| % NKG2A      | n | 6             | 20              | 5         | 19           | 8         | 24                | 5                            | 16            | 14        | 20            | 11        |
|              | % | 43.3±16.6     | 36.6±16.3       | 25.5±14.8 | 33.6±14.1    | 46.5±19.3 | 36.3±11.2         | 39.1±32.0                    | 42.2±16.0     | 28.3±14.5 | 38.6±13.9     | 31.5±20.4 |
|              | p | ns            |                 |           | ns           |           | ns                |                              | <b>0.0196</b> |           | ns            |           |

**Tabla 6:** Expresión (%) de receptores de células NK y asociación con variables clínicas - localización, nivel de CEA, tipo histológico, invasión vaso-linfática y estadificación- de pacientes con CCR. Se muestra en cada caso el número n de muestras analizadas y el p del test estadístico.

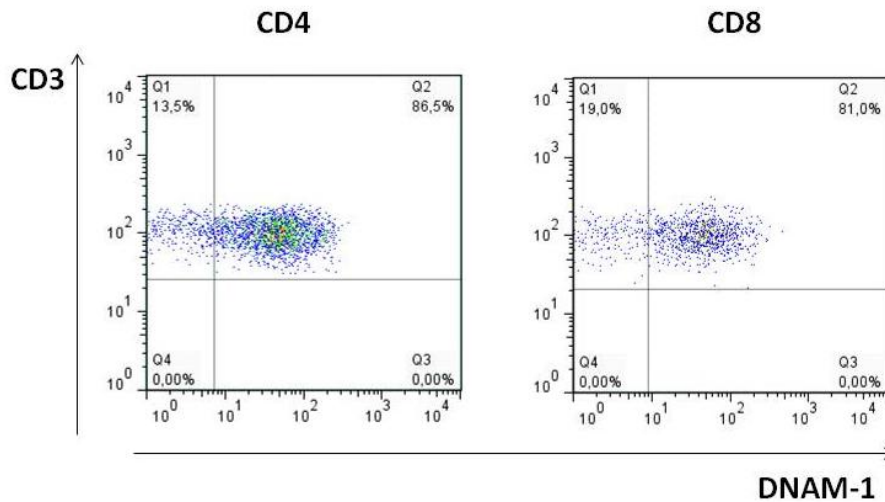
Con el fin de analizar la expresión de los receptores activadores e inhibitorios de células NK de DS y de pacientes con CCR en su conjunto, realizamos un análisis de agrupamiento o *clustering* de los mismos mediante el programa TMeV (Figura 82). Pudieron diferenciarse claramente las cohortes de DS y de pacientes siendo el *cluster* de receptores DNAM-1 y NKp46 el de mayor peso ( $p < 0,05$ ).



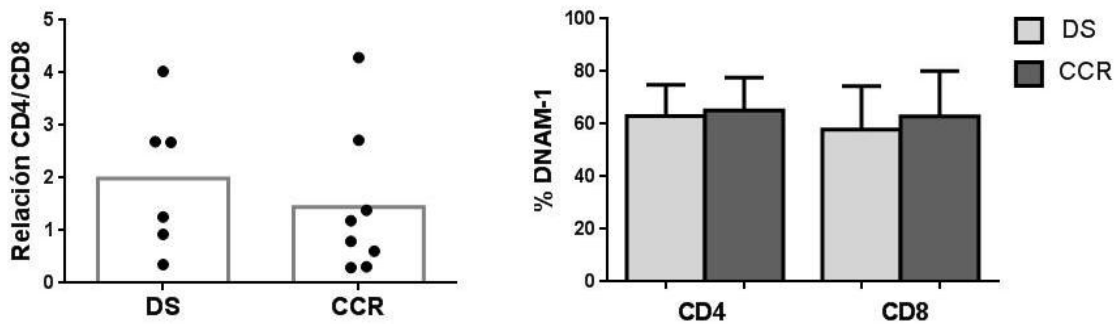
**Figura 82:** Análisis de agrupamiento de datos de receptores de células NK de SP de DS y de pacientes con CCR. Para el análisis se utilizó la métrica Euclideana.

Con la idea de evaluar si esta importante desregulación observada en células NK de pacientes con CCR presenta un correlato con otras poblaciones de la inmunidad adaptativa, analizamos en 6 casos porcentajes de linfocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> dentro del *subset* CD3<sup>+</sup>. En la Figura 83 se muestra un *dot plot* ejemplificador. Observamos que la relación CD4/CD8 se mantuvo similar a la correspondiente a la cohorte de DS (Figura 84). Asimismo, para ambas cohortes la expresión del

receptor DNAM-1, tanto en linfocitos CD4 como CD8 fue equivalente, lo que implica que la desregulación del receptor es exclusiva de células NK (Figura 84).

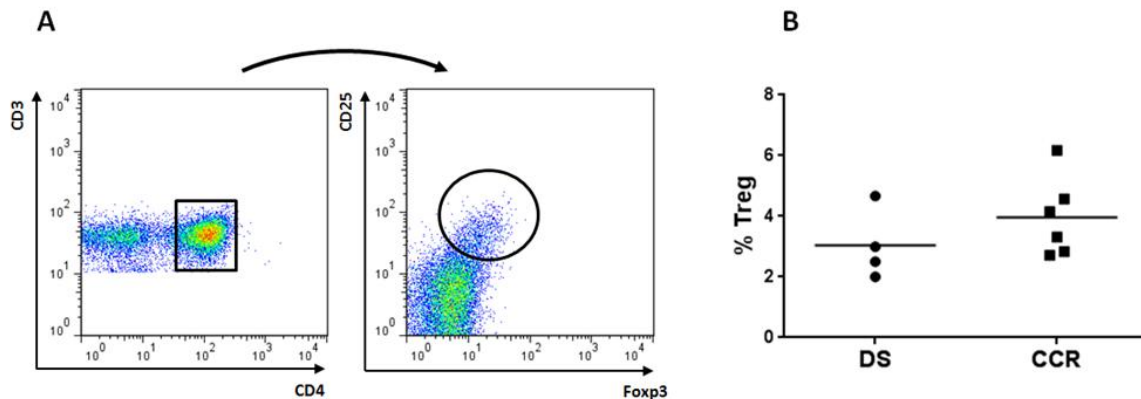


**Figura 83:** *Dot plots* a modo de ejemplo de la expresión de DNAM-1 en las poblaciones de linfocitos CD4<sup>+</sup> (Izquierda) y CD8<sup>+</sup> (Derecha).



**Figura 84:** **Izquierda.** Relación de linfocitos CD4/CD8 dentro de la población CD3<sup>+</sup> en DS y pacientes con CCR. **Derecha.** Expresión del receptor DNAM-1 en los *subsets* CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en la cohorte de DS y de pacientes con CCR. N=6

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la proporción de células T regulatorias de SP  $-CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$  entre DS y pacientes con CCR (Figura 85).



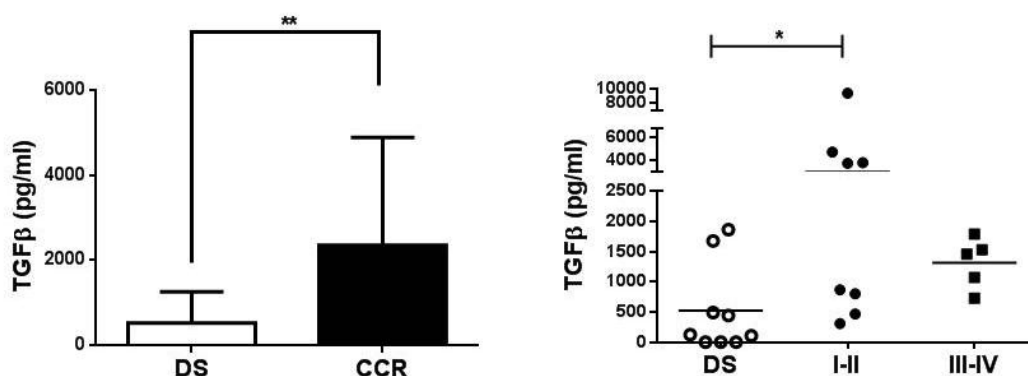
**Figura 85:** A. Dot plots ejemplificadores de la población  $CD4^+$  y la población de linfocitos Treg ( $CD3^+CD4^+CD25^+Foxp3^+$ ). B. Porcentaje de células T regulatorias dentro de la población de linfocitos  $CD4^+$  para la cohorte de DS y de pacientes con CCR.

En busca de factores sistémicos que expliquen la desregulación fenotípica observada, evaluamos moléculas solubles en SP asociadas a la modulación de la expresión de receptores de células NK<sup>117/118</sup>. Para ello, realizamos ensayos de ELISA para HLA-E y HLA-G solubles (HLA-Es y HLA-Gs) y TGF- $\beta$ .

En primer lugar, encontramos HLA-Es detectable ( $>5$  pg/ml) en 7 de 35 muestras de plasma de pacientes con una media de  $22.9 \pm 53.4$  y un rango 0-187.4 pg/ml, que no presentó diferencias significativas con la correspondiente a DS de referencia. A su vez, se detectó HLA-Gs ( $>5$  ng/ml) en 6 de 43 plasma de pacientes con una media de  $1.8 \pm 5.1$  y un rango 0-23.0 ng/ml, sin diferencias significativas con DS.

Al evaluar la presencia de TGF $\beta$  soluble en plasma de 13 pacientes, observamos que ésta superó en gran medida a la correspondiente de DS,

alcanzando casi 5 veces su valor. Este aumento en la cantidad de TGF $\beta$  fue evidenciado tanto en plasma de pacientes desde estadios tempranos, lo que implica que su producción ocurriría desde etapas iniciales de la enfermedad (Figura 86).



**Figura 86: Izquierda.** Concentración de TGF $\beta$  en plasma de DS y pacientes con CCR. **Derecha.** Concentración de TGF $\beta$  en plasma de pacientes clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

## 2.2 Evaluación de la funcionalidad de células NK

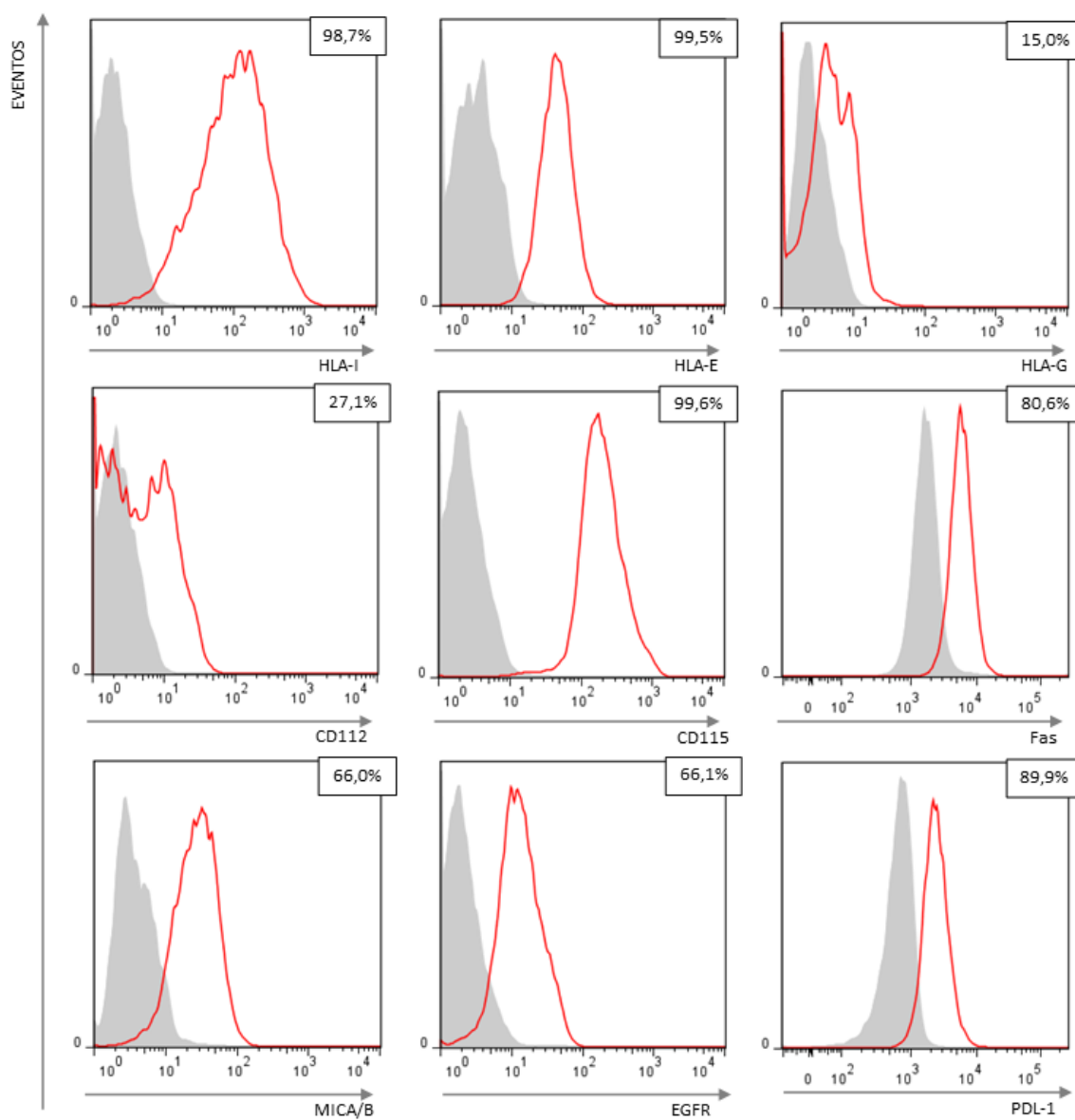
Con el fin de determinar si el fenotipo alterado de células NK de SP de pacientes con CCR repercute en su funcionalidad, se realizaron ensayos de citotoxicidad, degranulación y producción de IFN $\gamma$  frente diferentes células blanco: K562 *-target* canónico de células NK por la ausencia de expresión de HLA-I- y las líneas de CCR HT-29 y DLD-1. En primer lugar, caracterizamos la expresión de ligandos de receptores de células NK en dichas líneas (Figuras 87, 88 y 89).

Las células HT-29 presentan alta expresión de HLA-I y, en menor medida, HLA-G. Las moléculas HLA son reconocidas por los receptores KIR de células NK mientras que HLA-G por CD85j. A su vez, expresan en membrana CD112 y CD155, ligandos del receptor activador DNAM-1 y, las moléculas MICA/B reconocidas

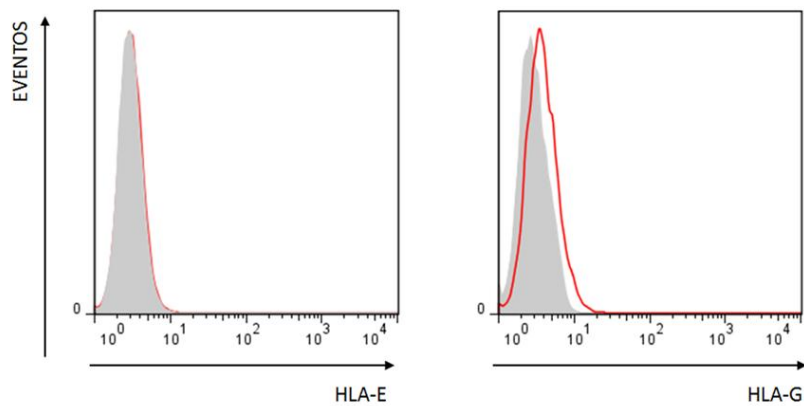
por NKG2D. Las células HT-29 expresan Fas, molécula que unida a FasL de células NK puede desencadenar el proceso de apoptosis celular. Además, expresan EGFR, frecuentemente presente en tumores de CCR. Finalmente, determinamos que alrededor de un 90% de las células HT-29 expresan la molécula PDL-1 que interactúa con PD-1, presente en linfocitos T y en células NK (Figura 87).

Las células DLD-1 portan una mutación en el gen  $\beta$ 2microglobulina por lo que no presentan en membrana gran parte de las moléculas de HLA-I que, excepto algunas isoformas<sup>71</sup>, requieren de  $\beta$ 2microglobulina para expresarse (Figura 88). Por otro lado, expresan CD112 y CD155 así como B7H6, ligando del receptor activador NKp30. A su vez, expresan MICA/B e EGFR en membrana (Figura 89). Como en el caso de las células HT-29, expresan Fas y PDL-1, aunque en menor medida.

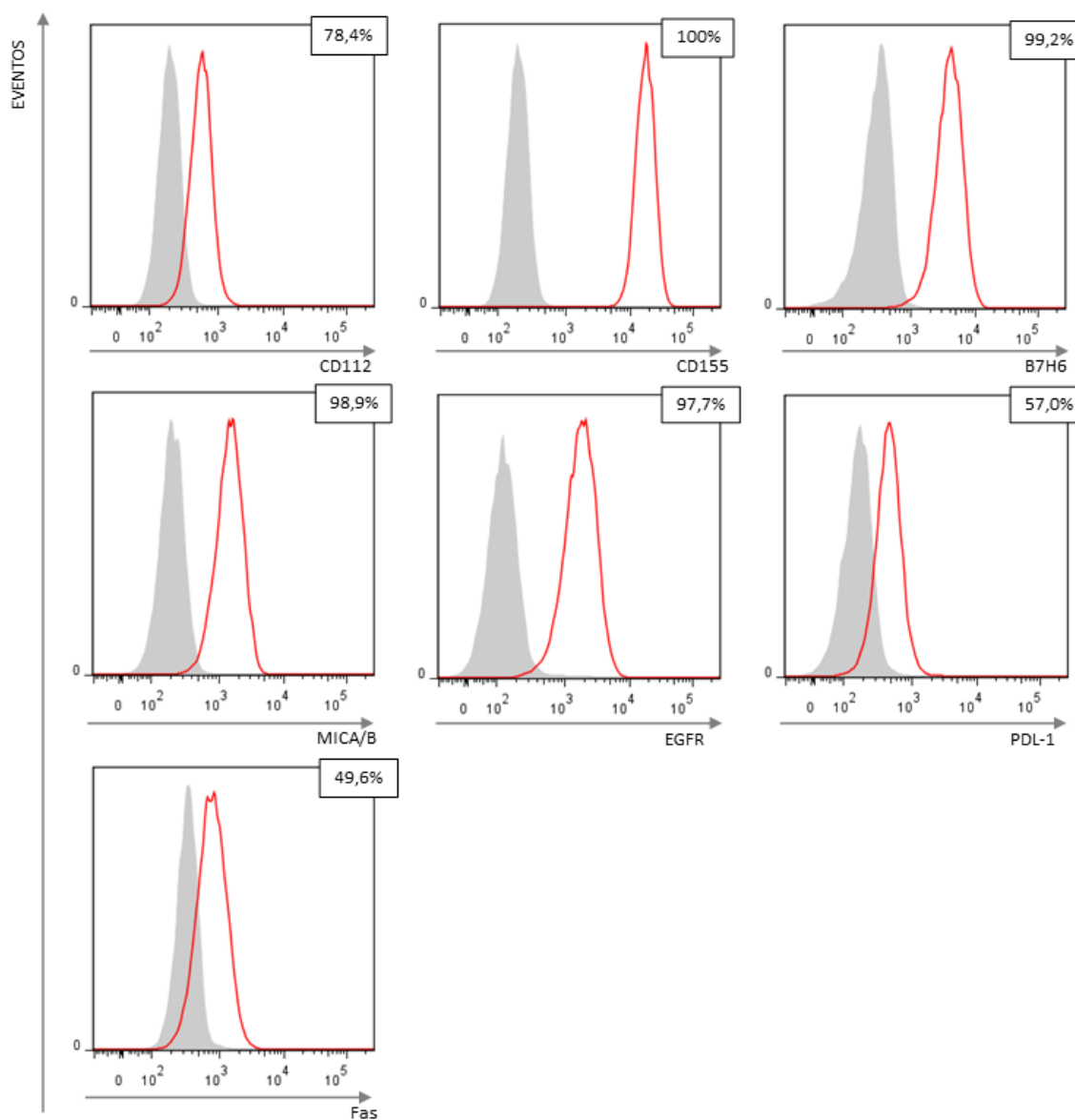




**Figura 87:** Histogramas ejemplificadores de expresión de ligandos de receptores de células NK en la línea celular HT-29. Las líneas rojas indican la expresión del receptor y las grises el control de isotipo.



**Figura 88:** Expresión negativa de moléculas de HLA-I en la línea celular DLD-1. Se muestran histogramas ejemplificadores.



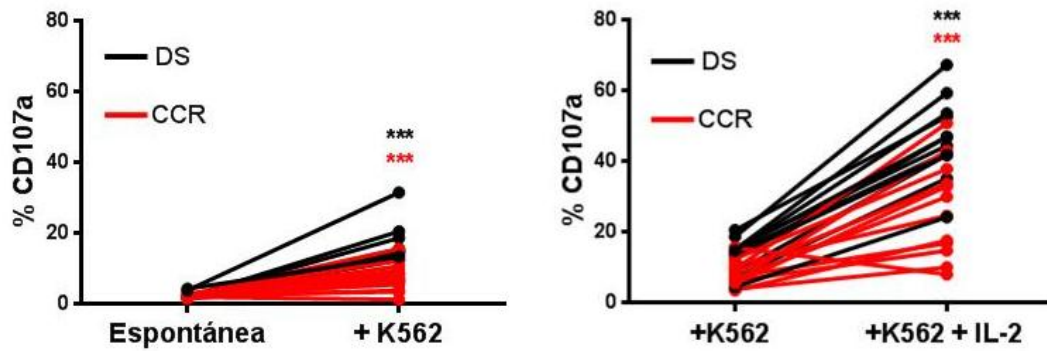
**Figura 89:** Histogramas ejemplificadores de expresión de ligandos de receptores de células NK en la línea celular DLD-1. Las líneas rojas indican la expresión del receptor y las grises el control de isotipo.

### 2.2.1 Evaluación de la degranulación (expresión de CD107a) y producción de IFN $\gamma$ en células NK

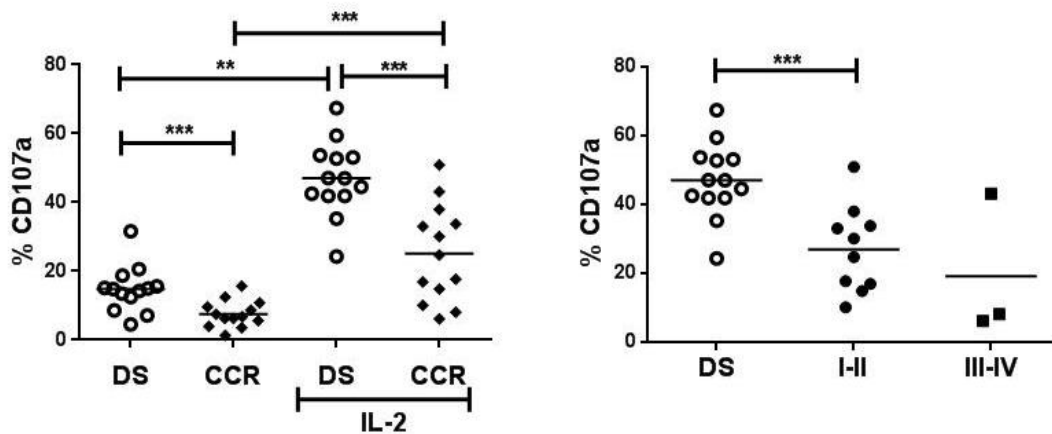
Se evaluó el potencial de degranulación de células NK -medido indirectamente mediante expresión de CD107a en membrana- de pacientes con CCR, teniendo como referencia el control de la cohorte de DS. Las células NK fueron desafiadas por la línea K562 durante 6 hs, en algunos casos previamente estimuladas con IL-2 y, evaluadas, posteriormente al co-cultivo, mediante citometría de flujo.

La interacción con células K562 produjo el aumento de expresión de la proteína CD107a en membrana de células NK de DS mientras que, las células NK de pacientes presentaron niveles de CD107a similares a la condición de degranulación espontánea -sin *target*- (Figura 90). La estimulación previa con IL-2 significó, tanto para células NK de DS como de pacientes, un aumento significativo en la expresión de CD107 ( $p < 0,001$  para DS y  $p < 0,01$  para pacientes). No obstante, los niveles en células NK de pacientes con CCR fueron menores a los alcanzados por DS, en condiciones basales y estimulatorias por IL-2.

Teniendo en cuenta que las alteraciones fenotípicas de células NK fueron observadas desde estadios tempranos de la enfermedad, clasificamos también su funcionalidad de acuerdo a estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV). Observamos que la menor capacidad de degranulación se presentó desde estadios I-II, correspondiéndose este resultado con lo esperado por el estudio fenotípico (Figura 91).



**Figura 90:** **Izquierda.** Efecto en la expresión de CD107a en membrana de células NK de DS y de pacientes con CCR por co-cultivo con la línea K562. **Derecha.** Efecto en la expresión de CD107a en membrana de células NK de DS y de pacientes con CCR por estimulación previa con IL-2. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test t* pareado. \*\*\* $p < 0,001$ . N=13 para cada cohorte.

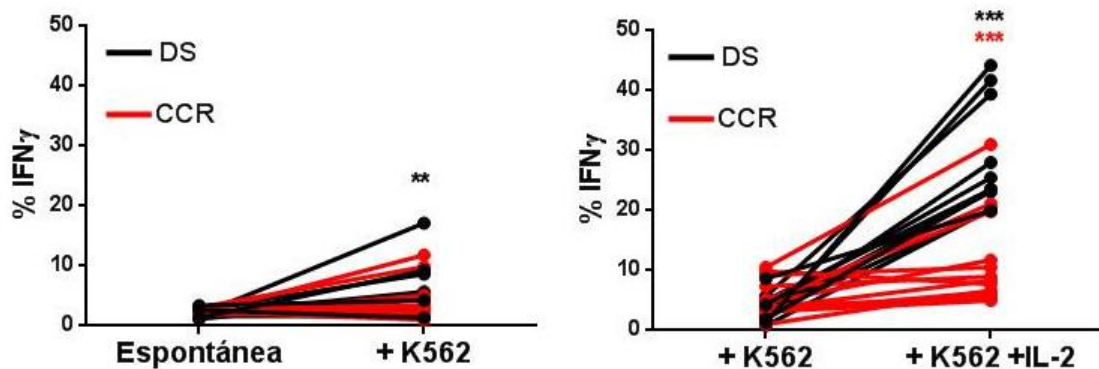


**Figura 91:** **Izquierda.** Expresión de CD107a en membrana de células NK de DS y pacientes con CCR luego de co-cultivo durante 6 hs con la línea K562, en condiciones basales o estimuladas previamente con IL-2. **Derecha.** Expresión de CD107a en DS y pacientes clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . N=13 para cada cohorte.

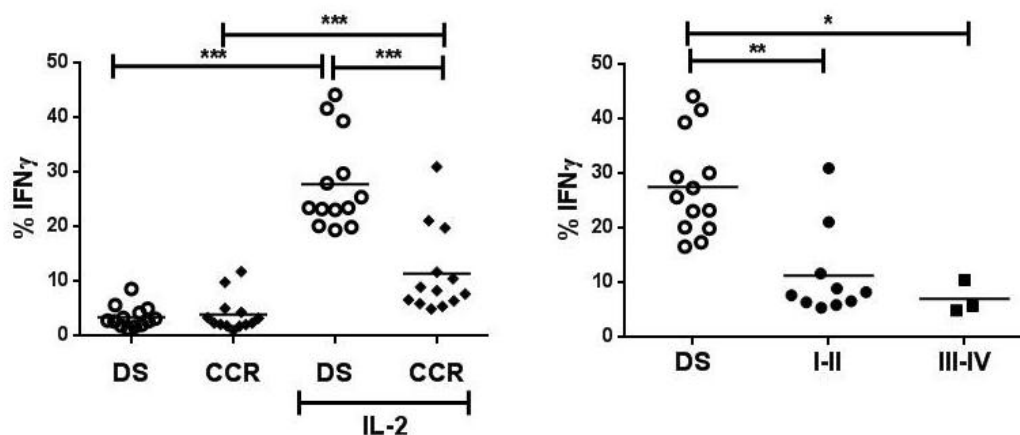
El rol anti-tumoral de células NK implica, además de su capacidad de producir gránulos citotóxicos que pueden promover la muerte de células tumorales, la liberación de citoquinas inflamatorias, principalmente IFN $\gamma$ <sup>82</sup>, que estimulan otras poblaciones del sistema inmune. Para determinar la capacidad de producción de IFN $\gamma$  por parte de las células NK, utilizamos el mismo abordaje que para la medición de CD107a, evaluando mediante citometría de flujo en células NK de DS y de pacientes con CCR luego de co-cultivos con la línea K562 durante 6 hs.

El desafío con K562 indujo la producción moderada de IFN $\gamma$  en células NK de DS mientras que las de pacientes no respondieron (Figura 92). La estimulación previa con IL-2 incrementó significativamente los valores de la citoquina tanto en células NK de DS como de pacientes ( $p < 0,001$  para ambas cohortes). No obstante, los niveles de IFN $\gamma$  de células NK de pacientes con CCR fueron menores a los alcanzados por DS en condiciones estimulatorias por IL-2.

Nuevamente, clasificamos los pacientes según estadios tempranos y tardíos y observamos que la baja capacidad de producción de IFN $\gamma$  ocurre desde etapas tempranas de la enfermedad (Figura 93).



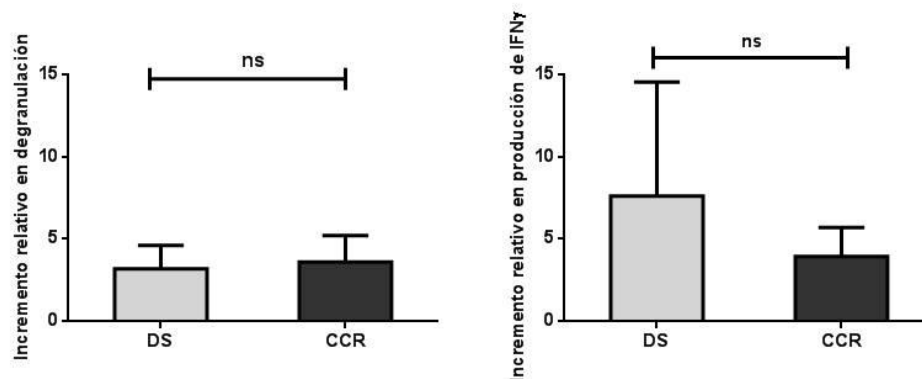
**Figura 92:** Izquierda. Efecto en la producción de IFN $\gamma$  por células NK de DS y de pacientes con CCR por co-cultivo con la línea K562. Derecha. Efecto en la producción de IFN $\gamma$  por células NK de DS y de pacientes con CCR por estimulación previa con IL-2. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test* t pareado. \*\*\* $p < 0,001$ . N=13 para cada cohorte.



**Figura 93: Izquierda.** Producción de IFN $\gamma$  por células NK de DS y de pacientes con CCR luego de co-cultivo durante 6 hs con la línea K562, en condiciones basales o estimuladas previamente con IL-2. **Derecha.** Producción de IFN $\gamma$  por células NK de DS y de pacientes clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$ .

Cabe aclarar que las mediciones de CD107a e IFN $\gamma$  no pudieron ser realizadas en marcación simultánea debido a la incompatibilidad de fluorocromos conjugados a los anticuerpos que reconocen dichas moléculas.

La citoquina estimuladora IL-2 incrementó tanto la capacidad de degranulación como la de producción de IFN $\gamma$  en DS y pacientes con CCR. Incluso luego del estímulo, las células NK fueron significativamente menos funcionales que las de DS. De tal modo, analizamos si el efecto fue equivalente para ambas cohortes comparando el incremento relativo de funcionalidad mediado por IL-2 entre DS y pacientes. No observamos diferencias significativas por lo que la magnitud del estímulo sería equivalente pero no el resultado final (Figura 94).



**Figura 94:** Incremento relativo en la capacidad de degranulación (Izquierda) y de producción de IFN (Derecha) mediado por IL-2 en las cohortes de DS y pacientes con CCR.

### 2.2.2 Evaluación de la capacidad lítica de células NK frente a células tumorales de CCR

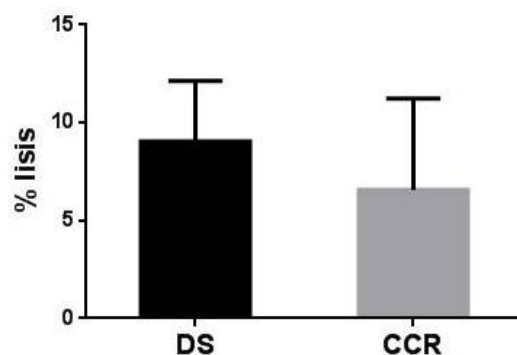
Una vez determinado el perfil fenotípico desregulado de células NK de pacientes con CCR y, a su vez, una capacidad disminuida de degranulación y producción de IFN $\gamma$  frente a un *target* canónico, nos propusimos evaluar la citotoxicidad sobre células de CCR.

En primer lugar, realizamos co-cultivos de 4 hs de duración entre CMSP – que incluyen las células NK- y la línea HT-29 fijando la relación NK : células *target* en 2,5:1. Las células tumorales fueron previamente marcadas con calceína, como se indica en Materiales y Métodos, para luego medir la fluorescencia liberada al medio por células que perdieron la integridad de membrana. De esta manera, se calculó el porcentaje de lisis de células blanco debido a citotoxicidad por células NK.

Se realizó el ensayo de lisis para 5 DS y 5 pacientes con CCR. Si bien observamos un mayor porcentaje de lisis correspondiente a los DS, éste no presentó diferencias significativas con respecto a pacientes (Figura 95). No obstante, los niveles generales de lisis fueron bajos debido a que la línea en cuestión, si bien presenta ligandos de receptores activadores, presenta a su vez alta

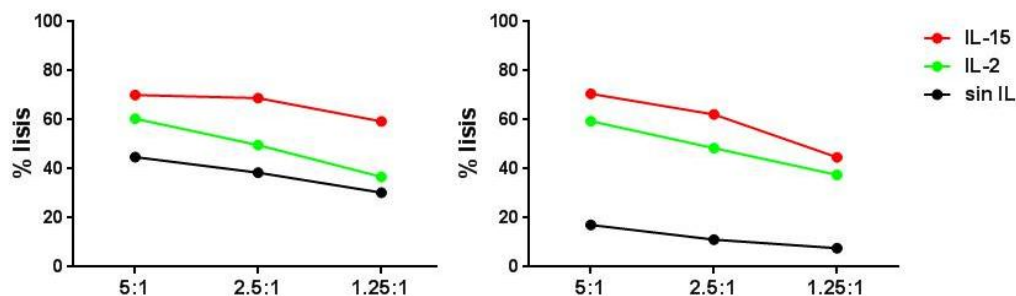


expresión de moléculas HLA -como vimos anteriormente- que inhiben la activación de células NK. Por este motivo, consideramos un *target* más adecuado para la evaluación de la capacidad lítica la línea celular DLD-1 que, además de presentar ligandos de receptores activadores, no presenta moléculas HLA-I -escenario de escape inmune frecuentemente observado en CCR<sup>119</sup>-.



**Figura 95:** Porcentaje de lisis de células HT-29 luego de 4 hs de co-cultivo con CMSP de DS y de pacientes con CCR.

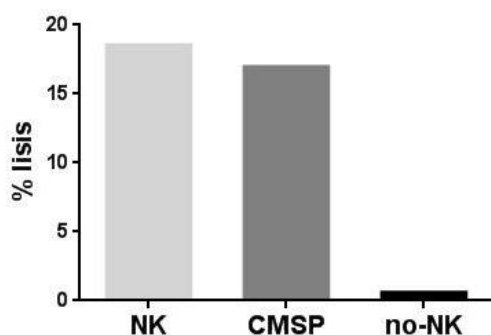
Realizamos ensayos de lisis de la línea DLD-1 por células NK en diferentes relaciones E:T (5:1, 2.5:1 y 1.25:1) y, en condiciones basales o estimuladas (células NK incubadas ON con 1000 U/ml IL-2 o 10 ng/ml IL-15) por incubación previa ON de las células NK en presencia de IL-2 o IL-15. En la Figura 96 se muestra un gráfico ejemplificador del porcentaje de lisis en las condiciones mencionadas para células NK de un DS y de un paciente. Observamos que la lisis fue incrementada en ambas cohortes por pre-activación con IL-2 e IL-15 y, que la misma fue dependiente de la cantidad de efector adicionado al co-cultivo. No obstante, consideramos la relación E:T 2,5:1 la de mayor poder resolutivo entre las distintas condiciones experimentales por lo que de ahora en más trabajamos en esa relación.



**Figura 96:** Gráficos ejemplificadores de porcentaje de lisis de la línea DLD-1 frente a células NK de DS (Izquierda) y de paciente con CCR (Derecha).

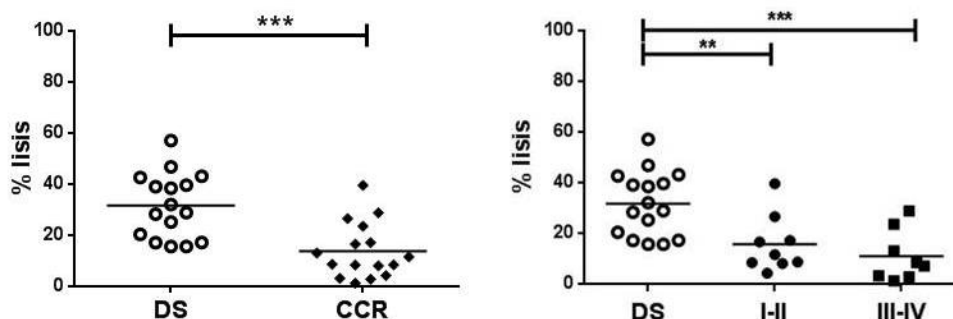
Con el fin de corroborar que la muerte de células tumorales fuera debida exclusivamente a la fracción NK realizamos la purificación de células NK de DS mediante columnas magnéticas obteniendo dos fracciones: la fracción NK y la fracción no NK -conteniendo el resto de las células leucocitarias de SP-.

De esta manera, realizamos un ensayo de lisis con ambas fracciones y la población de CMSP inicial (Figura 97). Determinamos que mientras que la fracción de células NK y la correspondiente a CMSP totales presentaron un porcentaje de lisis similar cercano al 18% -en la misma relación NK: células tumorales-, la fracción no-NK presentó una lisis despreciable.



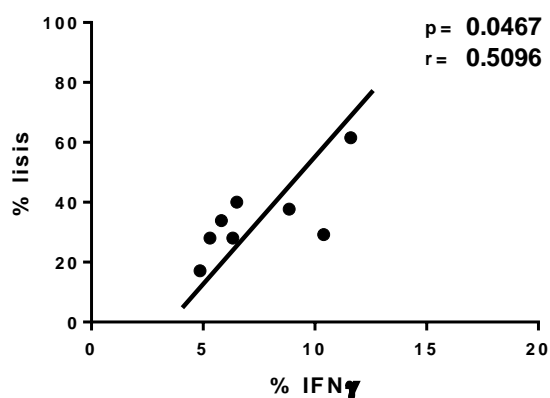
**Figura 97:** Porcentaje de lisis de células DLD-1 a partir de células NK purificadas de DS, CMSP o la fracción no-NK.

Los experimentos realizados utilizando como blanco la línea celular DLD-1, mostraron una capacidad lítica disminuida en células NK de pacientes -media 10,09%±21,91- con respecto a la correspondiente a DS -media 31,69%±12,68-. Clasificamos los pacientes según su estadificación y determinamos que, nuevamente, la desregulación ocurre desde etapas tempranas de la enfermedad (Figura 98).



**Figura 98: Izquierda.** Porcentaje de lisis de células DLD-1 mediada por células NK de DS y de pacientes con CCR. **Derecha.** . Porcentaje de lisis de células DLD-1 mediada por células NK de DS y de pacientes con CCR clasificados según estadios tempranos (I-II) y estadios tardíos (III-IV). La estadística fue llevada a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . N= 16 para cada cohorte.

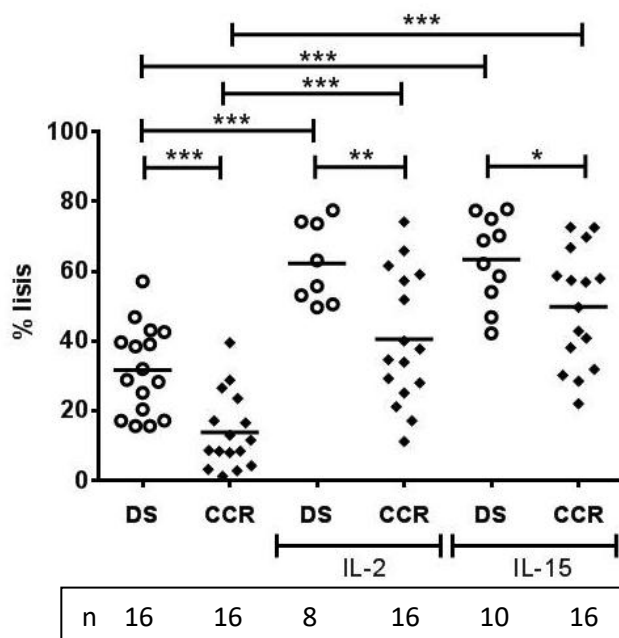
Dado q no pudimos medir en las mismas células NK las tres variables simultáneamente, luego de las evaluaciones funcionales, realizamos un estudio de asociación entre las tres variables. Observamos una correlación positiva entre la capacidad lítica en respuesta al desafío con DLD-1 y la producción de IFN $\gamma$  de células NK de pacientes ( $p < 0,05$ ), lo que implica que la funcionalidad se vería afectada a través de mecanismos similares o confluyentes (Figura 99).



**Figura 99:** Correlación positiva entre la capacidad lítica y la producción de IFN por parte de células NK de pacientes con CCR. La estadística fue llevada a cabo mediante el *test Pearson*.

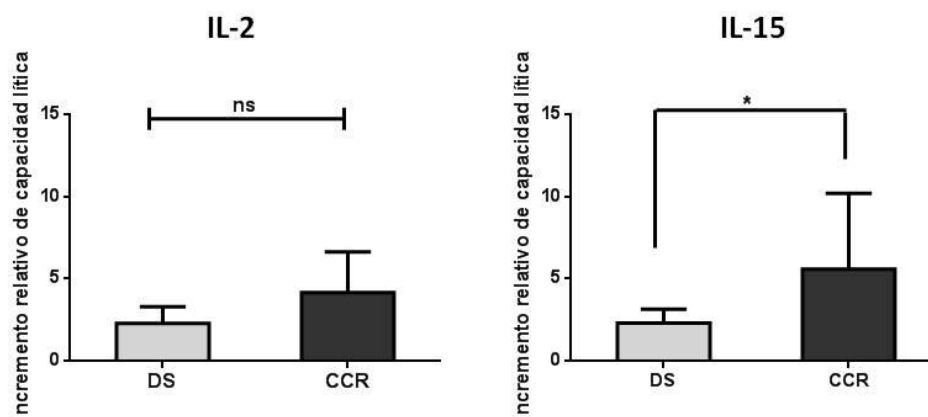
#### 2.2.2.1 Evaluación de la actividad lítica de células NK activadas con citoquinas

Evaluamos el efecto de IL-2 e IL-15 en la capacidad lítica de células NK de pacientes y observamos que si bien ambas citoquinas lograron incrementar el porcentaje de lisis de DLD-1, no logran alcanzar los niveles de células NK de DS (Figura 100).



**Figura 100:** Porcentaje de lisis de la línea celular DLD-1 por co-cultivo con células NK de DS y de pacientes con CCR, en condiciones basales o estimuladas previamente con IL-2 o IL-15. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test t* no pareado -entre DS y pacientes- y *test t* pareado -comparaciones dentro de la misma cohorte-. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

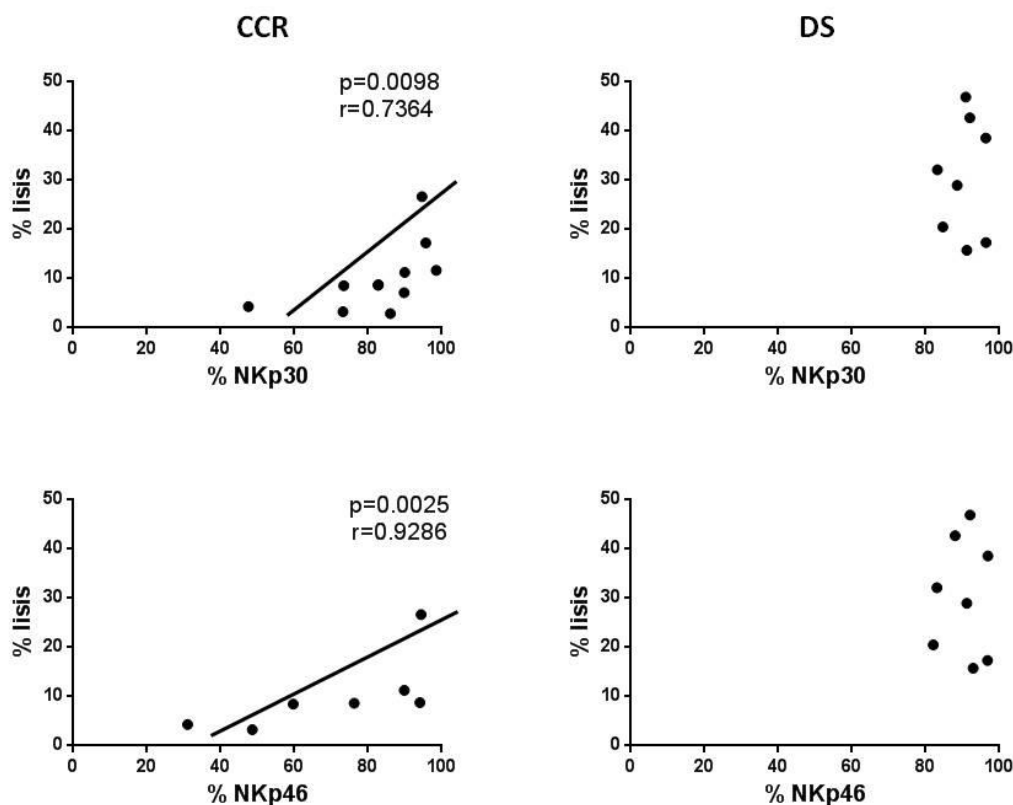
Nuevamente, analizamos el incremento relativo en la capacidad lítica debido al efecto de IL-2 e IL-15 en la cohorte de DS y de pacientes con CCR (Figura 101). Mientras que para la IL-2 el incremento en DS y pacientes no difirió, las células NK de pacientes presentaron un incremento funcional mayor que las correspondientes a DS frente a la IL-15, aún así todavía se evidencia menor capacidad lítica en las células NK de los pacientes.



**Figura 101:** Incremento relativo de la capacidad lítica de células NK de DS y de pacientes con CCR mediado por estimulación previa con IL-2 (Izquierda) o IL-15 (Derecha). El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \* $p < 0,05$ . N=16 pacientes con CCR; N=8 DS.

### 2.2.3 Asociación entre fenotipo y función de células NK

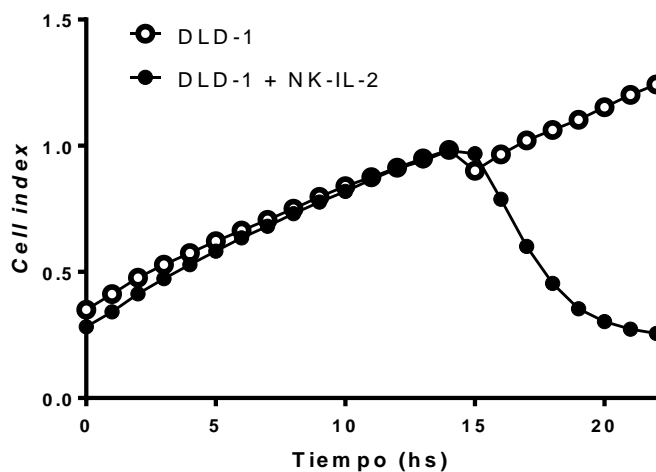
Teniendo en cuenta que las células NK de SP de pacientes con CCR presentaron un fenotipo alterado y una menor capacidad de degranulación, lítica y de producción de IFN $\gamma$ , evaluamos posibles asociaciones entre los niveles de funcionalidad y de expresión de receptores. De tal modo, hallamos correlaciones positivas entre la capacidad lítica y la expresión de los receptores activadores NKp30 y NKp46 de células NK de pacientes (Figura 102). Esto implica que a menor expresión de los receptores, menor sería la lisis de la célula *target*. Estas correlaciones no se encontraron en la cohorte de DS, debido a que la expresión de receptores fue homogénea y de altos valores.



**Figura 102:** Correlaciones entre la capacidad lítica frente a la línea DLD-1 y las expresión de los receptores activadores NKp30 y NKp46 de células NK de SP de pacientes con CCR (Izquierda) y de DS (Derecha). Las correlaciones fueron evaluadas mediante el *test Spearman*.

Esta implicancia de los niveles de expresión de receptores en la funcionalidad nos condujo a estudiar cuáles de ellos serían efectivamente relevantes en la actividad anti-tumoral mediante su bloqueo con el uso de AM. De esta manera, purificamos células NK de DS, las pre-estimulamos ON con IL-2 y realizamos ensayos de lisis de células DLD-1 mediante un método dinámico - *xCELLigence system*- que permite cuantificar la proporción de células adherentes - *targets*- unidas a la base de una placa MW96. La actividad lítica de las células NK - efectoras- provoca su apoptosis o despegue de la superficie, siendo detectado como un decaimiento abrupto de la señal de *cell index*. En la Figura 103 se muestra un

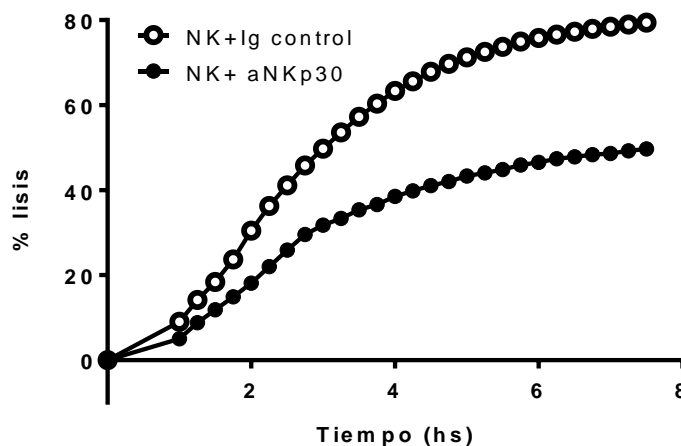
gráfico representativo de la medición dinámica del *cell index* de DLD-1 en el tiempo.



**Figura 103:** Gráfico representativo de *cell index* de DLD-1 en condiciones control (puntos blancos) y con adición de células NK al co-cultivo (puntos negros).

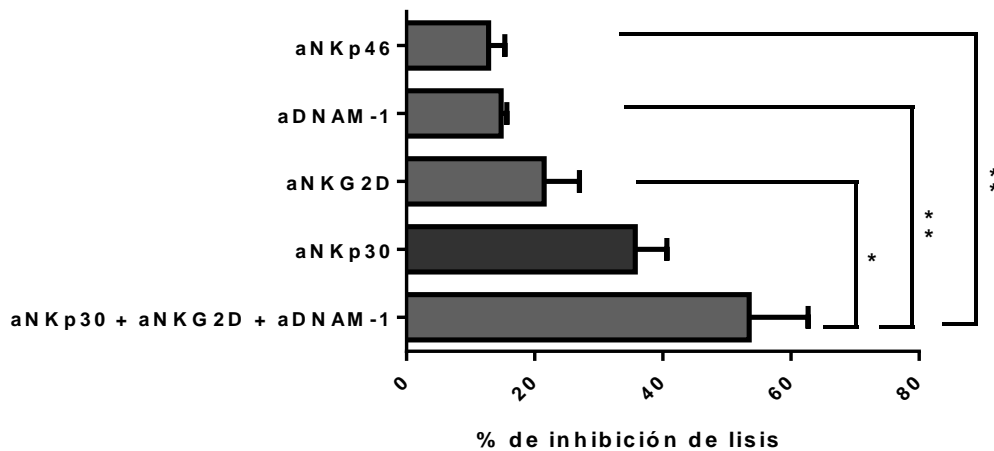
A partir de los valores de *cell index* durante el tiempo de ensayo, se calcularon las curvas de lisis correspondientes a cada condición. En algunos experimentos, se añadieron al co-cultivo AMs neutralizantes específicos de receptores de células NK -NKp30, NKp46, NKG2D y DNAM-1-. En la Figura 104 se muestra un gráfico ejemplificador de la lisis dinámica de células DLD-1 con la adición del AM anti-NKp30 que disminuyó el nivel de lisis de 80 a 40% respecto de la condición control. Cabe mencionar que el efecto inhibitorio de la lisis ocurrió desde los primeros minutos del ensayo.





**Figura 104:** Gráfico representativo de lisis de células DLD-1 por células NK de DS pre-activadas por IL-2 en condiciones control (con adición de AM irrelevante) y bloqueando el receptor NKp30. Relación E:T 1:1.

La adición individual de anti-NKp46, anti-DNAM-1 y anti-NKG2D determinó una disminución en la lisis de células blanco no obstante, el AM anti-NKp30 fue el responsable del mayor porcentaje de inhibición de lisis ( $35,7\% \pm 4,9$ ) (Figura 105). A su vez, la adición conjunta de anti-DNAM-1, anti-NKG2D y anti-NKp30 permitió un efecto aditivo de inhibición de lisis. Esto implica que la lisis de células DLD-1 por células NK estaría mediada principalmente por el receptor activador NKp30, que reconoce su ligando B7H6 en la superficie de las células *target*, con la contribución de NKp46, NKG2D y DNAM-1.

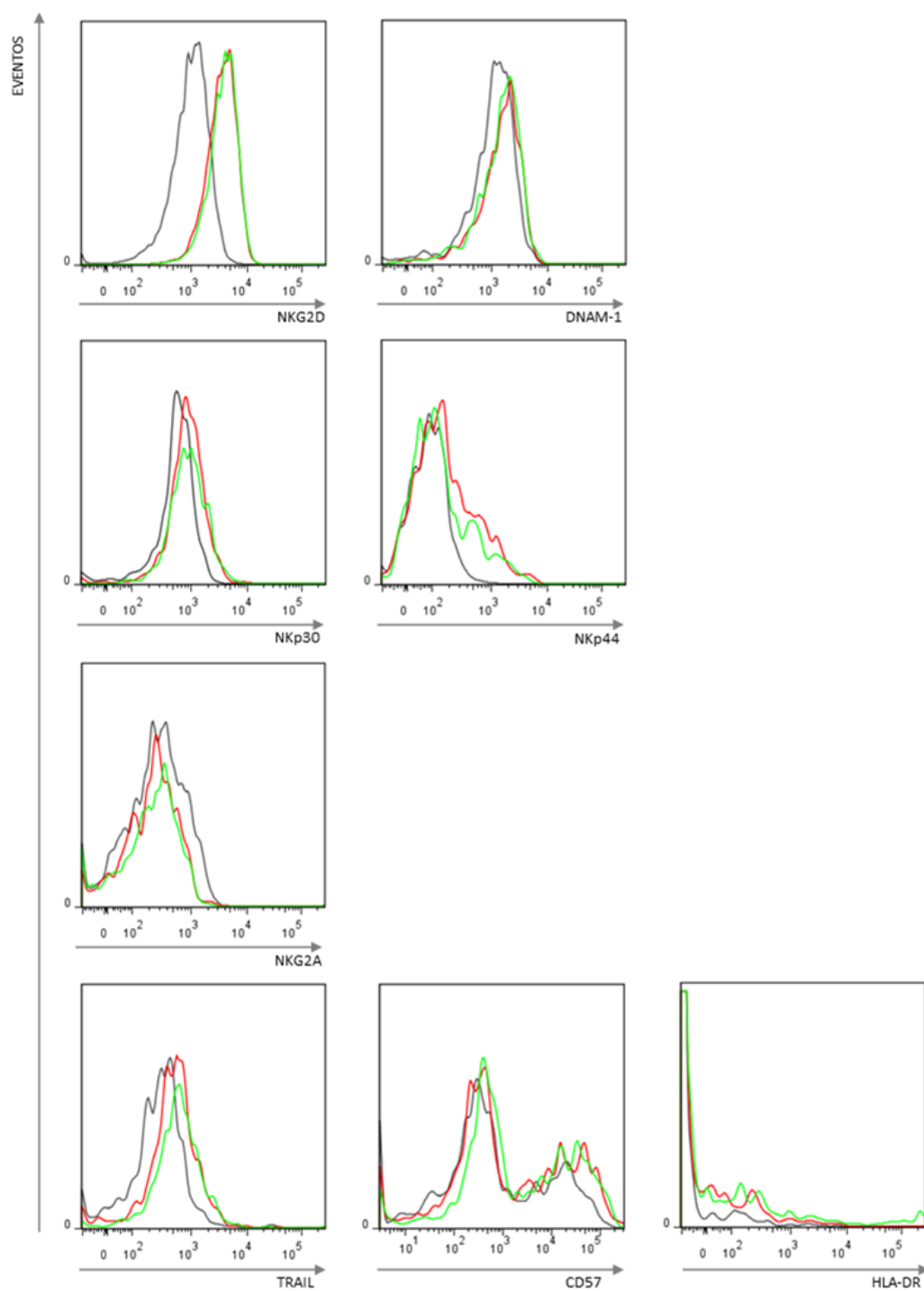


**Figura 105:** Porcentaje de inhibición de lisis de células DLD-1 utilizando diferentes AM bloqueantes de receptores activadores de células NK. Los ensayos (n=3) fueron llevados a cabo mediante *xCELLigence system* durante 300 minutos. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas por *test ANOVA*. \*p<0,05 \*\*p<0,01.

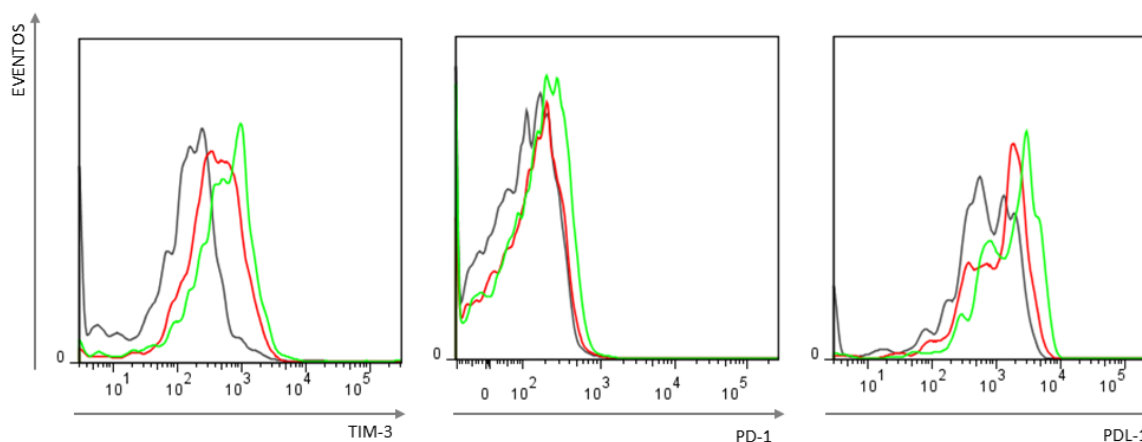
Dado que la desregulación funcional de células NK de pacientes fue parcialmente revertida por citoquinas inflamatorias, evaluamos si este efecto se asociaba a la modulación de expresión de receptores de células NK por la IL-2 e IL-15. Se encuentra descrito que algunas citoquinas ejercen modulación sobre dichos receptores<sup>120</sup>, por lo que evaluamos, mediante citometría de flujo, el efecto de la IL-2 y la IL-15 en tratamientos *overnight* (Figura 106).

En primer lugar, observamos que ambas citoquinas incrementaron la expresión de los receptores activadores NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp44. Asimismo, el tratamiento favoreció una disminución moderada del receptor inhibitorio NKG2A. Estas variaciones en los niveles de receptores específicos de células NK –excepto los casos de NKG2D y DNAM-1 que a su vez son compartidos por linfocitos T- fueron acompañadas por aumento en los niveles de expresión de las moléculas de activación TRAIL, CD57 y HLA-DR, que implicarían una intensificación de la capacidad citotóxica de las células NK<sup>87121</sup>. Como contraparte, el tratamiento con IL-2 e IL-15 generó un incremento de TIM-3, PD-1 y PDL-1

(Figura 107), consideras las tres moléculas *immune checkpoints* cuya expresión aumenta luego de la activación como mecanismo de freno inmune<sup>69</sup>.



**Figura 106:** Histogramas ejemplificadores de 3 mediciones por citometría de flujo de receptores de células NK de pacientes con CCR. Las líneas grises representan el control, las rojas el tratamiento con IL-2 y las verdes el tratamiento con IL-15.



**Figura 107:** Histogramas ejemplificadores de 3 mediciones por citometría de flujo de *immune checkpoints* en células NK de pacientes con CCR. Las líneas grises representan el control, las rojas el tratamiento con IL-2 y las verdes el tratamiento con IL-15.

#### 2.2.4 Impacto de las células NK en el pronóstico de pacientes con CCR

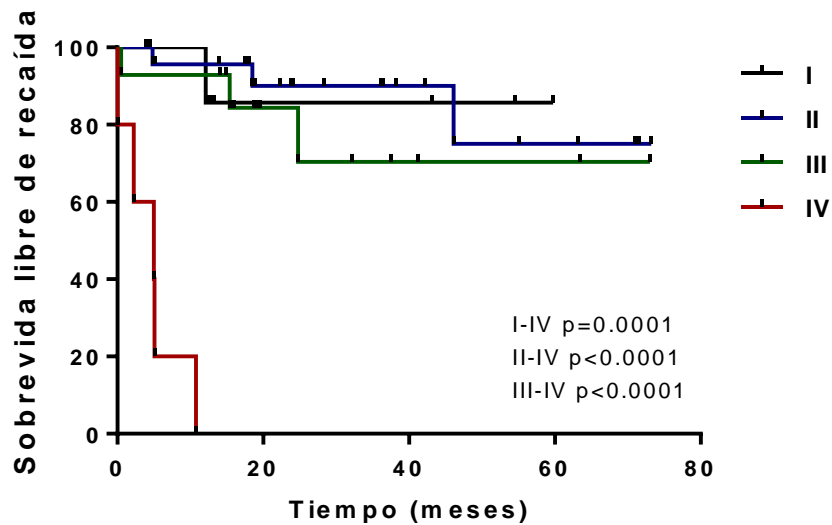
Teniendo en cuenta que la desregulación de la expresión de receptores de células NK se asoció al detrimento funcional de las mismas, analizamos si dicho fenotipo se asociaba, a su vez, con la evolución clínica de los pacientes con CCR. Estudiamos una cohorte de 52 pacientes vírgenes de tratamiento, con un seguimiento medio de 24,7 meses y uno máximo de 71 meses, tiempo en el que 11 pacientes (21%) recayeron. Los pacientes fueron clasificados según estadio al momento del diagnóstico -momento en el que realizamos las determinaciones fenotípicas y funcionales-. Los pacientes diagnosticados en estadio IV (metastásicos) presentaron una menor sobrevida libre de recaída (SLR) de manera significativa, con respecto a los pacientes de estadios menos avanzados, mientras que las curvas de SLR de pacientes de estadios I, II y III no mostraron diferencias entre sí (Figura 108). Por esta razón, para el análisis subsiguiente, excluimos los pacientes pertenecientes a estadio IV.

Considerando que diversos receptores de células NK de pacientes con CCR se encontraron desregulados desde estadios tempranos, evaluamos el impacto de

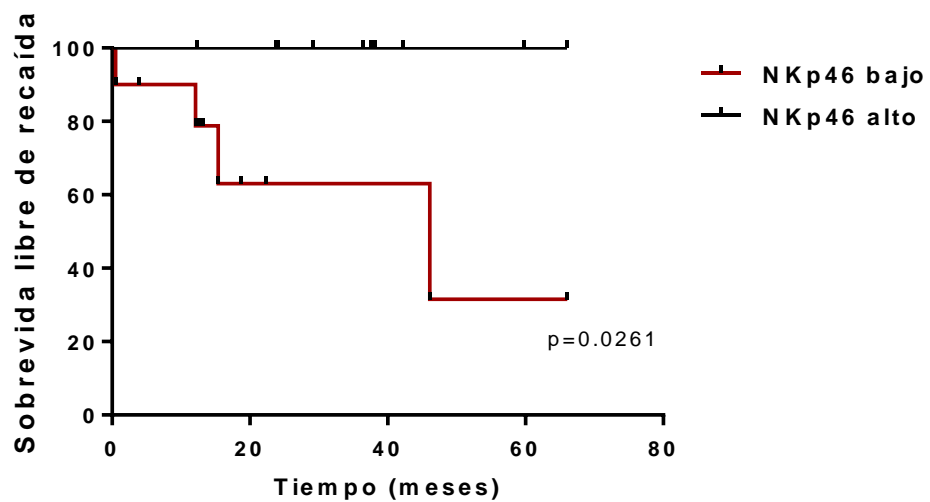
los niveles de expresión de dichos receptores –en estadios I, II y III- en la SLR de los pacientes. Para ello, los dividimos en dos grupos: expresión alta y expresión baja de cada receptor individualmente, utilizando el valor de la mediana del porcentaje de cada uno como cota.

De todos los receptores evaluados, la expresión del receptor activador NKp46, mayor a la mediana 86,9%, se asoció con mayor SLR, evaluado mediante disociación significativa de las curvas *Kaplan-Meier* ( $p=0,0261$ ) (Figura 109).

Los pacientes correspondientes a estadio IV progresaron en su totalidad independientemente del *status* de NKp46.



**Figura 108:** Curvas de *Kaplan-Meier* de sobrevida libre de recaída de pacientes con CCR según estadio de enfermedad.



**Figura 109:** Curvas de *Kaplan-Meier* de sobrevida libre de recaída de pacientes con CCR clasificados según alta o baja expresión de NKp46 en células NK de SP. N=10 en cada rama.

### CAPÍTULO III: CÉLULAS NK EN LA TERAPIA DEL CÁNCER COLORECTAL

#### **3.1. Impacto de drogas quimioterapéuticas en el reconocimiento por células NK**

Teniendo en cuenta que en la actualidad la principal decisión terapéutica para pacientes con CCR es la QT, nos propusimos evaluar su impacto tanto en células tumorales como en células NK circulantes de SP. Las drogas administradas mayoritariamente son 5-fu y oxa, como tratamiento neoadyuvante -previamente a la cirugía-, adyuvante -luego de la cirugía- y, como tratamiento de recaídas o de pacientes metastásicos.

En primer lugar, evaluamos la susceptibilidad *in vitro* de las líneas celulares HT-29 y DLD-1 frente a dichas drogas mediante ensayos de MTT, que permitieron el cálculo de las concentraciones IC50 -50% de la concentración de inhibición máxima- e IC25 -25% de la concentración de inhibición máxima- a partir de curvas de viabilidad celular en función del logaritmo de la concentración de la droga (Figura 110). Cabe mencionar que para cada droga y cada línea celular las concentraciones de inhibición resultaron distintas:

|              | 5-FU         |              | Oxa          |              |
|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|              | IC25 (µg/ml) | IC50 (µg/ml) | IC25 (µg/ml) | IC50 (µg/ml) |
| <b>DLD-1</b> | 0,11         | 0,33         | 0,17         | 0,52         |
| <b>HT-29</b> | 0,02         | 0,05         | 0,17         | 0,49         |



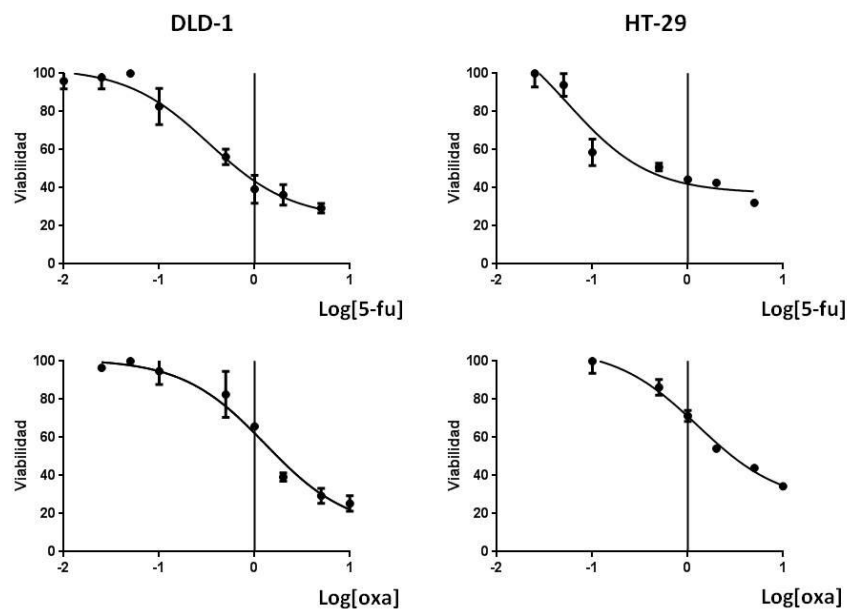
De acuerdo a estos valores, observamos que ambas líneas resultaron más sensibles a la droga 5-fu, las células HT-29 en mayor medida. La sensibilidad a oxa fue similar en ambos casos.

Asimismo, calculamos las concentraciones de droga *in vitro* que se corresponden con las dosis utilizadas en la clínica, mediante ecuaciones de dinámica farmacocinética que permiten relacionarlas. Denominamos “concentración RAUC” a aquella en la que ambas *-in vitro* y plasmática- se corresponden (Ver Materiales y Métodos). Cabe mencionar que las concentraciones RAUC resultan distintas para cada droga:

-5-fu RAUC= 0,2 µg/ml

-oxa RAUC= 1,5 µg/ml

Estas concentraciones resultaron en general mayores a las concentraciones IC50 e IC25 correspondientes a ambas líneas -excepto para el caso de DLD-1 frente a 5-fu-.

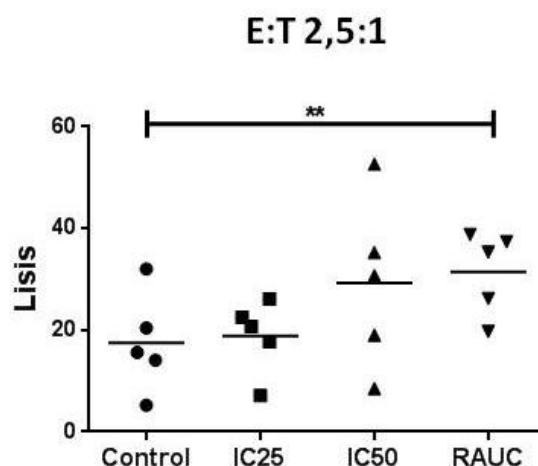


**Figura 110:** Curvas de MTT ejemplificadoras de viabilidad celular de las líneas DLD-1 y HT-29 en función de la concentración de las drogas 5-fu y oxa. N=3

Evaluamos posteriormente la susceptibilidad de las líneas de CCR a la lisis por células NK de SP de DS, luego de su exposición a oxa y 5-fu. El objeto de estos experimentos fue determinar si las drogas quimioterapéuticas, adicionalmente a su efecto sobre la viabilidad celular, tienen un impacto en el reconocimiento por parte de las células NK.

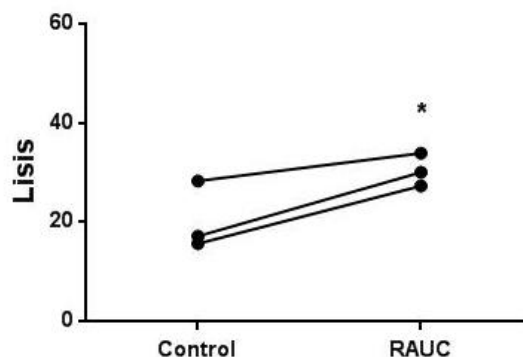
En primer lugar, realizamos ensayos de lisis mediante marcación con calceína de las células DLD-1, en relación E:T 1,25:1 y 2,5:1, en 5 DS, en condiciones control y luego de exposición en cultivo durante 48hs a oxa (concentraciones IC25, IC50 y RAUC). Observamos un aumento gradual de la lisis de células tumorales con el aumento creciente de la concentración de la droga, hallando un incremento estadísticamente significativo para la condición RAUC, en ambas relaciones E:T (Figura 111 - se muestra sólo la relación 2,5:1). De esta manera, las células DLD-1

expuestas previamente a oxa en concentración RAUC presentaron el doble del valor medio de la lisis por células NK. Teniendo en cuenta que en ambas relaciones E:T observamos el mismo efecto, a partir de ahora realizamos ensayos de medición de lisis sólo en concentraciones RAUC y en relación E:T 2,5:1, la que nos permitió una mejor visibilidad de los resultados.



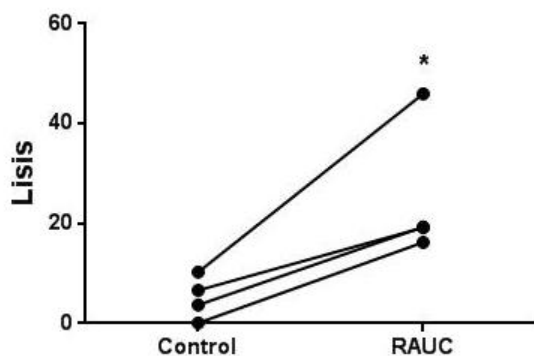
**Figura 111:** Lisis por células NK de células de CCR DLD-1 en condiciones control y luego de exposición a la droga oxaliplatino en las concentraciones IC25, IC50 y RAUC. Los ensayos fueron realizados en la relación E:T 2,5:1. El análisis estadístico fue realizado mediante el *test t* pareado. \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .

De la misma manera que para la evaluación del efecto de oxa sobre el reconocimiento y lisis de células tumorales por células NK, realizamos ensayos de lisis de la línea DLD-1 previamente expuesta en cultivo durante 48 hs a la concentración correspondiente a RAUC de 5-fu (Figura 112). Observamos que el tratamiento incrementó significativamente la lisis de células tumorales respecto del control ( $n=3$ ). De esta manera, la droga 5-fu también volvió a las células DLD-1 más susceptibles a ser lisadas por células NK.



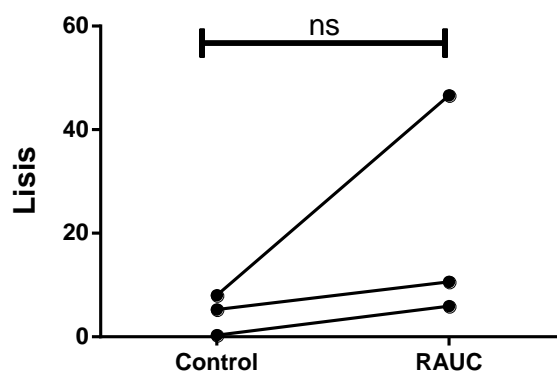
**Figura 112:** Lisis por células NK de células de CCR DLD-1 en condiciones control y luego de exposición a la droga 5-fu en la concentración RAUC durante 48 hs. Relación E:T 2,5:1. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante *test t* pareado.

Asimismo, evaluamos el efecto de las drogas quimioterapéuticas oxa y 5-fu sobre la lisis de células HT-29, *target* HLA-I<sup>+</sup> donde esperamos que los niveles de lisis fueran menores, tal como se mencionó anteriormente (Figura 113). Observamos que la exposición previa a oxa en la concentración RAUC incrementó significativamente la lisis de HT-29 en un 20%.



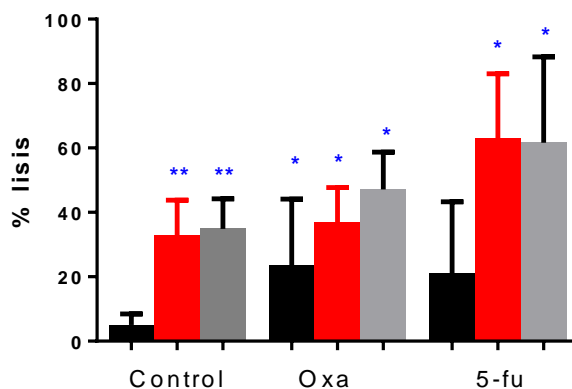
**Figura 113:** Lisis por células NK de células de CCR HT-29 en condiciones control y luego de exposición a la droga oxa en la concentración RAUC durante 48 hs. Relación E:T 2,5:1. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante *test t* pareado.

Por último, evaluamos el efecto de 5-fu sobre la lisis de HT-29 por células NK a una relación E:T 2,5:1 en la concentración RAUC y, si bien observamos una tendencia al aumento de la lisis con la exposición a la droga –principalmente en un DS-, no hubo diferencias significativas entre los niveles de lisis para ambas condiciones (Figura 114).

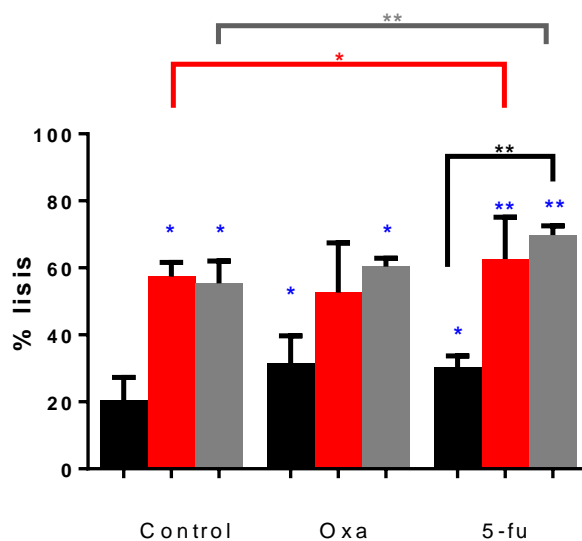


**Figura 114:** Lisis por células NK de células de CCR HT-29 en condiciones control y luego de exposición a la droga 5-fu en la concentración RAUC durante 48 hs. Relación E:T 2,5:1.

La adición de las citoquinas estimuladoras IL-2 e IL-15 incrementó los porcentajes de lisis por células NK, tanto para la línea HT-29 (Figura 115) como para la DLD-1 (Figura 116), lo cual muestra un efecto aditivo de la combinación.

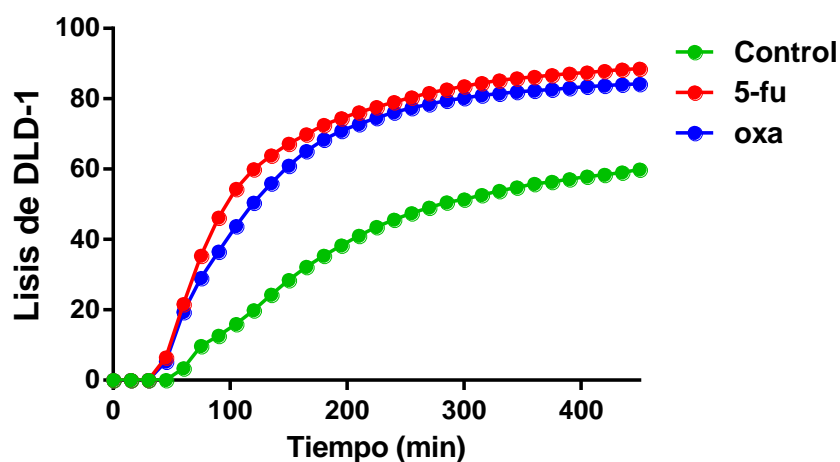


**Figura 115:** Lisis de células HT-29 por células NK de SP de DS en presencia de IL-2 (barras rojas) e IL-15 (barras grises). Las células tumorales fueron cultivadas previamente en presencia de oxa y 5-fu en concentración RAUC durante 48 hs. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test t* pareado. Se muestra en azul la significación respecto del control sin ILs. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$



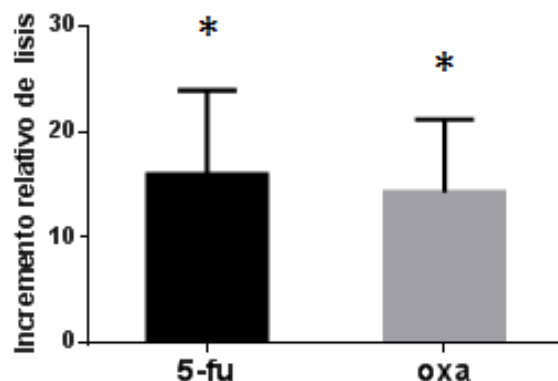
**Figura 116:** Lisis de células DLD-1 por células NK de SP de DS en presencia de IL-2 (barras rojas) e IL-15 (barras grises). Las células tumorales fueron cultivadas previamente en presencia de oxa y 5-fu en concentración RAUC durante 48 hs. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test t* pareado. Se muestra en azul la significación respecto del control sin ILs. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$

Asimismo, realizamos ensayos de lisis en presencia de las drogas quimioterapéuticas mediante *xCELLigence system*, lo que nos permitió la medición de niveles de lisis de manera dinámica a lo largo del tiempo y mediante una tecnología alternativa. En la Figura 117 se muestra un gráfico ejemplificador de la lisis de DLD-1 –control, expuesta a oxa y expuesta a 5-fu- por células NK de SP de DS pre-activadas ON por IL-2, donde se muestra que las drogas incrementaron la lisis significativamente. Las diferencias con la curva control fueron apreciables desde los primeros minutos del ensayo.



**Figura 117:** Gráfico ejemplificador de lisis de DLD-1 por células NK de DS pre-activadas ON por IL-2, medido por *xCELLigence system* a lo largo del tiempo. En verde se muestra la lisis de células DLD-1 control, en rojo la lisis de células DLD-1 pre-expuestas a 5-fu (dosis RAUC) y, en azul la lisis de las células DLD-1 pre-expuestas a oxa (dosis RAUC).

Consideramos 7 experimentos independientes de lisis de DLD-1 por *xCELLigence system* y tomando como referencia los valores correspondientes al minuto 345 del ensayo, medimos el incremento diferencial de lisis debido a exposición a las drogas oxa y 5-fu (Figura 118). Observamos en ambos casos un aumento cercano al 15% respecto del control –células DLD-1 no tratadas-.



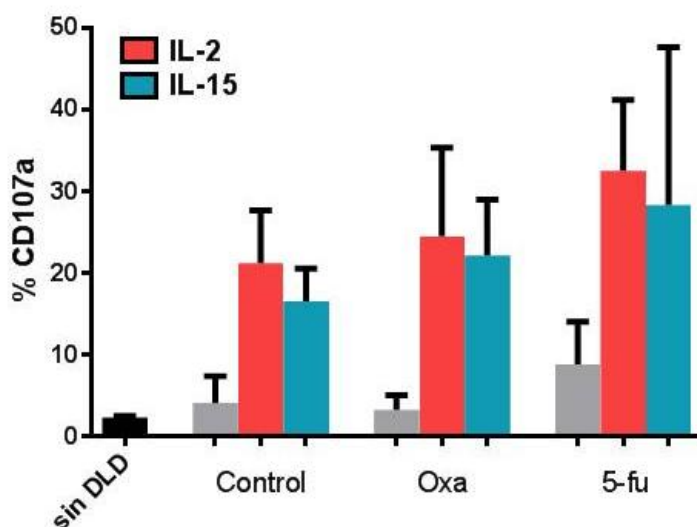
**Figura 118:** Incremento relativo del porcentaje de lisis de DLD-1 por células NK de SP de DS pre-activadas ON con IL-2, debido a exposición de las células tumorales a las drogas 5-fu y oxa en las correspondientes concentraciones RAUC.

Teniendo en cuenta que la exposición de células tumorales a drogas quimioterapéuticas incrementó su susceptibilidad a la lisis por células NK, nos interesó determinar si el aumento de citotoxicidad se debía a un aumento en la degranulación de las mismas es decir, a una mayor liberación de granzimas y perforinas frente al *target*. De esta manera, realizamos ensayos de medición de CD107a en membrana de células NK de SP de DS, frente a células DLD-1 control o previamente expuestas a 5-fu y oxa.

En primer lugar, observamos que la línea DLD-1 generó bajos niveles de degranulación –en comparación con las células K562– aunque estimulables por IL-2 e IL-15. La exposición previa a oxa o 5-fu de las células DLD-1 no impactó significativamente en los niveles de CD107a en células NK si bien se observó una tendencia a una mayor expresión de CD107a frente a las células expuestas a 5-fu (Figura 119). Asimismo, se midió producción de IFN $\gamma$  por células NK en las



mismas condiciones experimentales y no se observaron cambios debido a la exposición previa a drogas quimioterapéuticas de las células DLD-1.



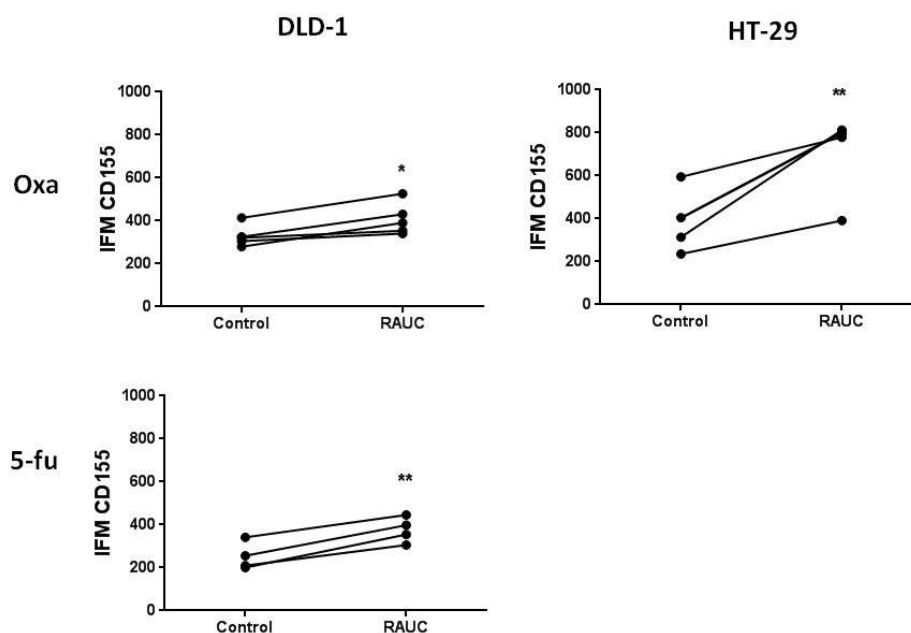
**Figura 119:** Porcentaje de CD107a en células NK de SP de DS desafiadas por células DLD-1 control, pre-expuestas a oxa y pre-expuestas a 5-fu (ambas drogas en concentración RAUC). Las células NK fueron pre-activadas ON por IL-2 e IL-15. N=3

Con el fin de determinar si el efecto de aumento de susceptibilidad frente a células NK se debe a variaciones en la expresión de ligandos en membrana, se realizaron mediciones mediante citometría de flujo del fenotipo de células tumorales expuestas a drogas quimioterapéuticas.

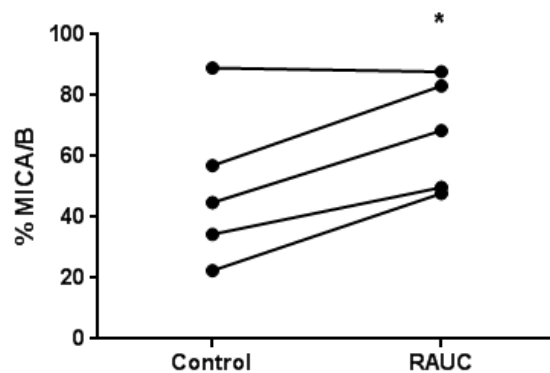
La línea DLD-1 incrementó la IFM de CD155 luego de la exposición a ambas drogas y, HT-29 luego de ser expuesta en cultivo a oxa (Figura 120). A su vez, en el caso de las células DLD-1 expuestas a oxa se vio un aumento del porcentaje de expresión de los ligandos MICA/B, reconocidos por el receptor activador NKG2D (Figura 121). Estas observaciones podrían explicar parcialmente el aumento de la susceptibilidad a la lisis por células NK. No obstante, para su confirmación

deberían realizarse experimentos de bloqueo específico de los ligandos y evaluar la el efecto sobre el porcentaje de lisis por células NK luego de la exposición a las drogas.

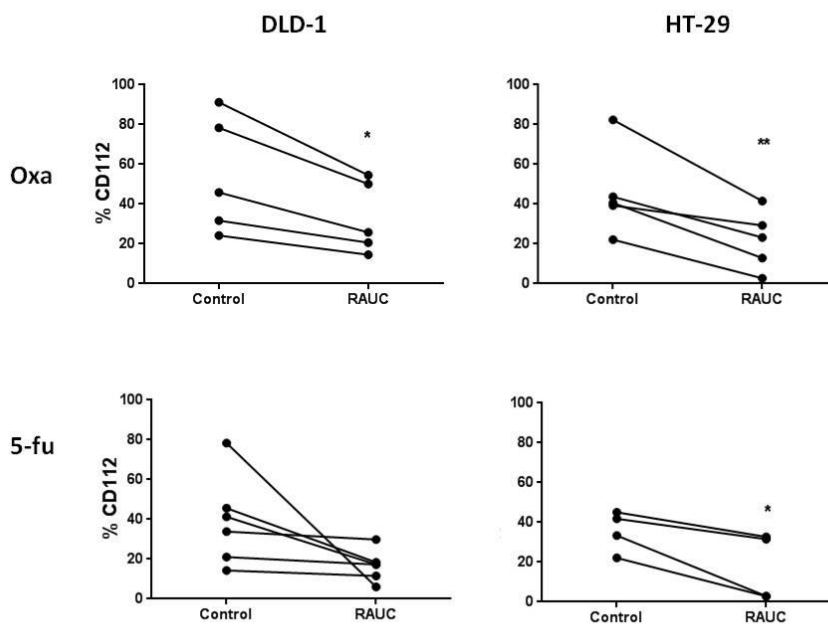
Curiosamente, la exposición de ambas líneas tumorales tanto a 5-fu como a oxa -en concentraciones RAUC-, disminuyó el porcentaje de expresión de CD112, ligando del receptor activador DNAM-1, lo que en principio volvería a las células blanco menos susceptibles a la lisis, aunque de nuestros experimentos queda evidenciado que el aumento de la lisis depende de la integración de señales activadoras/inhedoras (Figura 122). Cabe recordar que la línea DLD-1 no presenta moléculas de HLA-I en membrana, ligandos de diversos receptores inhibitorios. En las células HT-29, la expresión de dichos ligandos no varió con los tratamientos.



**Figura 120:** Intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD155, ligando del receptor DNAM-1, en células DLD-1 y HT-29 luego de exposición durante 48 hs a oxa y 5-fu en concentraciones RAUC. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante *test t* pareado. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ .

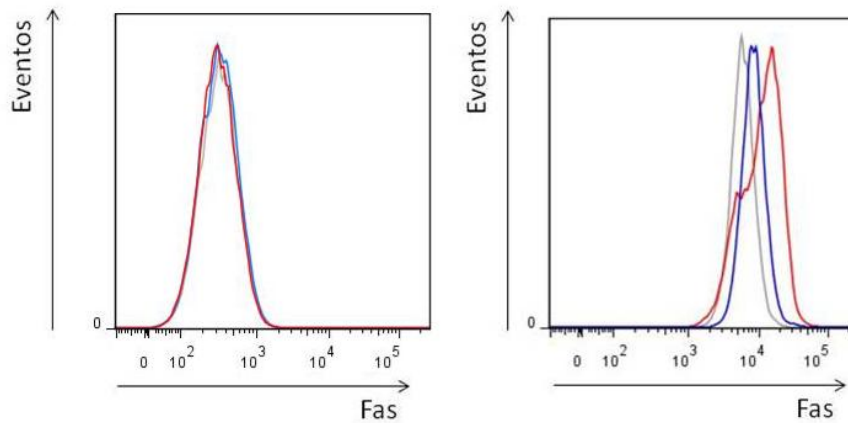


**Figura 121:** Porcentaje de expresión de MICA/B, ligando del receptor NKG2D de células NK, en células DLD-1 luego de exposición a oxa durante 48 hs en concentración RAUC. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante *test t* pareado. \*  $p < 0,05$ .



**Figura 122:** Porcentaje de expresión de CD112, ligando del receptor DNAM-1, en células DLD-1 y HT-29 luego de tratamientos de 48 hs con oxa o 5-fu en concentraciones RAUC. Los análisis estadísticos fueron llevados a cabo mediante *test t* pareado. \*  $p < 0,05$  \*\*  $p < 0,01$ .

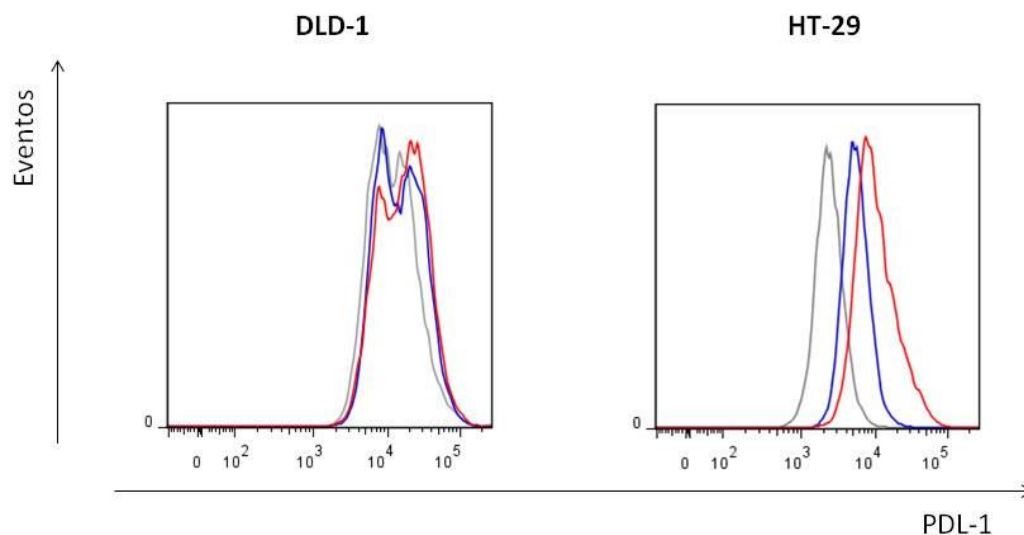
Teniendo en cuenta que las células tumorales expresan, a su vez, ligandos de receptores de muerte de células NK, medimos la modulación de la expresión de Fas en superficie luego de tratamientos en cultivo con oxa y 5-fu. Para la línea DLD-1 no observamos variación de expresión mientras que en las células HT-29, observamos un aumento significativo de la IFM luego de la exposición a ambas drogas (50% para oxa y 100% para 5-fu). En la Figura 123 se muestran histogramas representativos.



**Figura 123:** Histogramas ejemplificadores de expresión de Fas en células DLD-1 (Izquierda) y HT-29 (Derecha). Las líneas grises representan el control, las rojas el tratamiento con 5-fu y las azules con oxa. Los tratamientos se llevaron a cabo durante 48 hs en concentraciones RAUC.

Como contraparte a la modulación de ligandos de receptores activadores, también observamos un aumento de la expresión de PDL-1 luego de la exposición a oxa y 5-fu -concentraciones RAUC- tanto en la línea celular DLD-1 -en menor medida- como HT-29. No obstante, el incremento de expresión de ligandos de receptores activadores sería más relevante -en la lisis por células NK- ya que el

porcentaje de lisis aumentó luego de los tratamientos. La modulación de PDL-1 podría tener mayor peso en la interacción con linfocitos T (Figura 124).

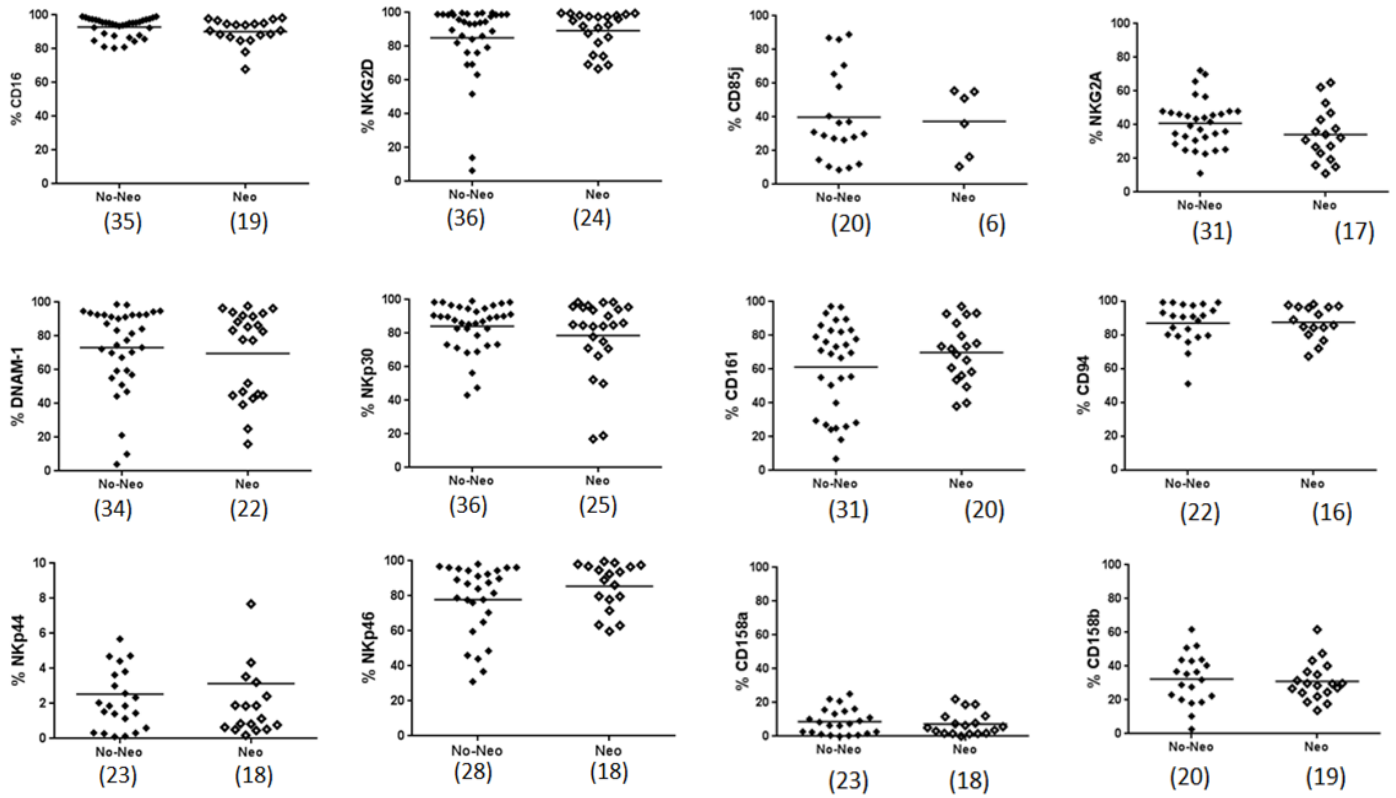


**Figura 124:** Histogramas ejemplificadores de la expresión de PDL-1 en células DLD-1 (Izquierda) y HT-29 (Derecha) luego de exposición a oxa y 5-fu durante 48 hs. La línea gris representa el control, la roja el tratamiento con 5-fu y la azul el tratamiento con oxa.

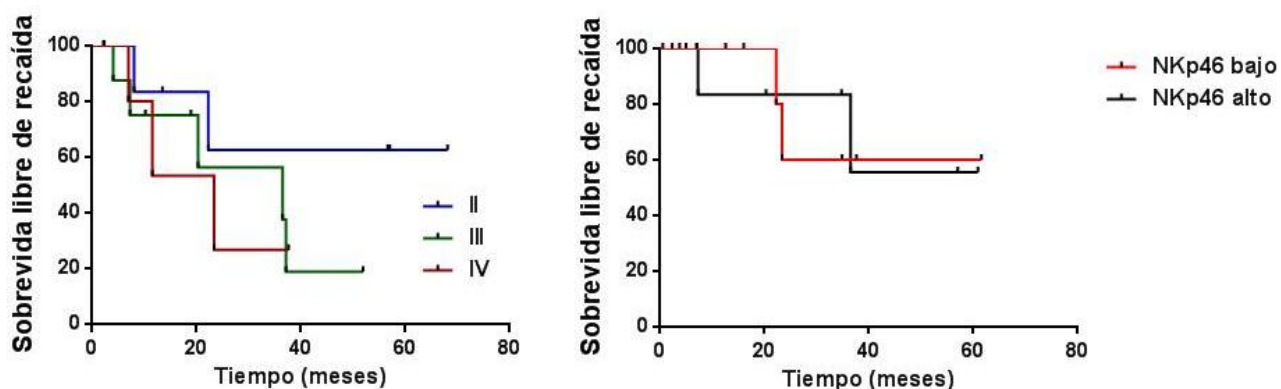
### 3.2 Evaluación de los efectos inmunológicos en pacientes tratados con neoadyuvancia

Debido a que una importante proporción de pacientes con CCR reciben tratamientos neoadyuvantes previamente a la cirugía, nos propusimos evaluar si dicha administración produce un efecto sobre las células NK, fenotípica o funcionalmente. Del total de 94 pacientes analizados en este estudio, 30 realizaron tratamiento neoadyuvante antes del momento de la obtención de la muestra de SP. El régimen más común fue administración de 5-fu y radioterapia. Comparamos sus características fenotípicas y observamos que no presentaron diferencias en porcentaje de células NK ni en la expresión de receptores de células NK (Figura 125). Asimismo, no presentaron diferencias en funcionalidad –degranulación,

producción de IFN $\gamma$  y capacidad lítica-. De esta manera, la administración de drogas quimioterapéuticas no parece afectar en gran medida el status de las células NK de SP de los pacientes. Sin embargo, los pacientes que recibieron neoadyuvancia no presentaron asociación de sobrevida libre de recaída con el marcador NKp46, como los pacientes que no habían recibido tratamiento previo a la obtención de la muestra (Figura 109), sugiriendo un cambio en la dinámica de la respuesta inmune. De hecho, la SLR de los pacientes que recibieron neoadyuvancia fue similar para los estadios II,III y IV -los pacientes de estadio I generalmente no reciben tratamiento-, a diferencia de los pacientes sin tratamiento, cohorte en la que la SLR en los pacientes de estadio IV fue significativamente menor (Figura 126).



**Figura 125:** Porcentaje de expresión de receptores de células NK de SP de pacientes con CCR clasificados de acuerdo a si recibieron tratamiento neoadyuvante previamente a la cirugía (Neo) o no (No-Neo).



**Figura 126: Izquierda.** Curvas de *Kaplan-Meier* de pacientes con CCR de estadios II, III y IV que recibieron tratamiento neoadyuvante previamente a la cirugía. N= 9, 10, 8 para estadios II, III y IV respectivamente. **Derecha.** Curvas de *Kaplan-Meier* de pacientes con CCR clasificados en baja expresión de NKp46 (N=10) y alta expresión de NKp46 (N=9) considerando como cota la mediana (90,81%).

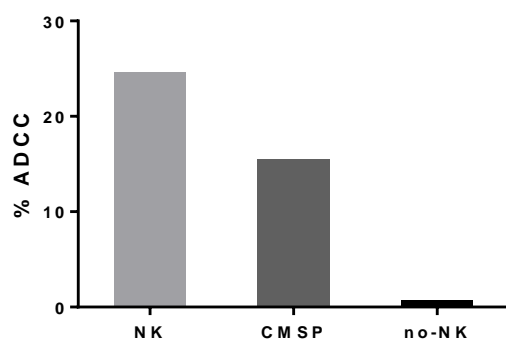
### 3.3 Inmunoterapias para la restauración de la funcionalidad de células NK

#### 3.3.1 AM Cetuximab

Teniendo en cuenta que las células NK de SP de pacientes con CCR se encontraron fenotípica y funcionalmente desreguladas y, aunque no se logró revertir completamente dicha desregulación, resultaron susceptibles de estimulación por las citoquinas inflamatorias IL-2 e IL-15. Por tal motivo, nos propusimos evaluar el efecto del AM Cetuximab como potencial activador de la función de células NK. Como mencionamos en la Introducción, el anticuerpo Cetuximab se administra actualmente en la clínica a pacientes con CCR metastásicos por su efecto anti-proliferativo de células tumorales. No obstante, al tratarse de un anticuerpo cuya región Fc puede ser reconocida por el receptor CD16 de células NK, tendría un efecto adicional inmunológico favoreciendo la ADCC de las células tumorales opsonizadas.



Realizamos ensayos de lisis de células DLD-1 durante 4 hs, previamente marcadas con calceína, en co-cultivos con CMSP de pacientes -relación E:T 2,5:1 relativizado a células NK-, considerando como referencia la cohorte de DS. En primer lugar corroboramos que la fracción NK fuera efectivamente la responsable de la ADCC, purificando las células NK y la fracción no-NK (Figura 127).



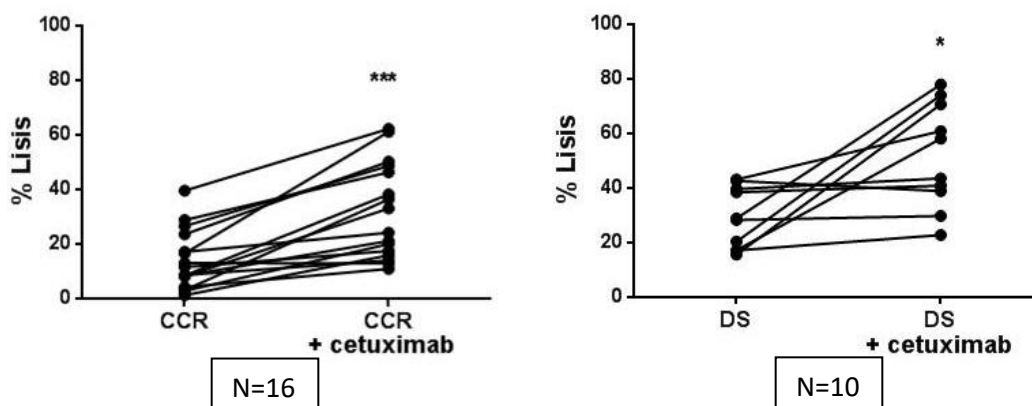
**Figura 127:** Porcentaje de ADCC frente a células DLD-1 de la fracción de células NK purificadas de SP de DS, CMSP o fracción no-NK.

El tratamiento con Cetuximab incrementó significativamente la lisis de las células tumorales tanto por parte de células NK de DS como de pacientes (Figura 128). No obstante, estas últimas alcanzaron niveles menores a los correspondientes de DS, en estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV) de la enfermedad (Figura 129). Esto podría deberse a la menor expresión de moléculas por células (menor IFM) del receptor CD16 en células NK de pacientes (Figura 78) lo que implicaría un menor reconocimiento del anticuerpo. La adición de IL-2 o IL-15, junto con Cetuximab, permitió la restauración completa de la capacidad de ADCC de células NK de pacientes, alcanzando niveles de lisis equivalentes a los de DS (Figura 130). Como vimos anteriormente, las citoquinas modularían la expresión de receptores y

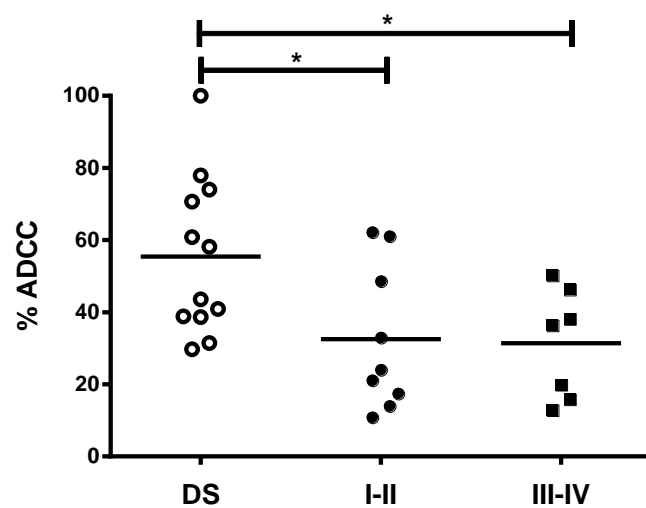
con ella, la capacidad funcional de las células NK, y Cetuximab promovería la ADCC.

Con el objeto de evaluar otras alternativas de combinatorias terapéuticas, realizamos los ensayos incubando previamente a las células NK en presencia de lenalidomida (Ver Introducción), que no incrementó la capacidad citotóxica de las células NK.

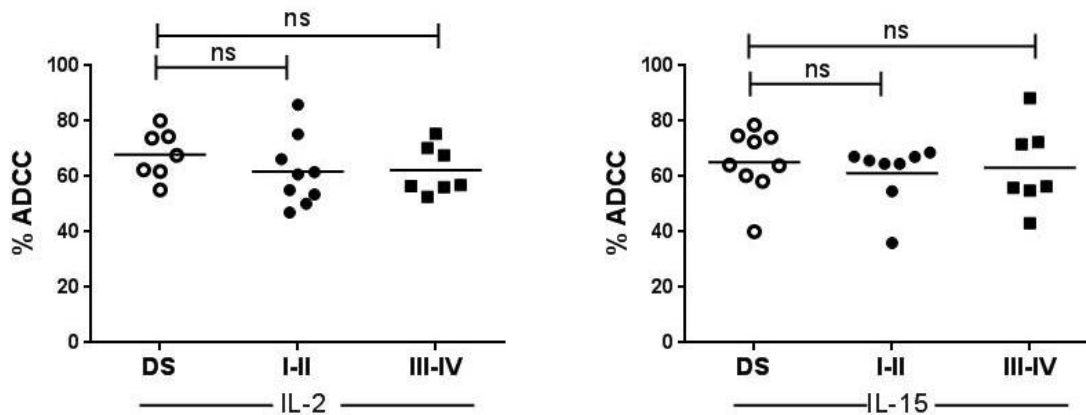
Cabe mencionar que la línea DLD-1 presenta una mutación en el gen KRAS, lo que implica que no sería blanco del efecto anti-proliferativo o pro-apoptótico medaído por el AM Cetuximab, por lo que el incremento en la lisis se debe exclusivamente al efecto inmune.



**Figura 128:** Porcentaje de lisis de células DLD-1 por células NK de pacientes con CCR (Izquierda) y DS (Derecha) en ausencia y presencia del AM Cetuximab. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test t* pareado. \* $p < 0,05$  \*\*\* $p < 0,001$ .

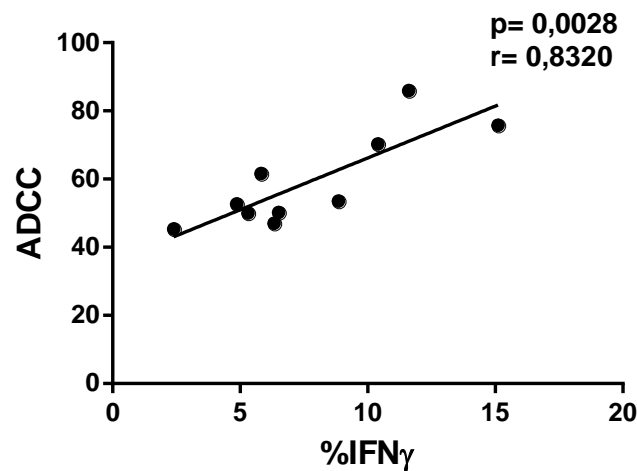


**Figura 129:** Porcentaje de ADCC por parte de células NK de SP de DS y de pacientes con CCR, clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV), frente a la línea tumoral DLD-1 en relación E:T 2,5:1. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \* $p < 0,05$ .



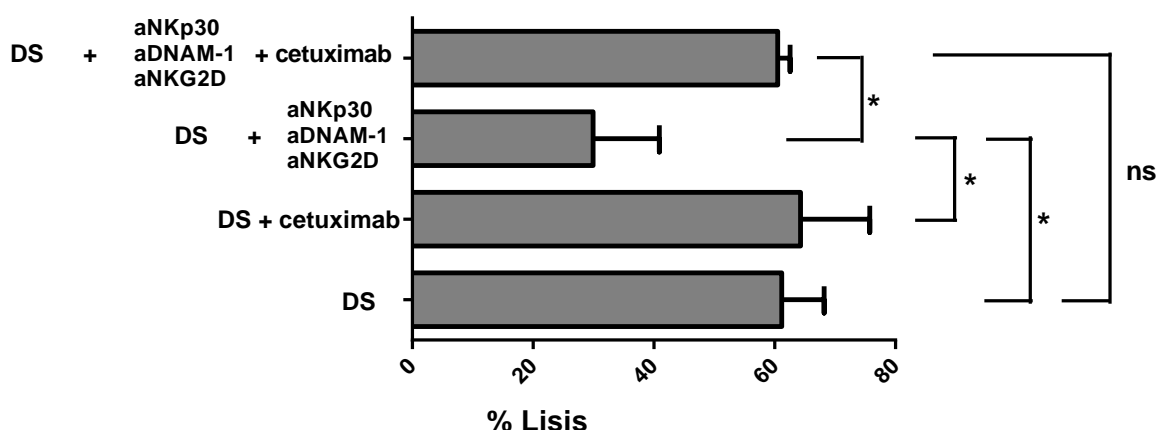
**Figura 130:** Porcentaje de ADCC de células NK de SP de DS y de pacientes con CCR, clasificados según estadios tempranos (I-II) y tardíos (III-IV), frente a la línea celular DLD-1, estimuladas con IL-2 (Izquierda) o IL-15 (Derecha).

Cabe mencionar que el porcentaje de ADCC de células NK de pacientes con CCR correlacionó positivamente con la producción de IFN $\gamma$  de las mismas, lo que indicaría una asociación en la regulación de ambas funcionalidades (Figura 131).



**Figura 131:** Correlación entre la ADCC y la producción de IFN $\gamma$  por parte de células NK de SP de pacientes con CCR. Se utilizó el *test Spearman* para el análisis estadístico.

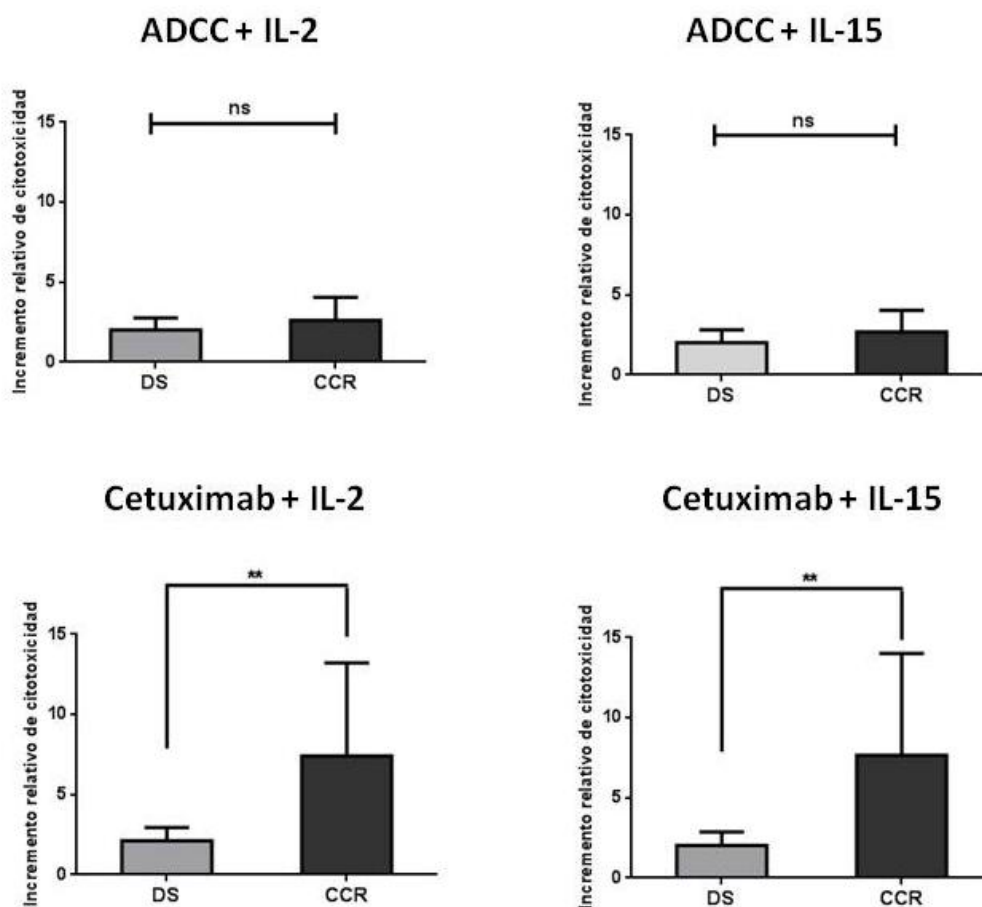
Realizamos nuevamente ensayos dinámicos de ADCC mediante *xCELLigence system*, a partir de células NK de SP de DS pre-estimuladas ON con IL-2, tratándolas previamente con AM bloqueantes de los receptores activadores DNAM-1, NKG2D y NKp30. El bloqueo de dichos receptores “simula” el fenotipo de células NK desreguladas, tal como las correspondientes a pacientes con CCR, y genera la consecuente disminución de capacidad lítica (Figura 132). La adición de Cetuximab en presencia de los anticuerpos bloqueantes permitió la restauración total de la funcionalidad.



**Figura 132:** Porcentaje de lisis de DLD-1 por células NK de DS pre-estimuladas por IL-2 en presencia de anticuerpos control (barra inferior); Cetuximab; anti-NKp30, anti-DNAM-1 y anti-NKG2D y; los tres AM bloqueantes junto con Cetuximab.  $n=3$  experimentos independientes  $*p<0,05$ ; ns= no significativo. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el *test t* pareado.

Al evaluar el incremento relativo en la ADCC debido a las citoquinas inflamatorias, observamos que fue similar para células NK de DS y de pacientes, es decir que responderían en igual medida a IL-2 e IL-15 (Figura 133). No obstante, al

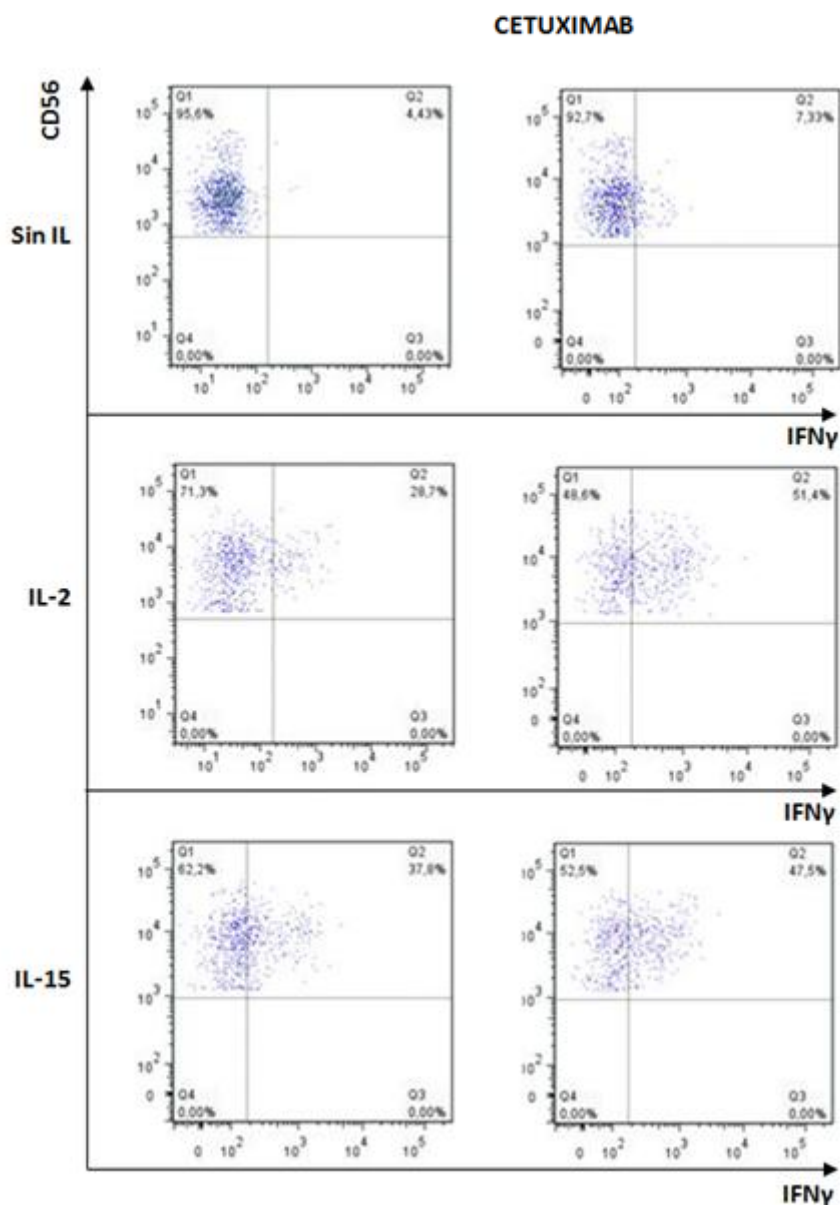
evaluar los estímulos en conjunto (Cetuximab + IL-2/15), el incremento lítico fue mayor para células NK de pacientes con CCR.



**Figura 133:** Incremento relativo en la funcionalidad de células NK de DS y de pacientes con CCR, en respuesta a los estímulos de IL-2, IL-15 o el estímulo conjunto de las ILs con Cetuximab. El análisis estadístico fue llevado a cabo mediante el *test Mann-Whitney*. \*\* $p < 0,01$ .

El AM Cetuximab no sólo favoreció la citotoxicidad de las células NK sino que, a su vez, tuvo un efecto estimulador sobre la producción de  $IFN\gamma$ , en condiciones estimulatorias -por IL-2 o IL-15-, generando un nexo adicional de las

células NK con otras poblaciones inmunes (Figura 134). Cabe mencionar que, tal como se observa en los *dot plots* ejemplificadores, en ensayos cortos de 6 hs el *subset* de células NK<sup>dim</sup> es el principal productor de IFN $\gamma$ <sup>122</sup>.



**Figura 134:** *Dot plots* ejemplificadores de producción de IFN $\gamma$  por células NK de SP de DS sin IL o pre-estimuladas con IL-2 o IL-15, en presencia de la línea tumoral DLD-1 en ensayos de 6 hs de duración. En la columna derecha se observa el efecto de la adición de Cetuximab al co-cultivo.

# Discusión



Las células NK constituyen importantes efectores citotóxicos de la inmunidad innata en la defensa contra células tumorales desde el inicio del desarrollo tumoral. Monitorean la expresión aberrante de ligandos, presente usualmente en el proceso de transformación maligna, lo que les permite identificar células blanco y desencadenar su función citotóxica. La habilidad de las células NK de lisar rápidamente células *target* sin inmunización previa podría ser significativa para la restricción tumoral y, a su vez, la liberación de citoquinas inflamatorias tendría un fuerte impacto en la inmunidad adaptativa. Recientemente emergieron diversos enfoques cuyos propósitos se centraban en estimular la función anti-tumoral de células NK, y promover su llegada al microambiente tumoral, con el fin de mejorar la respuesta clínica de pacientes con cáncer<sup>123</sup>. Si bien existen suficientes evidencias acerca del impacto de otras poblaciones leucocitarias en CCR, el rol de las células NK no fue claramente descrito. Por este motivo, llevamos a cabo un estudio exhaustivo de células NK de pacientes con CCR, tanto infiltrantes al tejido como en SP, con el objeto de determinar si efectivamente cumplen un rol en el control de la enfermedad y, si es posible, postular el desarrollo de inmunoterapias que pudieran administrarse en combinación con los tratamientos actuales.

En primer lugar, evaluamos la presencia de células NK en el tejido tumoral y peri-tumoral, mediante IHQ del marcador NKp46, en muestras tumorales fijadas de pacientes con CCR. Observamos que las células NK tienen la capacidad de infiltrar el tejido tumoral, aunque desde estadios tempranos el infiltrado peri-tumoral sería más abundante. Asimismo, los pacientes de estadio IV presentaron una proporción mayor de células NK tanto en tejido tumoral como peri-tumoral

por lo que existiría una respuesta inmunológica de mayor envergadura y producción de agentes quimioattractantes. Dicha respuesta podría implicar un mayor efecto protector al hospedador o un beneficio al escape tumoral y diseminación por modulación tumoral inmunosupresora. Recientemente se han publicado trabajos que caracterizan poblaciones linfoides innatas, en el microambiente de otros tumores, que inhibirían la activación de células T y que compartirían similitudes fenotípicas con las células NK –expresión de CD56 y NKp46-<sup>124</sup>. No obstante, en nuestro estudio, la presencia de infiltrado NKp46<sup>+</sup> no sólo no presentó asociación con peor pronóstico de los pacientes con CCR sino que, observamos una tendencia no significativa a un incremento de la SLR de los mismos con el aumento del infiltrado. En todos los casos, la presencia de linfocitos T intra-tumorales fue superior –mayormente células CD4<sup>+</sup>- y no presentó asociación con el infiltrado de células NK, tal como describieron otros autores<sup>108</sup>. Cabe mencionar que, en el contexto del CCR, la disminución de expresión de las moléculas HLA en la superficie de células tumorales es considerada un mecanismo de escape tumoral frecuente<sup>119</sup>, por evasión de citotoxicidad por parte de linfocitos T, lo que convertiría al tumor en un escenario fértil para la acción de células NK infiltrantes.

Habiendo determinado la presencia de células NK en el infiltrado tumoral por IHQ, nos propusimos caracterizar dicha población, fenotípica y funcionalmente, mediante citometría de flujo a partir de muestras tumorales y de mucosa adyacente. Observamos que las células NK infiltrantes presentan un fenotipo desregulado, con una baja expresión de receptores activadores y conservación de los receptores inhibitorios, en ambos compartimentos. Teniendo en cuenta que las células NK no infiltran en gran medida tejidos sanos, el tumor o la consecuente respuesta inmune inducirían su atracción al ambiente peri-tumoral. Allí, diversos factores tales como la exposición crónica a ligandos de células

blanco<sup>125</sup>, la proliferación luego de activación y factores inmunosupresores liberados por células tumorales podrían ser responsables de la alteración de la expresión fenotípica de las células NK.

Cabe destacar que las células NK tienen la capacidad de interactuar con CD en los tejidos a través de los receptores activadores DNAM-1 y NKp30<sup>126</sup> por lo que, variaciones en su fenotipo también afectarían la correcta maduración de CD o eliminación de CD tolerogénicas. La edición de la respuesta inmune ocurre en etapas iniciales desde el tejido por lo que la desregulación en receptores de células NK podría impactar en el normal desenvolvimiento de la respuesta inmune adaptativa.

Con el fin de evaluar el papel de las células tumorales en la modulación del fenotipo de células NK, realizamos co-cultivos de éstas -provenientes de DS- con las líneas tumorales HT-29 y DLD-1 de CCR. Observamos que, luego de 5 días de co-cultivo, las células NK que inicialmente expresaban porcentajes normales de receptores de superficie, fueron moduladas análogamente a las células NK infiltrantes al tumor. Algunas variaciones fueron dependientes de contacto directo entre ambos tipos celulares, mientras que otras se debieron a factores solubles liberados por las células tumorales. La línea HT-29 afectó en mayor medida el fenotipo de células NK, induciendo principalmente la disminución de expresión de los receptores CD16, NKG2D, DNAM-1, NKp30 y CD161. Las líneas HT-29 y DLD-1 inducirían diferentes cambios ya que constituyen dos modelos de experimentación con expresión de ligandos y perfil de liberación de factores inmunosupresores diferenciales. La molécula inmunosupresora TGF- $\beta$ , asociada a procesos carcinogénicos en CCR, potencialmente liberada por células tumorales, indujo a su vez la disminución de expresión de DNAM-1, NKp46, NKp44, NKp30 y NKG2D, tal como fue descrito en otros trabajos<sup>127</sup>.

Asimismo, el co-cultivo con células tumorales incrementó la expresión de los *immune checkpoints* PD-1 y PDL-1 en células NK, lo que favorecería su propia

inhibición y la inhibición de linfocitos T mediante la unión del complejo PD-1/PDL-1 (con células tumorales y células NK). De esta manera, las células NK cumplirían un rol regulatorio de la respuesta inmune, como fue observado en otros tipos tumorales<sup>114</sup>. En este sentido, la expresión de PDL-1 por parte de las células tumorales, que arrestaría la función tanto de células NK como de linfocitos T, es considerada un contra-ataque tumoral.

Es importante mencionar que, así como luego de la activación las células NK aumentan la expresión de la molécula FasL, que provocaría la apoptosis de células tumorales que expresasen el receptor de muerte Fas, las células tumorales tienen la capacidad de inhibir la respuesta inmune mediante la expresión de FasL, capaz de unir Fas -expresado constitutivamente en células NK-<sup>94</sup>.

Evaluamos posteriormente la capacidad funcional de las células NK moduladas por co-cultivo, mediante medición de CD107a en membrana y producción de IFN $\gamma$ , frente al desafío por células K562. Observamos un fuerte impedimento en la producción de IFN $\gamma$  y una disminución moderada de la capacidad de degranulación, lo que implica un menor umbral de activación requerido para la liberación de perforinas y granzimas con respecto a la liberación de citoquinas inflamatorias<sup>128</sup>. Es importante mencionar que la liberación de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por células NK favorece la maduración de CD en el tejido -las cuales, a su vez, producen IL-12 que activa células NK- y la activación de macrófagos por lo que, si dicha secreción disminuye, el desarrollo de la respuesta adaptativa puede verse afectado.

La disminución de degranulación, producción de IFN $\gamma$  y de expresión de receptores activadores fue parcialmente revertida por la adición de citoquinas estimuladoras IL-2 o IL-15, interleuquinas secretadas en el organismo por monocitos, macrófagos o CD. La exposición a citoquinas promueve la expansión y activación de células NK. La IL-15 sería necesaria particularmente para la supervivencia mientras que la IL-2 restauraría la citotoxicidad y reserva de gránulos

citotóxicos<sup>90</sup>. Es importante destacar que la activación de células NK promovería un perfil Th1 de la respuesta inmune, favoreciendo así la expansión de linfocitos T citotóxicos anti-tumorales.

Teniendo en cuenta que las principales vías metastásicas del CCR son linfática y hemática<sup>129</sup>, evaluamos las células NK circulantes de SP que, según estudios recientes, cumplirían un rol en el control de la diseminación tumoral<sup>130</sup>. Se han identificado en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama y melanoma, alteraciones de la actividad de células NK circulantes, debidas principalmente a desbalances fenotípicos en la expresión de receptores activadores e inhibitorios<sup>131132</sup>. En el presente trabajo analizamos 56 muestras de SP de pacientes con CCR -sin tratamiento previo a la cirugía- considerando como población control una cohorte de DS. En primer lugar, observamos que las células NK resultaron más abundantes en SP de pacientes, incrementando gradualmente su porcentaje -y número absoluto- dentro de la población linfocitaria hasta alcanzar los valores más altos en estadio IV. No obstante, dicho aumento no implicó una mayor actividad anti-tumoral ya que las células NK de pacientes presentaron una expresión profundamente alterada del repertorio de receptores activadores con respecto a DS. Mientras que en otros tipos tumorales sólo se observan variaciones en uno o pocos receptores, en SP de CCR existiría una desregulación integral de la expresión de receptores de células NK<sup>133 134 135</sup>. Dicha desregulación se caracterizó por disminución de la expresión de los receptores activadores CD16, NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp46 y; un incremento de los inhibitorios NKG2A y CD85j. El aumento de receptores inhibitorios implicaría una mayor probabilidad de reconocimiento de ligandos por parte de ellos, tales como moléculas de HLA, y la consecuente desfosforilación de residuos tirosin-kinasas de los receptores activadores. Por otro lado, observamos un menor porcentaje del receptor CD94, integrante de heterodímero activador con la molécula NKG2C -

medida en bajo número de muestras- y del heterodímero inhibitorio junto a NKG2A. Considerando que este último se encuentra aumentado, podríamos inferir una disminución del heterodímero activador, de reconocimiento del ligando HLA-E. A su vez, observamos una disminución en la expresión de CD158a, receptor de tipo KIR inhibitorio de rol preponderante en el licenciamiento de las células NK ya que les permite el reconocimiento *de lo propio* de acuerdo a la hipótesis del *missing-self*. Teniendo en cuenta que la maduración de las células NK es un proceso que continúa en SP, luego de la salida de MO, así como los linfocitos T, la pérdida de este receptor podría volverlas hipo-respuestas. Por último, hallamos una disminución en el porcentaje de expresión de CD161, receptor que presentaría una función dual en las células NK.

Las alteraciones fenotípicas mencionadas ocurren en células NK de SP de pacientes desde estadios tempranos (I-II) de la enfermedad. Esto implica una desregulación temprana del sistema inmune por lo que podrían estudiarse biopsias de colonoscopías -antes de diagnóstico- con el fin de evaluar si se trata de un fenómeno previo al establecimiento del tumor o posterior.

Por otro lado, analizamos la proporción de CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> dentro de la población de células NK de pacientes con CCR según su estadificación y, observamos un aumento marginal del porcentaje de células NK<sup>dim</sup> y una disminución de células NK<sup>bright</sup> en estadios tardíos de la enfermedad, con respecto a DS. Existen ciertos receptores más expresados por un *subset* que por el otro como CD16, receptores KIRs y NKG2A. Teniendo en cuenta que las diferencias encontradas para dichos receptores con respecto a DS fueron observadas a partir de estadios tempranos de la enfermedad y que la diferencia entre los *subsets* dim/bright fue marginal, la variación de expresión de los receptores CD16, CD158a y NKG2A no se debería a variación de la proporción de poblaciones dim/bright de células NK.

Además de receptores activadores e inhibitorios, evaluamos la expresión de otros marcadores como PD-1 y PDL-1 expresados en la superficie de células NK de SP de pacientes. Observamos un incremento significativo en su expresión con respecto a DS, lo que implicaría que las células de pacientes no sólo resultan menos citotóxicas sino que, a su vez, cumplirían un rol regulatorio de la respuesta inmune inhibiendo linfocitos T que expresen la molécula PD-1.

Con el fin de determinar si las citoquinas inflamatorias IL-2 e IL-15 tienen la capacidad de estimular fenotípicamente a las células NK de SP de pacientes, realizamos tratamientos ON y observamos un incremento en la expresión de los receptores activadores NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp44 así como también una disminución de NKG2A. Estas variaciones fenotípicas fueron acompañadas por un aumento en la expresión de las moléculas de activación TRAIL, CD57 y HLA-DR. TRAIL reconoce a su ligando TRAILR -receptor de muerte- y genera la apoptosis de la células blanco. La molécula CD57 define una población madura de células NK<sup>dim</sup> que presentarían mayor citotoxicidad<sup>87</sup>. HLA-DR se asocia a un incremento en la degranulación<sup>136</sup> y, en ciertas circunstancias, permitiría la presentación de péptidos a linfocitos CD4<sup>+137</sup>. Como contraparte, el tratamiento con IL-2 e IL-15 generó un incremento de las expresión de los *immune checkpoints* PD-1, PDL-1 y TIM-3 - la cual inhibe la función citotóxica- cuya expresión aumenta luego de la activación como mecanismo de freno de la respuesta inmune.

Posteriormente, evaluamos el efecto de características clínicas de los pacientes con CCR -localización tumoral, nivel de CEA plasmático, tipo histológico e IVL- sobre el status de células NK. Observamos que pacientes con tumores poco diferenciados, lo que generalmente indica un mal pronóstico, presentaron altos porcentajes de los receptores NKG2D y DNAM-1, posiblemente explicada por la protección adicional de mucinas secretadas por el tumor y mecanismos de evasión inmune alternativos. Contrariamente, Peng et al.

mostraron que el porcentaje de NKG2D se asocia positivamente con el grado histológico bien diferenciado<sup>138</sup>.

Por otro lado, encontramos una asociación entre la baja expresión de CD8 por células NK y la invasión vascular del tumor. Teniendo en cuenta que la molécula CD8<sup>139</sup> se asocia a una alta actividad lítica, su baja expresión podría relacionarse a una IVL positiva, de peor pronóstico.

A su vez, un alto porcentaje del receptor inhibitorio NKG2A se asoció con una IVL ausente. En este sentido, más allá de asociaciones entre receptores individuales y factores clínicos, la respuesta de células NK se debe a la integración de señales positivas y negativas, por lo que no resulta fácil encontrar una relación causa-efecto en todos los casos.

Si bien desde los comienzos las células NK fueron caracterizadas como parte de la inmunidad innata y especialistas en eliminar células *target* de manera inespecífica, en los últimos años se acumuló evidencia sobre su paralelismo a linfocitos T CD8<sup>+</sup> en cuanto a educación, especificidad, expansión clonal y generación de memoria. Comparten a su vez mecanismos de lisis de células blanco a través de liberación de granzimas y perforinas, producción de citoquinas inflamatorias como IFN $\gamma$  y activación de genes requeridos para la diferenciación del *subset* celular como Tbet<sup>63</sup>. El estudio de estas similitudes podría ayudar a comprender la dinámica y complejidad de células NK. Asimismo, parte de los receptores analizados en células NK son expresados en linfocitos T, como NKG2D, DNAM-1 y CD8 aunque con un peso funcional diferencial. Se sabe que las células T tienen la capacidad de activarse a través de señalización de NKG2D o DNAM-1 como moléculas co-estimuladoras, si fueron previamente activados por citoquinas<sup>112113</sup>. En pacientes con CCR, el porcentaje de DNAM-1 en linfocitos T intra-tumorales –alrededor del 30%- es mucho menor que el correspondiente a linfocitos T de SP –alrededor del 60%- lo que indicaría una desregulación de la co-estimulación de células T en el microambiente tumoral. Cabe mencionar que en SP



conservan una expresión equivalente a linfocitos T de DS por lo que la desregulación de la expresión del receptor sería exclusiva de células NK.

Las células NK de SP de pacientes con CCR, desafiadas con células tumorales, presentaron una baja producción de IFN $\gamma$ , degranulación y capacidad lítica en todos los estadios de la enfermedad. Esto resulta particular ya que en otros tipos de cáncer -como melanoma, pulmón y cáncer de mama- se observan desregulaciones sólo en estadios avanzados de la enfermedad<sup>133 131</sup>. Teniendo en cuenta que la modulación de receptores activadores e inhibitorios se observó desde estadios tempranos, es posible que ello repercuta en la funcionalidad de células NK también desde estadios iniciales, impidiendo la eliminación de células tumorales circulantes. Tanto la función citotóxica como la producción de IFN $\gamma$  resultaron estimulables en ensayos cortos por adición de citoquinas inflamatorias. De esta manera, los gránulos citotóxicos se encuentran en el citoplasma celular y luego de la activación son exocitados mientras que el IFN $\gamma$  es rápidamente sintetizado a partir de ARN mensajero ya transcrito. Cabe mencionar que las células NK<sup>dim</sup> tienen la capacidad de secretar IFN $\gamma$  a tiempos cortos decreciendo con el tiempo mientras que las células NK<sup>bright</sup> lo producen en mayor medida luego de 16 hs del estímulo<sup>122</sup>.

A partir de ensayos de lisis dinámicos con AM bloqueantes, observamos una fuerte asociación entre la expresión de NKp30, NKG2D y DNAM-1 y la capacidad lítica de células NK contra células tumorales. Se ha demostrado que los receptores del grupo NCR y NKG2D pueden llevar a cabo una respuesta funcional sinérgica<sup>140</sup> sin embargo, en nuestro modelo, NKp30 fue el receptor preponderante en la lisis contra células DLD-1.

La desregulación de células NK de SP podría ser consecuencia, en parte, de factores solubles producidos por el tumor que promovieran una inhibición sistémica sin contacto directo con células tumorales ya que, presumiblemente, las

células de SP no hayan estado en el microambiente tumoral<sup>141</sup>. Teniendo en cuenta que TGF $\beta$  ejerce numerosos efectos sobre células NK como inhibición de la proliferación, de producción de citoquinas y disminución del receptor activador NKG2D<sup>142</sup>, evaluamos su concentración en plasma de pacientes. Encontramos niveles aumentados de TGF $\beta$  con respecto a DS desde estadios tempranos de la enfermedad que podrían estar asociados al fenotipo alterado de células NK. Debería estudiarse su presencia en mayor número de muestras de plasma de pacientes con el fin de confirmar esta hipótesis.

Como observamos en algunas muestras tumorales, existe producción de ARN mensajero de TGF $\beta$ , aunque éste podría ser secretado por linfocitos Treg, macrófagos asociados a tumor o efectivamente células tumorales. Cabe destacar que la molécula TGF $\beta$  bloquea la activación de células NK pero no impide su supervivencia por lo que éstas seguirían siendo susceptibles de restauración terapéutica por citoquinas<sup>143</sup>.

Analizando la expresión de receptores en pacientes y su respuesta clínica, observamos que aquellos que expresaban valores altos de NKp46 en células NK de SP al momento de la cirugía, presentaron una sobrevida libre de recaída mayor. Fregni et al. demostraron una asociación entre la escasa presencia de células NKp46<sup>+</sup> en tumores de melanoma y la progresión de pacientes de estadio IV, por lo que las células NK podrían tener implicancias en el pronóstico de los pacientes con cáncer. En este análisis, estudiamos pacientes de estadios I, II y III ya que los pacientes de estadio IV presentan una SLR menor debido al avance de la enfermedad. Es importante determinar variables que permitan predecir pronóstico o respuesta a tratamientos con el fin de saber qué pacientes se verán beneficiados por la terapia adyuvante.

Con el fin de restaurar la funcionalidad de células NK de pacientes con CCR, postulamos la administración de una combinación de terapias –desde estadios tempranos de la enfermedad- que involucrara citoquinas y AMs que incrementaran los niveles de ADCC como Cetuximab. No observamos efectos estimulatorios *per se* con la droga lenalidomida *in vitro*, la que estimularía linfocitos T a secretar IL-2 y ésta a su vez estimularía células NK<sup>144</sup>. No obstante, podría evaluarse su efecto sobre células NK *in vivo*.

Al estudiar el AM Cetuximab, dirigido contra la molécula EGFR y administrado en pacientes con el gen KRAS *wild type*, logramos activar células NK agotadas de pacientes, en presencia de IL-2 o IL-15, alcanzando valores de capacidad lítica similares a los correspondientes de DS. Cabe mencionar que Cetuximab activaría, a su vez, el sistema del complemento, activable por complejos inmunes de anticuerpos y antígenos, generando un efecto inmune adicional a la ADCC por células NK. Asimismo, Cetuximab induce la liberación de IFN $\gamma$  por parte de células NK, lo que activaría a CD y linfocitos T, ejerciendo un papel en el desarrollo de la inmunidad adaptativa<sup>145 146</sup>. Es importante destacar que la concentración utilizada en los ensayos *in vitro* fue mucho menor que la administrada en la clínica, permitiendo un efecto inmune sin requerir altas dosis de Cetuximab. Por último, se sabe que 5% de los pacientes tratados con Cetuximab generan anticuerpos dirigidos contra la molécula quimérica aunque no afectan su capacidad de unirse a EGFR (Prospecto ERBITUX).

Por estas razones, consideramos que el AM Cetuximab podría administrarse no sólo en pacientes KRAS *wild type*, complementando el efecto anti-tumoral con la estimulación del sistema inmune. Actualmente, existen múltiples ensayos clínicos que evalúan el uso de AMs y citoquinas en conjunto<sup>147 148</sup> por lo que creemos que el enfoque más apropiado es una combinatoria de terapias. De hecho, existen diversos ensayos que observan que pacientes de CCR con

mutaciones en el gen KRAS pueden verse beneficiados por la terapia con Cetuximab<sup>149 150 151</sup>.

Teniendo en cuenta las recientes publicaciones que demuestran el rol potencial de las terapias anti-PD1 en varios tipos tumorales<sup>152</sup> y en pacientes con CCR avanzado<sup>153</sup>, son necesarios estudios para comprender el mecanismo por el cual las células del sistema inmune modularían la progresión del cáncer y, si es posible, determinar bio-marcadores para la selección de pacientes que se beneficiarían por estas terapias. Existe un sub-grupo de pacientes con inestabilidad microsatelital –como mencionamos en la Introducción–, que presentarían mayor infiltrado inmune en el tumor y, mejor respuesta a terapias de *immune checkpoints*<sup>154</sup>.

En la actualidad, la terapia más comúnmente administrada en pacientes con CCR es la QT, constituida por las drogas oxa y 5-fu. Observamos, en primer lugar, que pacientes que habían recibido dicha terapia neoadyuvante –antes de la cirugía– no presentaron importantes características detrimentales en células NK de SP. Adicionalmente, en nuestro modelo *in vitro*, las células tumorales que habían sido expuestas a concentraciones equivalentes a las plasmáticas en el organismo, presentaron una susceptibilidad mayor a la lisis por células NK. En ensayos dinámicos de *xCELLigence system* observamos un aumento del 30% de la lisis de células tumorales luego de exposición a QT. Esto podría deberse a un cambio intrínseco de las células tumorales frente a granzimas y perforinas, al aumento de expresión de receptores de muerte en superficie que gatillarían la apoptosis por unión con células NK o a una mayor degranulación por parte de éstas, no detectable en este diseño experimental. Se sabe que la droga oxa incrementa calreticulina en membrana de células tumorales<sup>155</sup>, en el presente trabajo observamos el aumento de Fas, MICA/B y CD155 (ligandos de receptores activadores de células NK) aunque no pudimos medir la expresión de las moléculas de tipo TRAILR –que gatillarían a su vez el proceso de apoptosis por

unión con TRAIL de células NK-. De esta manera, la QT no sólo no tendría un efecto negativo sobre células NK de pacientes sino que podría favorecer su acción sobre células tumorales.

Existen múltiples escenarios para la combinación de inmunoterapias, tales como la administración de AMs anti-TGF $\beta$  –que bloquearía los efectos inhibitorios de la citoquina-, AMs anti-CD85j –que contrarrestarían la inhibición de células NK que presentan este receptor aumentado<sup>156</sup>-, moléculas recombinantes solubles de DNAM-1 –que se ha visto inhiben la proliferación de células tumorales<sup>157</sup>-, Cetuximab, AMs anti-PD-1/PDL-1 e interleuquinas estimuladoras. En la Figura 120 se muestra el modelo postulado de interacción de células NK con células tumorales, en el microambiente tumoral y en SP, antes y luego de la administración de terapias.

#### COMENTARIOS FINALES

La saturación del sistema inmune a causa de un rápido crecimiento tumoral, la difícil accesibilidad al microambiente del tumor o la resistencia de células tumorales a la apoptosis, promovería la diseminación del cáncer. Asimismo, la liberación de factores inmunosupresores que inhiben la proliferación y activación de linfocitos T y células NK, correlaciona en diversos tumores con un peor pronóstico clínico<sup>94</sup>.

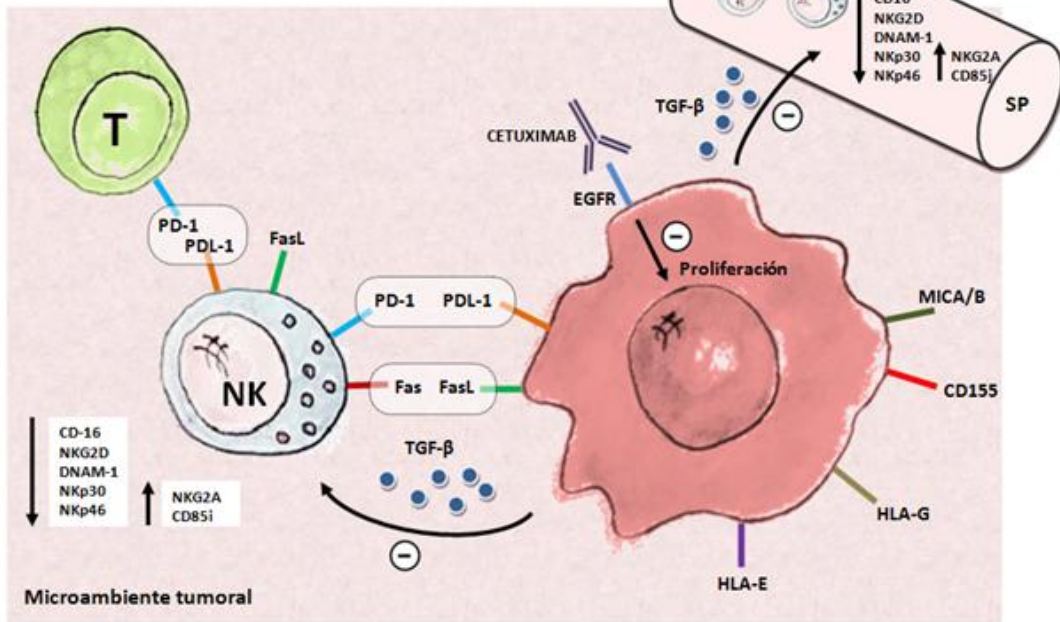
Considerando nuestra hipótesis inicial, concluimos que las células NK son inhibidas por mecanismos inmunosupresores en pacientes con CCR, tanto en el microambiente tumoral como de manera sistémica –siendo la molécula TGF $\beta$  uno de los posibles actores-, lo que impide su normal desempeño, promoviendo así el escape tumoral. Esto fue evidenciado por una desregulación integral del fenotipo y

capacidad citotóxica de células NK de pacientes que impactaría, a su vez, en el desenlace de la respuesta inmune adaptativa.

Las células NK tienen la capacidad de identificar y lisar células blanco que se ve aplacada ante un contexto de agotamiento celular, no obstante, esto puede ser revertido a través de diversos enfoques. El AM Cetuximab incrementaría el reconocimiento de las células tumorales, y las citoquinas estimuladoras revertirían el agotamiento disminuyendo el umbral de activación y favoreciendo la normal expresión de receptores de membrana que, en su conjunto, determinarían el accionar de las células NK. En un esfuerzo por contrarrestar el ataque tumoral mediante la combinación de terapias, surge el estímulo de la inmunovigilancia por parte de las células NK (que podrían cumplir un rol en el control de la formación de metástasis) como una alternativa prometedora para su aplicación junto con drogas quimioterapéuticas. Dicha combinación puede resultar beneficiosa para el reconocimiento de células tumorales y la formación de la sinapsis lítica.

Consideramos que, en un futuro, debería estudiarse en profundidad la interacción de células NK con actores de la inmunidad adaptativa, como CD y linfocitos T, así como el impacto de las terapias propuestas en combinación con la QT, que incrementaría la inmunogenicidad de las células tumorales.

Desregulación y agotamiento celular



Restauración de la funcionalidad

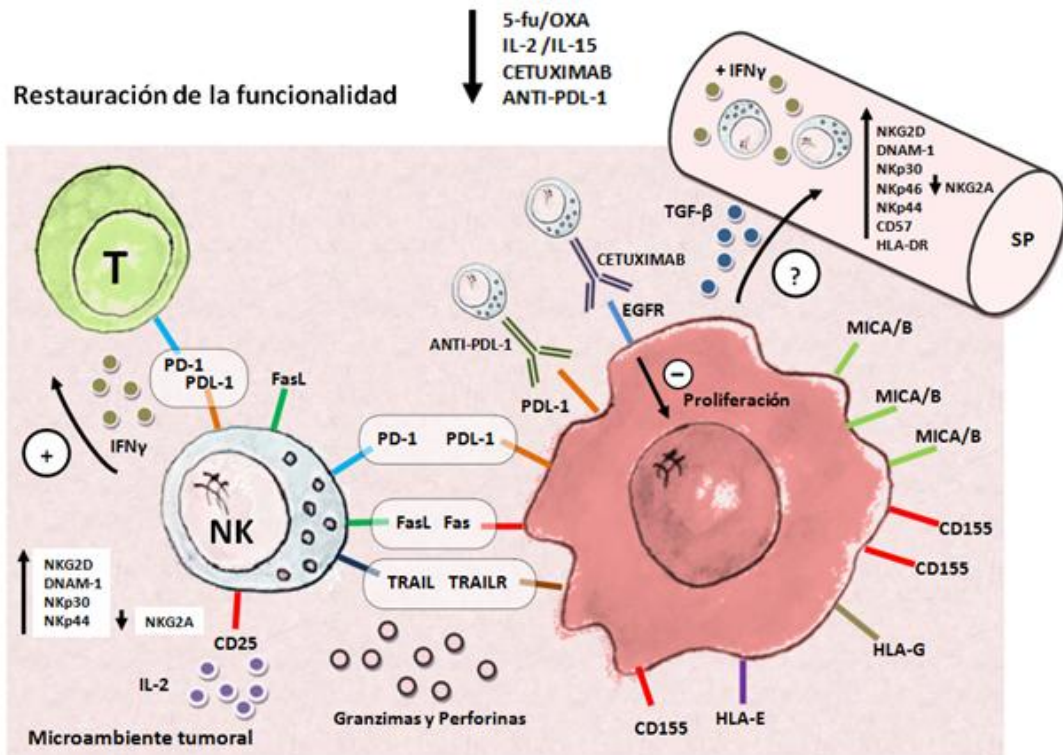


Figura 135: Modelo postulado de interacción de células NK con células tumorales, en el microambiente tumoral y en SP, antes y luego de la administración de drogas quimioterapéuticas (5-fu y oxa), citoquinas inflamatorias (IL-2 e IL-15) y AMs que promueven la ADCC.

# Bibliografía

1. Pagès, F. *et al.* Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* **29**, 1093–1102 (2010).
2. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–10 (2008).
3. Pagès, F. *et al.* Effector Memory T Cells, Early Metastasis, and Survival in Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 2654–2666 (2005).
4. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
5. Collado, M. & Serrano, M. Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 51–57 (2010).
6. Wajant, H. Principles and mechanisms of CD95 activation. *Biol. Chem.* **395**, 1401–1416 (2014).
7. Hornsby, P. J. Telomerase and the aging process Peter. *Biophys. Chem.* **42**, 575–581 (2005).
8. Hanahan, D. & Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86**, 353–364 (1996).
9. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**, 789–799 (2004).
10. Lemmon, M. a & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor-tyrosine kinases. *Cell* **141**, 1117–1134 (2010).
11. Masuda, M., Sawa, M. & Yamada, T. Therapeutic targets in the Wnt signaling pathway: Feasibility of targeting TNIK in colorectal cancer. *Pharmacol. Ther.* **156**, 1–9 (2015).
12. Zhu, H. *et al.* Polymorphisms in mismatch repair genes are associated with risk and microsatellite instability of gastric cancer, and interact with life exposures. *Gene* **579**, 52–57 (2016).
13. Sharma, G. *et al.* Distinct Genetic Profiles of Extracranial and Intracranial Acral Melanoma Metastases. *J Cutan Pathol.* **43**, 884–91 (2016).
14. Chen, W., Swanson, B. J. & Frankel, W. L. Molecular genetics of microsatellite-unstable colorectal cancer for pathologists. *Diagn. Pathol.* **12**, 24 (2017).



15. Nowell, P. C. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol.* **12**, 261–266 (2002).
16. Willis, R. E. Targeted cancer therapy: Vital oncogenes and a new molecular genetic paradigm for cancer initiation progression and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
17. Stewart, B. W. & Wild, C. P. World cancer report 2014. *World Heal. Organ.* 1–2 (2014). doi:9283204298
18. Sala de Situación del Cáncer-República Argentina 2014. *Inst. Nac. del Cáncer* (2014).
19. Gualdrini, U., Lummato, L. & Bidart, M. *Guía para equipos de atención primaria de la Salud. Programa Nacional de Prevención y detección temprana de Cáncer Colorrectal* (2015).
20. Horvat, M. & Stabuc, B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Radiol. Oncol.* **45**, 75–81 (2011).
21. Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Höhler, T. & Galle, P. Colorectal cancer. *Lancet* **365**, 153–165 (2005).
22. Lodewijk A.A. Brosens, G. Johan A. Offerhaus, F. M. G. Hereditary Colorectal Cancer: Genetics and Screening. **95**, 1067–1080 (2015).
23. Lynch, H. T. & Chapelle, A. de la. Hereditary Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **348**, 919–932 (2003).
24. Guyton & Hall. Tratado de Fisiología médica. Hall, J (2011).
25. Preston, S. L. *et al.* Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: Origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res.* **63**, 3819–3825 (2003).
26. Flemer, B. *et al.* Tumour-associated and non-tumour-associated microbiota in colorectal cancer. *Gut* gutjnl-2015-309595 (2016). doi:10.1136/gutjnl-2015-309595
27. Van Engeland, M., Derks, S., Smits, K. M., Meijer, G. A. & Herman, J. G. Colorectal cancer epigenetics: Complex simplicity. *J. Clin. Oncol.* **29**, 1382–1391 (2011).
28. Vogelstein, B. *et al.* Genetic alterations during colorectal tumor development. *N. Engl. J. Med.* **319**, 525–532 (1988).
29. Markowitz, S. & Bertagnolli, M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2449–2460 (2009).
30. Fearon, E. R. & Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759–767 (1990).
31. Bowel Cancer (C18-C20 C21.8): 2009-2013. *cruk.org/cancerstats* 2013 (2013).
32. Fontana, E., Homicsko, K., Eason, K. & Sadanandam, A. Molecular Classification of

- Colon Cancer: Perspectives for Personalized Adjuvant Therapy. *Curr. Colorectal Cancer Rep.* **12**, 296–302 (2016).
33. Phipps, A. I. *et al.* Colon and rectal cancer survival by tumor location and microsatellite instability: the Colon Cancer Family Registry. *Dis. Colon Rectum* **56**, 937–44 (2013).
  34. Ishihara, S. *et al.* Impact of Primary Tumor Location on Postoperative Recurrence and Subsequent Prognosis in Nonmetastatic Colon Cancers. *Ann. Surg.* **XX**, 1 (2017).
  35. Armstrong, D. *et al.* Predictors of Pathologic Complete Response after Neoadjuvant Treatment for Rectal Cancer: A Multicenter Study. *Clin. Colorectal Cancer* **14**, 291–295 (2015).
  36. Lim, S. B. *et al.* Prognostic significance of lymphovascular invasion in sporadic colorectal cancer. *Dis. Colon Rectum* **53**, 377–384 (2010).
  37. Rajagopalan, H. *et al.* Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* **418**, 934 (2002).
  38. Deng, G. *et al.* BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic Colorectal Cancer with Methylated hMLH1 , But Not in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer BRAF Mutation Is Frequently Present in Sporadic Colorectal Cancer with Methylated hMLH1 , But Not in Hereditary. *Clin. Cancer Res.* **10**, 191–195 (2004).
  39. Pagès, F., Galon, J. & Fridman, W. H. The essential role of the in situ immune reaction in human colorectal cancer. *J. Leukoc. Biol.* **84**, 981–7 (2008).
  40. Mitry, E. *et al.* Epidemiology, management and prognosis of colorectal cancer with lung metastases: a 30-year population-based study. *Gut* **59**, 1383–8 (2010).
  41. Hugen, N., Van de Velde, C. J. H., De Wilt, J. H. W. & Nagtegaal, I. D. Metastatic pattern in colorectal cancer is strongly influenced by histological subtype. *Ann. Oncol.* **25**, 651–657 (2014).
  42. Riihimäki, M., Hemminki, A., Sundquist, J. & Hemminki, K. Patterns of metastasis in colon and rectal cancer. *Sci. Rep.* **6**, 29765 (2016).
  43. Benson, A. B. *et al.* American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J. Clin. Oncol.* **22**, 3408–3419 (2004).
  44. Sauer, R. *et al.* Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1731–1740 (2004).
  45. Smith, J. D. *et al.* Nonoperative Management of Rectal Cancer With Complete Clinical Response After Neoadjuvant Therapy. *Ann Surg* **256**, 965–972 (2012).
  46. Garcia-Aguilar, J. *et al.* Effect of adding mFOLFOX6 after neoadjuvant chemoradiation in locally advanced rectal cancer: A multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* **16**, 957–966 (2015).

47. Eichholz, A., Merchant, S. & Gaya, A. M. Anti-angiogenesis therapies: Their potential in cancer management. *Onco. Targets. Ther.* **3**, 69–82 (2010).
48. Ferrara, N., Gerber, H. P. & LeCouter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**, 669–676 (2003).
49. Ellis, L. M. Mechanisms of Action of Bevacizumab as a Component of Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Semin. Oncol.* **33**, (2006).
50. Casalini, P., Iorio, M. V., Galmozzi, E. & Ménard, S. Role of HER receptors family in development and differentiation. *J. Cell. Physiol.* **200**, 343–350 (2004).
51. Cohen, S. J., Cohen, R. B. & Meropol, N. J. Targeting Signal Transduction Pathways in Colorectal Cancer – More Than Skin Deep. *J. Clin. Oncol.* **23**, 5374–5385 (2005).
52. Spano, J. *et al.* Impact of EGFR expression on colorectal cancer patient prognosis and survival. *Ann. Oncol.* **16**, 102–108 (2005).
53. Li, S. *et al.* Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* **7**, 301–311 (2005).
54. Saltz, L., Easley, C. & Kirkpatrick, P. Panitumumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 987–988 (2006).
55. Moriarity, A., OSullivan, J., Kennedy, J., Mehigan, B. & McCormick, P. Current targeted therapies in the treatment of advanced colorectal cancer: a review. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **8**, 276–293 (2016).
56. Vincent, J. *et al.* 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* **70**, 3052–61 (2010).
57. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. the B7 Family Revisited. *Dx.Doi.Org* **23**, 515–548 (2004).
58. Pardoll, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 252–64 (2012).
59. de Vries, N. L., Swets, M., Vahrmeijer, A. L., Hokland, M. & Kuppen, P. J. K. The immunogenicity of colorectal cancer in relation to tumor development and treatment. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
60. Le, D. T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **372**, 2509–2520 (2015).
61. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
62. van der Burg, S. H., Arens, R., Ossendorp, F., van Hall, T. & Melief, C. J. M.

- Vaccines for established cancer: overcoming the challenges posed by immune evasion. *Nat Rev Cancer* **16**, 219–233 (2016).
63. Sun, J. C. & Lanier, L. L. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8<sup>+</sup> T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 645–57 (2011).
  64. Domaica, C. I. *et al.* Human natural killer cell maturation defect supports in vivo CD56(bright) to CD56(dim) lineage development. *PLoS One* **7**, e51677 (2012).
  65. Eissens, D. N. *et al.* Defining early human NK cell developmental stages in primary and secondary lymphoid tissues. *PLoS One* **7**, e30930 (2012).
  66. Béziat, V., Descours, B., Parizot, C., Debré, P. & Vieillard, V. NK cell terminal differentiation: correlated stepwise decrease of NKG2A and acquisition of KIRs. *PLoS One* **5**, e11966 (2010).
  67. Colucci, F., Caligiuri, M. a & Di Santo, J. P. What does it take to make a natural killer? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 413–25 (2003).
  68. Romee, R. *et al.* Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* **120**, 4751–4760 (2012).
  69. Kwon, H.-J., Kim, N. & Kim, H. S. Molecular checkpoints controlling natural killer cell activation and their modulation for cancer immunotherapy. *Exp. Mol. Med.* **49**, e311 (2017).
  70. Lanier, L. L. NK cell recognition. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 225–74 (2005).
  71. Fainboim, L. Geffner, J. *Introducción a la inmunología humana.* (2011).
  72. Lanier, L. L. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**, 495–502 (2008).
  73. Moretta, A. *et al.* RECEPTORS FOR HLA CLASS-I MOLECULES IN HUMAN NATURAL KILLER CELLS. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 619–48 (1996).
  74. Rajalingam, R. Human diversity of killer cell immunoglobulin. **46**, 216–228 (2011).
  75. Petrie, E. J. *et al.* CD94-NKG2A recognition of human leukocyte antigen (HLA)-E bound to an HLA class I leader sequence. *J. Exp. Med.* **205**, 725–35 (2008).
  76. Gonen-Gross, T. *et al.* The CD85J/Leukocyte Inhibitory Receptor-1 Distinguishes between Conformed and 2-Microglobulin-Free HLA-G Molecules. *J. Immunol.* **175**, 4866–4874 (2005).
  77. Montaldo, E. *et al.* Human NK cells at early stages of differentiation produce CXCL8 and express CD161 molecule that functions as an activating receptor. *Blood* **119**, 3987–96 (2012).
  78. Poggi A, Costa P, Tomasello E, M. L. IL-12-induced up-regulation of NKRP1A

- expression in human NK cells and consequent NKRP1A-mediated down-regulation of NK cell activation. *Eur J Immunol.* **28**, 1611–6. (1998).
79. Poggi, A. *et al.* Expression of human NKRP1A by CD34<sup>+</sup> immature thymocytes : NKRP1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1266–1272 (1996).
  80. Llibre, A. *et al.* Expression of lectin-like transcript-1 in human tissues. *F1000Research* **5**, 1–15 (2016).
  81. Leibson, P. J. & Holmes, S. Signal Transduction during Natural Killer Cell Activation : Inside the Mind of a Killer. **6**, 655–661 (1997).
  82. Waldhauer, I. & Steinle, a. NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* **27**, 5932–43 (2008).
  83. Kaiser BK, *et al.* Interactions between NKG2x immunoreceptors and HLA-E ligands display overlapping affinities and thermodynamics. *J Immunol* **174**, 2878–2884 (2005).
  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.* **101**, 10116–10121 (2004).
  85. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2375–80 (1998).
  86. Ndhlovu LC, Lopez-Vergès S, Barbour JD, Jones RB, Jha AR, Long BR, Schoeffler EC, Fujita T, Nixon DF, L. L. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* **119**, 3734–43. (2012).
  87. Lopez-Vergès S, Milush JM, Pandey S, York VA, Arakawa-Hoyt J, Pircher H, Norris PJ, Nixon DF, L. L. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* **116**, 3865–74 (2010).
  88. Stanietsky, N. & Mandelboim, O. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Lett.* **584**, 4895–900 (2010).
  89. Levy, E. M., Roberti, M. P. & Mordoh, J. Natural killer cells in human cancer: from biological functions to clinical applications. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**, 676198 (2011).
  90. Bhat, R. & Watzl, C. Serial Killing of Tumor Cells by Human Natural Killer Cells - Enhancement by Therapeutic Antibodies. *PLoS One* **2**, e326 (2007).
  91. Vanherberghen, B. *et al.* Classification of human natural killer cells based on migration behavior and cytotoxic response. *Blood* **121**, 1326–34 (2013).
  92. Long, E. O. Ready for Prime Time : NK Cell Priming by Dendritic Cells. *Immunity* **26**, 385–7 (2007).

93. Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. & Vivier, E. Review article Natural-killer cells and dendritic cells : ' 1 ' union fait la force '. *Blood* **106**, 2252–2259 (2017).
94. Sutlu, T. & Alici, E. Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J. Intern. Med.* **266**, 154–81 (2009).
95. Ahmed, M. Ben *et al.* IL-15 Renders Conventional Lymphocytes Resistant to Suppressive Functions of Regulatory T Cells through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway. *J. Immunol.* **182**, 6763–6770 (2017).
96. Stensgaard, K. *et al.* IL-21 induces in vivo immune activation of NK cells and CD8 + T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* (2008) **57**, 1439–1449 (2008).
97. Kohrt, H. E. *et al.* Combination strategies to enhance antitumor ADCC. *Futur. Med.* **4**, 511–527 (2012).
98. Corral, L. G. & Kaplan, G. Immunomodulation by thalidomide and thalidomide analogues. **58**, 107–113 (1999).
99. Hsu, A. K. *et al.* The immunostimulatory effect of lenalidomide on NK-cell function is profoundly inhibited by concurrent dexamethasone therapy. *Blood* **117**, 1605–13 (2011).
100. Hallett, W. H. D. *et al.* Sensitization of Tumor Cells to NK Cell-Mediated Killing by Proteasome Inhibition. *J. Immunol.* **180**, 163–170 (2017).
101. Mentlik James, A., Cohen, A. D. & Campbell, K. S. Combination immune therapies to enhance anti-tumor responses by NK cells. *Front. Immunol.* **4**, 481 (2013).
102. Kuroki, M. *et al.* Re-targeting of cytotoxic T lymphocytes and/or natural killer cells to CEA-expressing tumor cells with anti-CEA antibody activity. *Anticancer Res.* **25**, 3725–3732 (2005).
103. Terry L Riss, Richard A Moravec, Andrew L Niles, Sarah Duellman, Hélène A Benink, Tracy J Worzella, L. M. Cell Viability Assays. *Methods in Molecular Biology* (2016). doi:10.1007/978-1-61779-108-6
104. Uhrberg, M. The CD107 mobilization assay : viable isolation and immunotherapeutic potential of tumor-cytolytic NK cells. *Leukemia* 707–709 (2005). doi:10.1038/sj.leu.2403705
105. Fischel, J. L. *et al.* Impact of the oxaliplatin-5 fluorouracil-folinic acid combination on respective intracellular determinants of drug activity. *Br. J. Cancer* **86**, 1162–8 (2002).
106. Casale, F. *et al.* Plasma concentrations of 5-fluorouracil and its metabolites in colon cancer patients. *Pharmacol. Res.* **50**, 173–9 (2004).
107. Zhu, J., Wang, X., Xu, X. & Abassi, Y. A. Dynamic and label-free monitoring of

- natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J. Immunol. Methods* **309**, 25–33 (2006).
108. Halama, N. *et al.* Natural killer cells are scarce in colorectal carcinoma tissue despite high levels of chemokines and cytokines. *Clin. Cancer Res.* **17**, 678–89 (2011).
  109. Angelo, L. S. *et al.* Practical NK cell phenotyping and variability in healthy adults. *Immunol. Res.* **62**, 341–356 (2015).
  110. 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.* **189**, 787–95 (1999).
  111. Rudnicka, K., Matusiak, A. & Chmiela, M. CD25 (IL-2R) expression correlates with the target cell induced cytotoxic activity and cytokine secretion in human natural killer cells. *Acta Biochim Pol* **62**, 885–894 (2015).
  112. Vo, A. Van, Takenaka, E., Shibuya, A. & Shibuya, K. Expression of DNAM-1 (CD226) on inflammatory monocytes. *Mol. Immunol.* **69**, 70–76 (2016).
  113. Kraus, A. K. *et al.* The role of T cell costimulation via DNAM-1 in kidney transplantation. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
  114. Iraolagoitia, X. L. R. *et al.* NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells. *J. Immunol.* **197**, 953–961 (2016).
  115. Le Garff-Tavernier, M. *et al.* Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* **9**, 527–35 (2010).
  116. Hassan, S. S., Akram, M., King, E. C., Dockrell, H. M. & Cliff, J. M. PD-1, PD-L1 and PD-L2 gene expression on t-cells and natural killer cells declines in conjunction with a reduction in PD-1 protein during the intensive phase of tuberculosis treatment. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
  117. LeMaoult, J., Zafaranloo, K., Le Danff, C. & Carosella, E. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J.* **23**, 1–23 (2005).
  118. Kochan, G., Escors, D., Breckpot, K. & Guerrero-Setas, D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology* **2**, e26491 (2013).
  119. Zeestraten, E. C. M. *et al.* Combined analysis of HLA class I, HLA-E and HLA-G predicts prognosis in colon cancer patients. *Br. J. Cancer* **110**, 459–468 (2014).
  120. Zhu, S. *et al.* Transcription of the activating receptor NKG2D in natural killer cells is regulated by STAT3 tyrosine phosphorylation. *Blood* **124**, 403–411 (2014).
  121. Amarante-Mendes, G. P. & Griffith, T. S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond. *Pharmacol. Ther.* **155**, 117–131 (2015).

122. De Maria, A., Bozzano, F., Cantoni, C. & Moretta, L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56dimCD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN- on activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 728–732 (2011).
123. Guillerey, C., Huntington, N. D. & Smyth, M. J. Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy. *Nat. Immunol.* **17**, (2016).
124. Crome, S. Q. *et al.* A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells. *Nat. Med.* **23**, 368–375 (2017).
125. Oppenheim, D. E. *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat. Immunol.* **6**, 928–937 (2005).
126. Chijioke, O. & Münz, C. Dendritic cell derived cytokines in human natural killer cell differentiation and activation. *Front. Immunol.* **4**, 1–7 (2013).
127. Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G. & Rodeck, U. Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol* **155**, 1066–1073 (1995).
128. Vahne, G., Becker, S., Brodin, P. & Johansson, M. H. IFN-g production and degranulation are differentially regulated in response to stimulation in murine natural killer cells. *Scand. J. Immunol.* **67**, 1–11 (2008).
129. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
130. Malladi, S. *et al.* Metastatic Latency and Immune Evasion Through Autocrine Inhibition of WNT. *Cell* **165**, 45–60 (2016).
131. Roberti, M. P. *et al.* Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. *Eur. J. Immunol.* **45**, 1560–1569 (2015).
132. Mamessier, E. *et al.* Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets. *J Immunol* **190**, 2424–2436 (2013).
133. Fregni, G. *et al.* Phenotypic and functional characteristics of blood natural killer cells from melanoma patients at different clinical stages. *PLoS One* **8**, e76928 (2013).
134. Watanabe, M. *et al.* NK cell dysfunction with down-regulated CD16 and up-regulated CD56 molecules in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Dis. Esophagus* **23**, 675–681 (2010).
135. Mamessier, E. *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumour immunity. *Jnci* **121**, 3609–3622 (2011).
136. Evans, J. H. *et al.* A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *Eur. J. Immunol.* **41**, 1924–1933 (2011).



137. Kim, M. *et al.* Herpes Simplex Virus Antigens Directly Activate NK Cells via TLR2, Thus Facilitating Their Presentation to CD4 T Lymphocytes. *J. Immunol.* **188**, 4158–4170 (2012).
138. Peng, Y.-P. *et al.* Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer. *J. Transl. Med.* **11**, 262 (2013).
139. Fuchshuber, P. & Lotzová, E. Differential oncolytic effect of NK. *Lymphokine Cytokine Res.* **11**, 271–276 (1992).
140. Moretta, A. *et al.* Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197–223 (2001).
141. Jewett A, T. H. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J Cancer* **2**, 443–57 (2011).
142. Seeger, P., Musso, T. & Sozzani, S. The TGF- $\beta$  superfamily in dendritic cell biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* **26**, 647–657 (2015).
143. Wilson, E. B. *et al.* Human tumour immune evasion via TGF- $\beta$  blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS One* **6**, e22842 (2011).
144. Gandhi, A. K. *et al.* Immunomodulatory agents lenalidomide and pomalidomide co-stimulate T cells by inducing degradation of T cell repressors Ikaros and Aiolos via modulation of the E3 ubiquitin ligase complex CRL4CRBN. *Br. J. Haematol.* **164**, 811–821 (2014).
145. Lee, S. C., Srivastava, R. M., López-Albaitero, A., Ferrone, S. & Ferris, R. L. Natural killer (NK): dendritic cell (DC) cross talk induced by therapeutic monoclonal antibody triggers tumor antigen-specific T cell immunity. *Immunol. Res.* **50**, 248–54 (2011).
146. Correale, P. *et al.* Cetuximab  $\pm$  chemotherapy enhances dendritic cell-mediated phagocytosis of colon cancer cells and ignites a highly efficient colon cancer antigen-specific cytotoxic T-cell response in vitro. *Int. J. Cancer* **130**, 1577–1589 (2012).
147. NCT02507154. Phase I/II Study of Expanded, Activated Autologous Natural Killer Cell Infusions with Cetuximab for Patients with EGFR-Positive Nasopharyngeal Carcinoma or Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.
148. NCT00625729. MT2007-12 Allogeneic Natural Killer Cells with Rituximab in Patients with CD20 Positive Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma or Chronic Lymphocytic Leukemia. Strategies to Increase Sensitivity of CLL Tumor Cells to Natural Killer Cell-Immune-Mediate.

149. Yokota, T. Are KRAS/BRAF Mutations Potent Prognostic and/or Predictive Biomarkers in Colorectal Cancers? *Anticancer. Agents Med. Chem.* **12**, 163–171 (2012).
150. Sandham, J. D. *et al.* K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **359**, 1757–65. (2005).
151. De Roock, W., Jonker, D. J., Nicolantonio, F. Di, Sartore-bianchi, A. & Simes, J. Association of KRAS p . G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Am. Med. Assoc.* **304**, 1812–1820 (2010).
152. Festino, L. *et al.* Cancer Treatment with Anti-PD-1/PD-L1 Agents: Is PD-L1 Expression a Biomarker for Patient Selection? *Drugs* **76**, 925–945 (2016).
153. Sehdev, A.; Cramer, H.; Ibrahim, A.; Younger, A.; O'Neil, B. Pathological complete response. *Discov Med.* **21**, 341–7. (2016).
154. Lynch, D. & Murphy, A. The emerging role of immunotherapy in colorectal cancer. *Ann. Transl. Med.* **4**, 305–305 (2016).
155. Tesniere, a *et al.* Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene* **29**, 482–491 (2010).
156. Roberti, M. P. *et al.* Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade. *Eur. J. Immunol.* **45**, (2015).
157. Hou, S., Zheng, X., Wei, H., Tian, Z. & Sun, R. Recombinant soluble CD226 protein directly inhibits cancer cell proliferation in vitro. *Int. Immunopharmacol.* **19**, 119–126 (2014).