

Tesis Doctoral

Restitución de la inmunidad antitumoral a partir de la generación de anticuerpos contra MICA

Torres, Nicolás Ignacio

2019

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Torres, Nicolás Ignacio. (2019). Restitución de la inmunidad antitumoral a partir de la generación de anticuerpos contra MICA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6675_Torres

Cita tipo Chicago:

Torres, Nicolás Ignacio. "Restitución de la inmunidad antitumoral a partir de la generación de anticuerpos contra MICA". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2019. https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6675_Torres

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Restitución de la inmunidad antitumoral a partir de la generación de anticuerpos contra MICA

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

Nicolás Ignacio Torres

Director de tesis: Dr. Norberto Zwirner

Consejero de Estudios: Dr. Marcelo Rubinstein

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental, IBYME-CONICET

Buenos Aires, 2019

Fecha de defensa: 6 de mayo de 2019.

RESUMEN

Restitución de la Inmunidad Antitumoral a Partir de la Generación de Anticuerpos contra MICA

Vencer el escape inmune del tumor y erradicar los tumores y metástasis constituye un desafío en inmuno-oncología. Las células T CD8⁺ citotóxicas y las citotóxicas naturales (células NK) son jugadores importantes en la inmunidad tumoral. Ambas poblaciones expresan NKG2D, un receptor activador que reconoce ligandos tales como la proteína MICA (*MHC class I chain-related protein A*), expresada principalmente en células tumorales lo que promueve su destrucción. Sin embargo, los tumores pueden secretar el ectodominio de MICA como molécula soluble (sMICA), lo que favorece el escape inmune del tumor.

En este contexto, razonamos que anticuerpos (Ac) anti-MICA podrían promover la restauración de la inmunidad tumoral a través de la estimulación de la CCDA y la depuración de sMICA por formación de complejos inmunes. Para producir dichos Ac, generamos una proteína quimérica altamente inmunogénica (BLS-MICA) que consiste en el ectodominio de MICA fusionado a la lumazina sintasa de *Brucella spp.* (BLS). BLS-MICA se empleó para inmunizar ratones sanos y/o portadores de tumores para investigar el efecto de los Ac anti-MICA sobre la inmunidad tumoral.

Los ratones inmunizados con BLS-MICA y desafiados con tumores que expresan MICA (el linfoma EL-4 modificado para expresar MICA) mostraron un retraso significativo en el crecimiento tumoral en comparación con los ratones control (inmunizados con BLS y desafiados con tumores control o que expresan MICA). Mientras tanto, la administración pasiva de Ac anti-MICA generados en ratones sanos a ratones portadores del linfoma EL-4 o células tumorales de vejiga MB49 modificadas para expresar MICA indujo una regresión significativa del crecimiento tumoral. Además, el infiltrado de células inmunitarias intratumorales en el modelo MB49 mostró que los ratones tratados con Ac anti-MICA mostraron mayor número de macrófagos con fenotipo M1/proinflamatorio, acompañados de un mayor porcentaje de células T CD8⁺ con experiencia antigénica. Asimismo, demostramos que los Ac anti-MICA fueron capaces de mediar, *in vitro*, CCDA contra tumores MICA⁺. Por otra parte, la pre-incubación de las células tumorales MICA⁺ con Ac anti-MICA y su posterior inoculación en ratones sanos mostró que estos Ac promueven la eliminación de los tumores.

Utilizando un ensayo diseñado en nuestro laboratorio para medir sMICA, encontramos en los ratones con tumores MICA⁺ inmunizados con BLS-MICA niveles de sMICA significativamente más bajos que en los ratones inmunizados con BLS. Asimismo, también encontramos una correlación positiva significativa entre la concentración de sMICA en los sueros y el volumen tumoral, lo que pone en evidencia la importancia de los Ac anti-MICA como una terapia capaz de reducir los niveles de sMICA.

Nuestros resultados indican que los Ac anti-MICA pueden restablecer la inmunidad antitumoral y que la proteína quimérica BLS-MICA constituye un inmunógeno prometedor para los pacientes con cáncer.

Palabras clave: MICA, BLS, Células NK, Inmunología Tumoral, NKG2D

ABSTRACT

Restitution of antitumor immunity through the generation of antibodies against MICA

To overcome tumor immune escape and eradicate established tumors and metastases constitutes a challenge in immuno-oncology. Natural killer (NK) and cytotoxic CD8⁺ T cells are major players during tumor immunity. Both express NKG2D, an activating receptor that recognizes ligands such as MICA (MHC class I chain-related protein A) expressed mostly on tumor cells. Although MICA promotes tumor cell destruction under certain circumstances, tumors can shed the ectodomain of MICA as soluble molecule (sMICA), which mediates tumor immune escape.

In this context, we reasoned that anti-MICA antibodies (Ab) may promote restoration of tumor immunity through the stimulation of Ab-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and scavenging of sMICA through the formation of immune complexes. To produce such Ab, we generated a highly immunogenic chimeric protein (BLS-MICA) consisting of the ectodomain of MICA fused to the protein lumazine synthase from *Brucella spp.* (BLS). BLS-MICA was used to immunize healthy and tumor-bearing mice to investigate if anti-MICA Ab can reinstate tumor immunity.

Mice immunized with BLS-MICA and challenged with MICA-expressing tumors displayed a significant delay in tumor growth compared to control mice (immunized with BLS and challenged with control or MICA-expressing tumors). In addition, passive administration of anti-MICA Ab to mice carrying EL-4 lymphoma or MB49 bladder tumor cells engineered to express MICA induced significant tumor regression. Also, the tumor immune cell infiltrate in the MB49 model showed that mice treated with anti-MICA Ab displayed higher intratumoral macrophages skewed to a M1/proinflammatory phenotype, accompanied by a higher percentage of antigen-experienced CD8⁺ T cells than mice that received control Ab. Moreover, anti-MICA Ab triggered CCDA *in vitro* against MICA⁺ tumors, while injection of MICA⁺ tumor cells preincubated with anti-MICA Ab in naïve mice resulted in a complete protection. Using an assay developed in our laboratory to measure sMICA, we observed that mice with MICA⁺ tumors immunized with BLS-MICA had significantly lower levels of sMICA than mice immunized with BLS. Likewise, we found a significant positive correlation between the

amounts of sMICA in the sera of the mice and the tumor volume, highlighting the importance of a therapy capable of reducing sMICA levels through the induction of anti-MICA Ab.

Our results indicate that anti-MICA Ab can reinstate antitumor immunity and that the chimeric protein BLS-MICA constitutes a promising therapeutic approach for cancer patients.

Keywords: MICA, BLS, NK cells, Tumor immunology, NKG2D

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis el Dr. Norberto Zwirner por dirigirme y formarme durante mi estadía en el Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata, por haber conseguido con mucho esfuerzo todo lo necesario para la realización de este trabajo, por fomentar las colaboraciones con otros grupos de investigación, los viajes a congresos nacionales e internacionales y por corregirme incansablemente este manuscrito.

Al Dr. Gabriel Rabinovich a quien durante la licenciatura seguí como Científico, pero primero conocí como Persona. Con su enorme generosidad me permitió usar reactivos, equipamiento, espacios en el bioterio y animales como si fuera parte de su laboratorio sin pedirme nada a cambio e incluso casi sin conocerme. Luego lo conocí como Profesor en las entrañables clases de Inmunoquímica donde despertó mi pasión por la inmunología. Finalmente, ahora lo conozco como Director y además de ser una fuente de inspiración científica debo agradecerle Gaby por tu amistad, por emocionarme nuevamente con gigantes proyectos y por dejarme continuar mi formación en tu increíble grupo. Espero ahora poder devolverte algo de todo lo que vos me diste.

A la Dra. Monica Wachsman, con quien realicé la Tesis de Licenciatura y una larga estadía en el Laboratorio de Virología del entonces llamado Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales entre el 2008 y el 2013. Cuando llegue al laboratorio de Mónica no sabía ni agarrar una pipeta. Ahora más o menos sé y en un 90% se lo debo a ella. Móni me presentó a cuanta Beca encontramos, me consiguió decenas de colaboraciones, me mando a innumerables congresos, acá y afuera y pipeteó por mi cuando yo estaba dando los últimos finales de la carrera. Gracias Moni porque por las publicaciones que conseguimos juntos siempre mi camino fue un poco más fácil.

A Vivi y Luis, que me codirigían –de palabra- y siempre me ayudaron. A Laura, Nelly y Elsa que siempre colaboraron durante mi estadía en su laboratorio. A todo el grupo de Virología y al laboratorio de Síntesis Orgánica de la Dra. Galagovsky.

Al Laboratorio 308. A Damián con quien pipeteé los primeros experimentos. A Andre –la mejor purificadora de células dendríticas del mundo- y Xime –que me ayudo

a dar mis primeros pasos en el bioterio- con quienes compartí muchos días, noches y fines de semana trabajando juntos. A Sol, Jessi y Flor con quienes compartí el final de mi doctorado. A Caro y Mer por codirigir el laboratorio y participar intelectualmente de todos los experimentos. A Sherman por su amistad y que ahora a la distancia y a través de una pantalla me sigue acompañando.

Al Laboratorio 236. En especial a Santi quien me acercó al IBYME y es mi gran amigo. A todos por hacerme parte del laboratorio cuando aún no lo era y por toda la ayuda y consejos. Somos miles, imposible nombrarlos a todos, pero de los grandes en especial a Marian, Pela, Panza, Ada, Romi, Vlcky y Tuqui. De los chiquitos especialmente a Nicolino, Lucho, el Polaco, Flor y Verito. A JuanK, Mormon, Pablo, Rosa, Gastón y Sabri por el enorme trabajo que hacen. A la Fundación Sales que me apoya económicamente en este periodo de transición.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales donde me formé académicamente y conocí amigos entrañables.

A las Jurados que amablemente aceptaron leer y evaluar esta tesis con el tiempo que ello implica, mil gracias.

Al CONICET y al IBYME por el apoyo económico y el espacio físico para realizar mi trabajo de Tesis Doctoral, respectivamente. A los laboratorios del Dr. Fernando Goldbaum en FIL e INMUNOVA. A las instituciones y empresas nacionales e internacionales que financiaron este proyecto.

A mi Mama y a mi Papa, por criarme en una familia llena de amor y respeto. Por cuidarme tanto, por los juegos de química, por las enseñanzas y los valores, por el cariño en copiosas cantidades y por el apoyo en todas mis decisiones. A mi familia paterna y materna, a los que están y a los que ya no. A Sofía, mi hermana, que llevo 23 años después que yo y que amo con locura. A mis papas postizos Edu y Cris, a mis cuñados Cami y Agus que me hicieron tío de Goyo, a Fideo por quererme -aunque haya nacido con dos pies izquierdos- a mi madrina y cuñada Juani, a la abuela Marta, al tío Claudio y al tío David. A mis hijos peludos y de nariz húmeda Canela y Zucchini que tanto amo y tanto me hacen renegar (si alguien quiere dos perros salchicha ya criados y está leyendo esto, que se contacte conmigo).

A mis hermanos postizos, que como es mi Tesis voy a mencionar por sus apodos (contra la voluntad de mi mujer): Pancho, Marito, Mati y Dario. A Ñato, Bebu, Cebolla, Pela, Chaparrito, Hanson, a mi padrino el Viejo, a Bata, a Batman, a Brucie,

al Celoso, al Doc, al Fiscal, a Flequillo, a Gustavo cremas, al Loco de la Grúa, a Gimenez Nenash, a Zopi, al Radiólogo, a Emi, al Bañero, a Norris, a Seba el lindo, a Pataditas, a Pepino, a Pilates, a Zopi, al Tomógrafo, a BigMax, a Javito, a Mestre Rati, Mestre Pichon y Mestre Gus.

Por último, a mi esposa y amor de mi vida, Guada. Por apoyarme como nadie, por cuidarme y siempre potenciarme. Por construir conmigo un hogar y por compartir juntos todos nuestros sueños. Por todas nuestras aventuras y locuras, acá y en el mundo. Por ser mi nueva familia. Por ser uno y por planear ser más de dos.

TRABAJOS PUBLICADOS

Los siguientes trabajos fueron presentados durante el transcurso de esta Tesis Doctoral en revistas internacionales con referato:

- Torres NI, Noll KS, Xu S, Li J, Huang Q, Sinko PJ, Wachsman MB and Chikindas ML. **Safety, formulation, and in vitro antiviral activity of the antimicrobial peptide subtilisin against herpes simplex virus type 1.** *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2013. 5 (1): 26-35.
 - Ruiz Martinez RC, Wachsman MB, Torres NI, Todorov SD and Gombossy de Melo Franco BD. **Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum ST71KS.** *Food Microbiology* 2013. 34 (2): 376–381.
 - Quintana VM, Torres NI, Wachsman MB, Sinko PJ, Castilla V and Chikindas ML. **Anti - herpes simplex virus type 2 activity of the antimicrobial peptide subtilisin.** *Journal of Applied Microbiology* 2014. 117: 1253-1259.
 - Ziblat A, Domaica CI, Spallanzani RG, Raffo Iraolagoitia XL, Rossi LE, Avila DE, Torres NI, Fuertes MB, and Zwirner NW. **IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes for IL-18 responsiveness.** *European Journal of Immunology* 2015. 45 (1): 192–202.
 - Torres NI*, Spallanzani RG*, Avila DE*, Ziblat A, Raffo Iraolagoitia XL, Rossi LE, Domaica CI, Fuertes MB, Rabinovich GA and Zwirner NW. **Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN- γ Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I– Specific Inhibitory Receptors.** *The Journal of Immunology* 2015. 195 (5): 2141-2148.
- * NIT, RGS y DEA comparten la primera autoría.
- Zanetti SR, Ziblat A, Torres NI, Zwirner NW, and Bouzat C. **Expression and Functional Role of $\alpha 7$ Nicotinic Receptor in Human Cytokine-Stimulated NK Cells.** *Journal of Biological Chemistry* 2016. 291 (32): 16541-16552.

- Raffo Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI, Araya RE, Ziblat A, Domaica CI, Sierra JM, Núñez SY, Secchiari F, Gajewski TF, Zwirner NW and Fuertes MB. **NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells.** *The Journal of Immunology* 2016. 197 (3): 953-61
- Ziblat A, Núñez SY, Raffo Iraolagoitia XL, Spallanzani RG, Torres NI, Sierra JM, Secchiari F, Domaica CI, Fuertes MB, Zwirner NW. **Interleukin (IL)-23 Stimulates IFN-gamma Secretion by CD56(bright) Natural Killer Cells and Enhances IL-18-Driven Dendritic Cells Activation.** *Frontiers in Immunology* 2017. DOI 10.1007/s00066-018-1292-4.
- Núñez SY, Ziblat A, Secchiari F, Torres NI, Sierra JM, Raffo Iraolagoitia XL, Araya RE, Domaica CI, Fuertes MB, Zwirner NW. **Human M2 Macrophages Limit NK Cell Effector Functions through Secretion of TGF-beta and Engagement of CD85j.** *Journal of Immunology* 2018. 200 (3): 1008-1015.
- Stival C, Ritagliati C, Xu X, Gervasi MG, Luque GM, Baro Graf C, Vega-Beltran JL, Torres NI, Darszon A, Krapf D, Buffone MG, Visconti PE, Krapf D. **Disruption of protein kinase A localization induces acrosomal exocytosis in capacitated mouse sperm.** *Journal of Biological Chemistry* 2018. 293(24):9435-9447.
- Puga Molina LC, Pinto NA, Torres NI, Gonzalez-Cota AL, Luque GM, Romarowski A, Krapf D, Santi C, Trevino CL, Darszon A, Buffone MG. **CFTR/ENaC dependent regulation of membrane potential during human sperm capacitation is initiated by bicarbonate uptake through NBC.** *Journal of Biological Chemistry* 2018. 293(25):9924-9936.
- **BLS-MICA CHIMERIC PROTEINS USEFUL IN RESTORATION OF ANTI-TUMOR IMMUNITY.** USPTO. Ref: P4462US00. N° US 62/619322. **Inventores:** Goldbaum FA, Zylberman V, Pardo RP, Hiriart Y, Lauche C, Zwirner NW, Torres NI. **Solicitante:** INMUNOVA S.A. / CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TÉCNICAS (CONICET)

ÍNDICE

<i>Resumen</i>	2
<i>ABSTRACT</i>	4
ÍNDICE	11
Antecedentes	13
<i>Células NK</i>	14
Generalidades	14
Subpoblaciones de células NK	15
Receptores involucrados en la actividad de células NK	17
<i>LT CD8⁺</i>	22
<i>Células dendríticas</i>	24
CDs en cáncer	25
<i>Macrófagos</i>	26
Macrófagos en cáncer	27
<i>Ligandos de NKG2D</i>	29
Polimorfismo	32
Expresión y modulación de MICA	32
NKG2DLs en tumores	33
<i>Enfermedades Neoplásicas</i>	35
¿Que es una neoplasia?	36
El rol del microambiente	37
<i>Inmunología tumoral: Teoría de las 3 E</i>	38
Mecanismos de escape tumoral	42
Modificación de la expresión de proteínas de superficie	42
Expansión y reclutamiento de células inmunosupresoras y liberación de factores solubles	43
<i>Inmunoterapias</i>	45
El eje NKG2D-NKG2DL como blanco de inmunoterapias	47
Materiales y Métodos	51
<i>Producción de la proteína recombinante BLS-MICA</i>	52
<i>Líneas celulares y condiciones de cultivo</i>	55
<i>Citometría de Flujo, anticuerpos y equipos</i>	55
<i>Ratones</i>	56
<i>Inmunización de ratones C57BL/6 con la proteína BLS-MICA</i>	57
<i>Producción de líneas celulares de ratón que expresan establemente MICA</i>	58
<i>Experimentos de desafío tumoral</i>	59
<i>ELISA</i>	61
<i>Ensayo de actividad metabólica MTS y proliferación y muerte celular</i>	62

<i>Aislamiento de células NK</i>	63
<i>Ensayo de citotoxicidad in vitro</i>	63
<i>Ensayo de citotoxicidad in vivo</i>	63
<i>Análisis de tumores in sílico</i>	64
<i>Modelado de BLS-MICA y predicción de propiedades</i>	64
<i>Análisis estadístico</i>	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
RESULTADOS	66
<i>Producción de la proteína quimérica BLS-MICA</i>	67
<i>Estructura de la proteína BLS-MICA</i>	67
<i>Inmunización de ratones C57BL/6 con la proteína BLS-MICA</i>	68
<i>Cinética de la expresión de NKG2D tras la administración de BLS-MICA.</i>	72
<i>Transducción de líneas celulares murinas con MICA</i>	73
<i>Efecto sobre el crecimiento tumoral de la inmunización activa con BLS-MICA.</i>	77
<i>Inmunizaciones profilácticas con BLS-MICA</i>	79
<i>Desarrollo de un kit de detección de sMICA</i>	81
<i>Efecto terapéutico de los anticuerpos αMICA en el crecimiento tumoral</i>	83
<i>Infiltrado tumoral</i>	86
<i>CCDA in vitro e in vivo</i>	88
Discusión	91
Conclusiones	100
Bibliografía	102

ANTECEDENTES

CÉLULAS NK

GENERALIDADES

Las células citotóxicas naturales (*Natural Killer* o NK por sus siglas en inglés) son actores fundamentales de la inmunidad innata que se destacan por constituir la principal fuente de interferón (IFN)- γ y por su capacidad de mediar citotoxicidad frente a ciertas células tumorales o células infectadas por virus [1-3]. Recientemente, se postuló el concepto de que las células NK pertenecen a una familia más amplia, designada como células linfoides innatas del grupo 1 (*Innate Lymphoid Cells*, ILCs por sus siglas en inglés) que además incluye a otras células llamadas ILC1. Las ILC1 son en gran medida células no citotóxicas capaces de producir IFN- γ y Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor*, TNF, por sus siglas en inglés) implicadas en la inmunidad contra bacterias y parásitos intracelulares. Por otro lado, las ILC2, otro grupo de células pertenecientes a las ILC, producen citoquinas asociadas a las células T colaboradoras de tipo 2 (*T helper 2*, o Th2 por sus siglas en inglés) promoviendo la inmunidad antihelminthos, la inflamación alérgica y la reparación de tejidos. Finalmente, las células del grupo ILC3 producen, según los estímulos que reciban, IL-17A, IL-17F, IL-22, Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor*, GM-CSF, por sus siglas en inglés) y TNF y pueden promover la inmunidad antibacteriana, la inflamación crónica y la reparación de tejidos [4].

A través de las citoquinas que las células NK secretan contribuyen a la generación de un perfilado de la inmunidad adaptativa hacia un tipo T colaborador 1 (*T helper 1* o Th1 por sus siglas en inglés) y citotóxico mediado por linfocitos T CD8⁺ (LT CD8⁺) [5, 6], más efectivo para la eliminación de tumores e infecciones virales [6, 7]. Además, las células NK pueden producir otros mediadores solubles tales como TNF y GM-CSF [8, 9]. Por otro lado, las células NK desempeñan un rol central en una red de diálogos cruzados regulatorios con diversas células entre las que se encuentran las células dendríticas (CDs), los macrófagos y las células T con el objeto de promover o restringir respuestas mediadas por el sistema inmune [10-16].

Las células NK constituyen la tercera población de células linfoides en sangre periférica en humanos, y se definen fenotípicamente como células que carecen de la

expresión de CD3 pero expresan CD56 en su superficie [17]. Por el contrario, las células NK de ratón carecen de la expresión de CD56 y se definen fenotípicamente como células $CD3^{-}CD49b^{+}$ (y/o alternatively como $CD3^{-}NK1.1^{+}$ en la cepa C57BL/6). En sangre periférica, las células NK murinas representan entre un 6 y 10% de las células linfoides. Una diferencia crítica que existe entre las células NK humanas y de ratón es el hecho de que en humanos, estas células se alojan en grandes cantidades en tejidos linfoides secundarios incluso en ausencia de procesos infecciosos periféricos o sistémicos, mientras que en ratones esta población celular es escasa en tejidos linfoides secundarios y es reclutada a estos sitios como consecuencia de la migración de CDs maduras a los órganos linfoides secundarios en respuesta a estímulos pro-inflamatorios en tejidos periféricos [18].

Las células NK se encuentran presentes en números normales en ratones deficientes en el gen activador de la recombinación 1 (*Recombination Activating Gene 1*, RAG-1 por sus siglas en inglés) o RAG-2 [19], lo cual llevó a pensar que estas enzimas son prescindibles para la ontogenia o generación de células NK, en contraposición con lo que sucede con linfocitos B y T [20]. Sin embargo, recientemente se encontró que aproximadamente el 40% de las células NK proviene de precursores en los cuales los genes RAG estuvieron activos y que esta expresión podría determinar distintos tipos de subpoblaciones de células [21]. Las células NK, al igual que las células B, T y las células de linaje mieloide, se desarrollan primariamente en médula ósea. Se ha demostrado que las células NK se generan a partir de precursores $CD34^{+}$ que se hallan presentes en médula ósea, hígado fetal o neonatal, bazo, ganglios linfáticos y timo [22]. Para su maduración requieren de varias citoquinas, entre las cuales la interleuquina (IL)-15 transpresentada por células estromales de médula ósea parece cumplir un papel central en la diferenciación hacia el linaje de células NK [21]. Otras citoquinas como IL-7, *Stem Cell Factor* (SCF por sus siglas en inglés) y el ligando de Flt3 (Flt3-L, por sus siglas en inglés) jugarían además un papel relevante durante las etapas tempranas de maduración [23].

SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS NK

Las células NK pueden clasificarse en diferentes subpoblaciones tanto en humanos como en ratones. Las células NK humanas se clasifican de acuerdo a los niveles de expresión de CD56 y CD16. La mayoría de las células NK circulantes presentan el fenotipo $CD56^{dim}CD16^{+}$, son capaces de mediar efectos citotóxicos contra

células blanco y producen citoquinas luego de su activación [24]. Por el contrario, las células CD56^{bright}CD16⁻, que constituyen la subpoblación predominante en órganos linfoides secundarios, pueden producir grandes cantidades de citoquinas, incluyendo IFN- γ , TNF y GM-CSF luego de la estimulación por citoquinas proinflamatorias pero presentan una baja capacidad citotóxica [24]. Se ha demostrado que las células CD56^{bright}CD16⁻ pueden diferenciarse en células CD56^{dim}CD16⁺ y estudios recientes demostraron que las células NK CD56^{dim}CD16⁺ pueden sufrir modificaciones posteriores en su diferenciación y en su función a lo largo del tiempo [25].

Por otro lado, las células NK de ratón comparten muchas características con las células NK humanas pero la falta de expresión de CD56 dificulta establecer poblaciones de células NK funcionalmente comparables en ratones. No obstante, las distintas poblaciones de células NK murinas pueden ser clasificadas en base a la expresión de principalmente CD27 y CD11b según se muestra en la **Figura 1** [26]. Las células NK maduras se identifican por la expresión de la integrina CD11b [27]. En experimentos de transferencia adoptiva, se ha observado que las células NK inmaduras atraviesan el estadio CD27⁺ antes de alcanzar el grado de diferenciación terminal CD27⁻CD11b⁺ [28]. De todos modos, las células NK CD27⁺ adquieren mayor función citotóxica, capacidad de proliferación y secreción de IFN- γ luego de un estímulo con IL-12 o IL-18 con respecto a las células NK CD27⁻. Por otra parte, las células NK CD27⁺CD11b⁺ expresan CXCR3, lo cual les confiere la capacidad de migrar hacia tejidos linfoides siguiendo el gradiente de las quimiocinas CXCL10 y CXCL11. Estas células se diferencian progresivamente hacia células NK CD11b⁺CD27⁻, las que conforman una subpoblación terminalmente diferenciada, de mayor vida media, que reside preferencialmente en órganos no linfoides. Algunos estudios sugieren además que, dentro de las células NK inmaduras (definidas como CD11b⁻CD27⁺) existe una subpoblación con funciones regulatorias, denominadas “células NK regulatorias” [29]. Se observó que estas células expresan moléculas que ejercen funciones inmunosupresoras tales como CTLA-4, Lag-3 y PD-L1, a través de las cuales modulan la respuesta inmune [15].

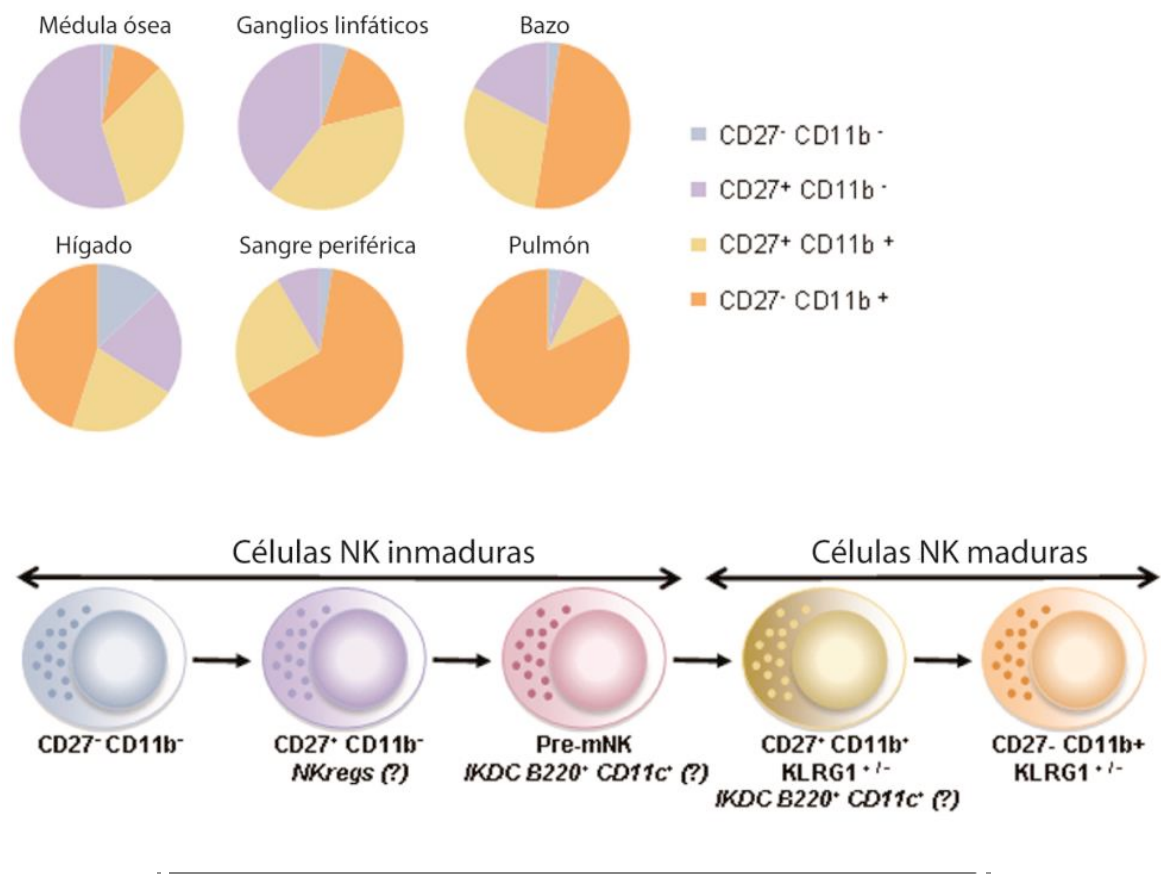


Figura 1. Estadíos madurativos de las células NK de ratón. Subpoblaciones de células NK de acuerdo con su estadio madurativo en ratón y su distribución en diferentes órganos. Modificado de [30].

RECEPTORES INVOLUCRADOS EN LA ACTIVIDAD DE CÉLULAS NK

Las células NK expresan una amplia variedad de receptores que les permiten reconocer sus blancos celulares y activarse también frente a estímulos solubles. Estos receptores pueden ser de distintos tipos e incluyen a receptores activadores, inhibitorios, de adhesión, de citoquinas y receptores de reconocimiento de patrones (RRP). La integración de todas estas señales determina si las células NK se activan o no [31].

Entre los receptores inhibitorios se encuentran aquellos que reconocen las moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Estos receptores y sus ligandos, las moléculas H-2 (histocompatibilidad-2) en ratones y los antígenos leucocitarios humanos (*Human Leukocyte Antigens*, HLA por sus siglas en inglés) están codificados por genes polimórficos [32, 33]. En condiciones de reposo,

las células NK se mantienen en un estado inactividad funcional debido a que estos receptores desencadenan señales inhibitorias [34]. Sin embargo, las células NK pueden reconocer células que disminuyeron la expresión de moléculas de clase I del CMH por transformación o infección viral, fenómeno al que se conoce como pérdida de lo propio (*missing self*). Entre los receptores inhibitorios específicos para moléculas de clase I del CMH se encuentran, en humanos, los receptores KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) y, en ratones, los homo-dímeros de la familia de las lectinas de tipo C Ly49 inhibitorios, como Ly49A y Ly49C, entre otros; y los heterodímeros CD94/NKG2A en ambas especies [35-37]. Cuando estos receptores reconocen sus ligandos, secuencias localizadas en sus colas citoplasmáticas denominadas *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif* (ITIMs por sus siglas en inglés) ponen en marcha cascadas de señalización intracelulares que promueven la inactivación de la célula NK [38]. Existen otros receptores inhibitorios tales como CD244 (2B4) y TIGIT que reconocen moléculas diferentes a las moléculas de clase I del CMH [39, 40].

Sin embargo, los mecanismos que regulan la activación de las células NKs son complejos e involucran procesos que ocurren durante su ontogenia. La expresión de moléculas de clase I del CMH en células blanco no gobierna exclusivamente la activación de las células NK y, de hecho, entre un 10 y un 20% de las células NK de sangre periférica no expresan los receptores KIR con especificidad hacia las moléculas de clase I del CMH de ese individuo [41]. Paradójicamente, estas células NK son hiporeactivas contra las células propias e, *in vitro*, son refractarias a la activación. Distintos modelos intentan explicar la activación de las células NK. Según el modelo de licenciamiento, durante la ontogenia de las células NK en la médula ósea, la expresión de receptores inhibitorios KIR permite que se desencadenen señales intracelulares cuando estos receptores reconocen a las moléculas de clase I del CMH en las células estromales. Esto promovería la maduración funcional de las células NK. Aquellos precursores de células NK que expresen receptores inhibitorios que no reconozcan eficientemente a moléculas de clase I del CMH propias no finalizarán su maduración funcional [42]. De acuerdo con el modelo de armado y desarme, durante la ontogenia de las células NK, la expresión de receptores inhibitorios que reconocen a moléculas de clase I del CMH promueve la expresión de receptores activadores, que luego son capaces de reconocer a sus ligandos sobre las células estromales de médula ósea, permitiendo el ajuste del umbral de activación de células NK para hacerla no reactiva contra las células propias completando su proceso de maduración. Los precursores de células NK que expresen receptores inhibitorios

que no reconozcan a las moléculas de clase I del CMH propias también expresarán receptores activadores que reconocerán los ligandos específicos sobre las células estromales. Consecuentemente, estas células sufrirán sobreestimulación que conducirá a la generación de células NK hiporespondedoras o anérgicas [43]. Según el modelo del reóstato, durante la ontogenia de las células NK, la capacidad de respuesta se ajusta permanentemente mediante una recepción continua de señales estimuladoras a través de distintos receptores activadores e inhibitorios [40, 44-46], de forma tal que la célula NK puede reajustar continuamente su umbral de activación con el objeto de mantenerse anérgica contra células normales propias [47, 48].

Los receptores activadores pueden detectar cambios en la expresión de moléculas propias que se encuentran en bajos niveles en condiciones basales pero cuya expresión se incrementa durante distintos estímulos que inducen estrés o en células que experimentan transformación tumoral (**Figura 2**). Uno de los receptores activadores más importantes y estudiados de células NK, que también se expresa en LT CD8⁺, es el receptor NKG2D o CD314 [49-52]. Se ha demostrado, en modelos *in vivo*, la relevancia de NKG2D en la inmunovigilancia contra tumores epiteliales y linfoides [53, 54]. Acerca de NKG2D y los ligandos de NKG2D (de ahora en más llamados NKG2DLs) hablaremos más adelante, pero es importante destacar que, en respuesta al daño al ADN, procesos de transformación e infecciones virales se produce un aumento en la expresión de NKG2DLs, los cuales estimulan a las células NK para que desarrollen funciones efectoras contra estas células [55, 56].

Además de NKG2D, las células NK expresan una amplia variedad de otros receptores activadores, entre los que se encuentran los receptores de citotoxicidad natural (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCRs por sus siglas en inglés), los cuales se encuentran involucrados en la activación de células NK frente a células tumorales. La familia de NCRs comprende a NKp46 (NCR1 o CD335) [57], NKp44 (NCR2 o CD336) [58] y NKp30 (NCR3 o CD337) [59]. Sin embargo, los ligandos de los NCRs no fueron completamente identificados a excepción de algunos pocos [60, 61] e incluso dependiendo del contexto los NCRs pueden tener efectos activadores o inhibitorios [12], dificultando la comprensión de su rol en la inmunovigilancia tumoral [62].

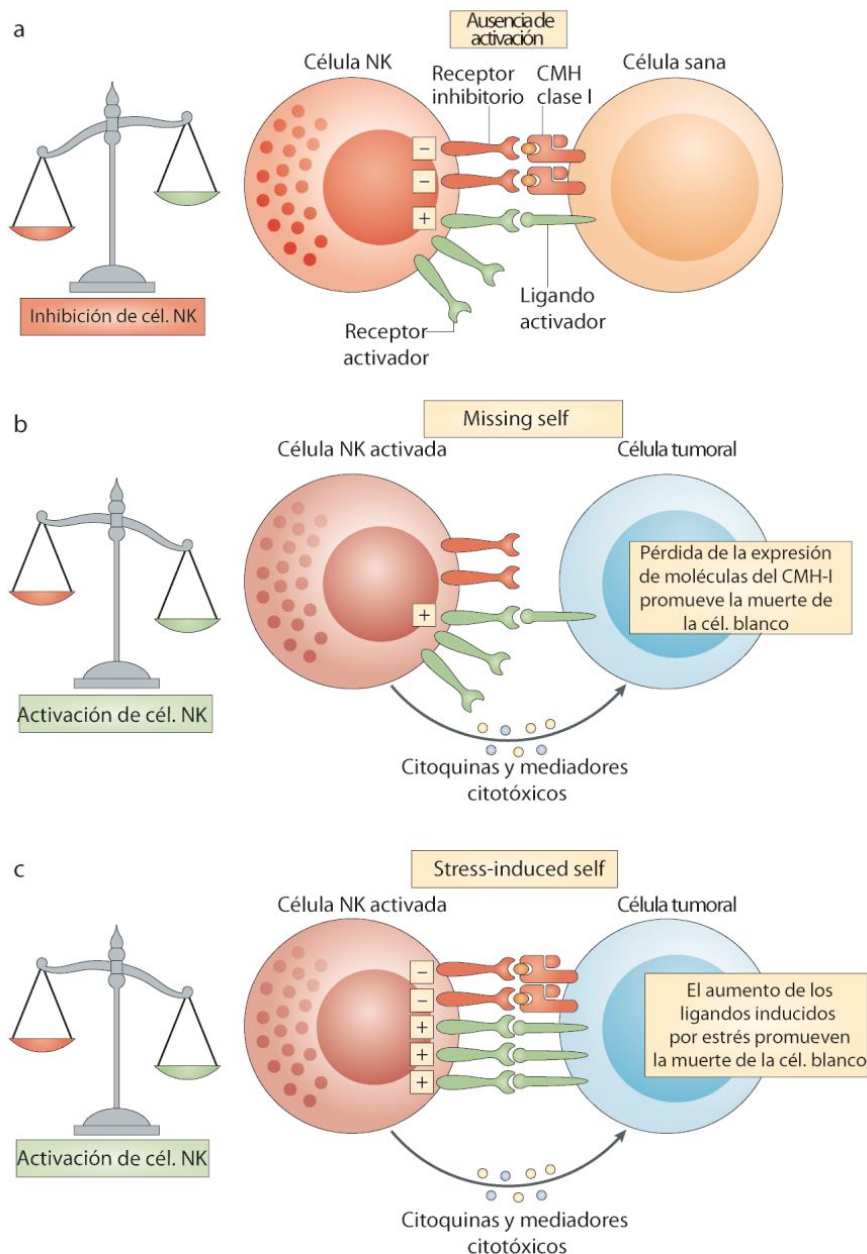


Figura 2. Reconocimiento de células tumorales por parte de células NK. **A)** Las células NK permanecen en reposo al enfrentarse a células normales, debido a que predominan las señales inhibitorias (ausencia de activación). **B)** Las células tumorales pueden perder la expresión de las moléculas de clase I del CMH, lo cual activa a las células NK ante la ausencia de señales inhibitorias. Este mecanismo de activación se conoce como “pérdida de lo propio” o *missing self*. **C)** Las células NK pueden ser activadas selectivamente por células sometidas a condiciones de estrés, las cuales aumentan la expresión de ligandos activadores para células NK y, por lo tanto, superan las señales inhibitorias. Este mecanismo se conoce como “inducción por estrés”. En ambas condiciones, la activación de células NK conduce a la eliminación de la célula tumoral directamente mediante la citotoxicidad mediada por células NK o indirectamente (a través de la producción de citoquinas, como el IFN- γ). El esquema fue tomado y modificado de [63].

Cabe destacar que las células NK humanas y de ratón expresan el receptor Fc γ RIIIA/CD16, el cual reconoce a través de su región Fc a Ac unidos a células blanco y desencadena la CCDA. Un número creciente de evidencias indica que la CCDA

contribuye a la respuesta clínica beneficiosa en pacientes que padecen cáncer tratados con Ac monoclonales (AcMo) [64], tales como el tratamiento con Rituximab [65, 66], lo que indica que las células NK están involucradas en las respuestas antitumorales mediadas por algunos agentes terapéuticos.

La citotoxicidad contra células blanco puede ser llevada a cabo por dos mecanismos diferentes. Las células NK almacenan proteínas citotóxicas dentro de gránulos especializados. Tras reconocer a la célula blanco establecen una sinapsis inmunológica con ésta, liberando granzima B, una serinproteasa capaz de activar caspasas, y perforina, una proteína desestabilizante de membranas. La internalización de estos componentes principalmente a través del receptor de manosa 3-fosfato (MPR), conduce a la formación de una vacuola de pH ácido que induce la activación de las perforinas que ejercen efectos desestabilizantes sobre la membrana de la vacuola endocítica permitiendo que la granzima B acceda al citosol de la célula blanco y ponga en marcha el sistema de caspasas que inducen la muerte por apoptosis [67, 68].

En el segundo mecanismo, participan miembros de la familia del receptor de TNF tales como CD178 (más conocido como ligando de Fas o FasL) y TRAIL (*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). Una vez activadas, las células NK comienzan a expresar FasL en su superficie, lo que les permite unirse a diversas células que expresan su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y FasL induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo la activación de una cascada de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco [69]. Además, las células NK pueden inducir apoptosis a través de TRAIL, de forma similar a lo descrito para FasL. A diferencia de FasL, que presenta un solo receptor en la célula blanco (la molécula Fas), TRAIL tiene cuatro receptores distintos denominados DR4 (también conocidos como TRAIL-R1 o APO-2), DR5 o TRAIL-R2, DcR1 o TRAIL-R3 y DcR2 o TRAIL-R4. Sólo DR4 y DR5 son capaces de inducir apoptosis como consecuencia de su trimerización inducida por TRAIL. En cambio, DcR1 y DcR2 inhiben la inducción de apoptosis gatillada a través de DR4 y DR5, ya que reconocen a TRAIL, pero carecen de dominios intracelulares de activación y por lo tanto secuestran a TRAIL, previniendo su reconocimiento por DR4 y DR5 [70].

LT CD8⁺

Los LT CD8⁺ son células de la inmunidad adaptativa con una extraordinaria capacidad para reconocer antígenos (Ag) específicos. Una vez activados, mediarán la destrucción de células blanco gracias a su capacidad citotóxica y de secretar IFN- γ . En condiciones normales, los LT CD8⁺ no desencadenan respuesta contra antígenos propios, pero generan una respuesta específica frente a algunos antígenos, como los antígenos tumorales, en parte gracias a mecanismos de selección durante la ontogenia de los LT. Gracias al proceso de recombinación somática al que están sometidos los genes que codifican para el Receptor de Células T (TCR, por sus siglas en inglés) los LT son capaces de reconocer una amplísima variedad de antígenos peptídicos presentados en el contexto de moléculas del CMH. Durante su desarrollo, los LT inmaduros son seleccionados en base a su capacidad de interaccionar adecuadamente con moléculas del CMH y débilmente con antígenos propios expresados en el timo, dando lugar a un repertorio extensísimo de LT CD8⁺ naïve diferentes, cada uno con una especificidad propia [71, 72]. Esto implica que cada clon está representado en una bajísima proporción [73]. Este pequeñísimo número de células circula por sangre y linfa a través de todo el organismo y circula diariamente atravesando los distintos órganos linfoides secundarios, recibiendo señales de sobrevivencia mediante las interacciones débiles que establecen a través de su TCR.

Los LT CD8⁺ naïve expresan elevados niveles de CD62L (L-selectina) y de CCR7 lo que facilita la entrada a los órganos linfoides secundarios guiados por las quemoquinas CCL19 y CCL21 [74]. Cuando eventualmente, a través de su TCR, detectan a su antígeno específico en el contexto de moléculas de clase I del CMH en una célula presentadora de antígeno (CPA), se genera la primera señal de activación; si ésta se produce en ausencia de una segunda señal dada por el reconocimiento de moléculas coestimuladoras a través de CD28, la célula entra en un estado de anergia [75]. Si el LT CD8⁺ naïve, en cambio, recibe las dos señales, se activará y atravesará un proceso de expansión clonal aumentando su número inicial entre 10^3 y 10^4 veces [76], diferenciándose en células efectoras, algunas de las cuales tienen la capacidad de generar células de memoria capaces de responder rápidamente ante un reencuentro con el antígeno [77].

Los LT CD8⁺ activados experimentan una disminución en la expresión de CD62L y de CCR7 junto con un aumento en la expresión CXCR3, lo que les permite

entrar a los tejidos periféricos inflamados [78]. Estos LT CD8⁺ efectores con capacidad citotóxica, son capaces de eliminar células que presenten el antígeno específico en sus moléculas de clase I del CMH [79]. Estos linfocitos que encontraron al antígeno se los define por el marcador CD44 [80]. Si bien en este punto ya no requieren una segunda señal provista por moléculas coestimuladoras, para que se produzca la sinapsis inmunológica es necesaria la interacción entre distintas moléculas de adhesión, como CD103 o el heterodímero CD11a/CD18 (LFA-1), con la célula blanco [81].

La citotoxicidad mediada por LT CD8⁺ es llevada a cabo por los mismos dos mecanismos que utilizan las células NK. Asimismo, al igual que las células NK, los LT CD8⁺ activados no sólo son capaces de ejercer citotoxicidad, sino que también pueden producir citoquinas tales como IFN- γ y TNF. El IFN- γ es fundamental en la defensa contra patógenos intracelulares y en la inmunidad antitumoral ya que favorece el procesamiento y presentación de antígenos en moléculas de clase I del CMH. Además, favorece la generación de respuestas proinflamatorias debido a que, por un lado, promueve la diferenciación de macrófagos hacia un perfil proinflamatorio y, por otro, induce un aumento en la producción de IL-12 por las CD perfilando la respuesta de los LT CD4⁺ naïve hacia un perfil de tipo Th1 [82]. En el contexto de un tumor, el IFN- γ es capaz de actuar directamente sobre las células tumorales, provocando la muerte por arresto del ciclo celular y apoptosis [82, 83] y, adicionalmente, aumentando su inmunogenicidad, debido a la inducción de la expresión de moléculas de clase I del CMH [84].

Luego de la fase de activación de los LT CD8⁺, se produce una fase de contracción. Entre el 90 y el 95% de las células que fueron expandidas entrará en apoptosis, mientras que entre el 5 y el 10% perdurará como células de memoria, las que serán capaces de responder rápidamente frente a un segundo encuentro con el antígeno. Sorprendentemente, el comienzo y la duración de esta fase son independientes de la magnitud de la expansión, de la naturaleza del antígeno o su cantidad, y del tiempo de exposición, indicando que son eventos tempranos los que determinan la fase de contracción [85]. Acerca de los puntos de control sobre la respuesta de los LT CD8⁺ hablaremos más adelante. Sin embargo, todas estas propiedades están supeditadas a su activación por las CPA, en particular las CDs.

CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las CDs son un grupo especializado de CPA, fundamentales para la activación de los LT naïve. Poseen gran plasticidad funcional y juegan un papel crucial como “intérpretes” de las señales del entorno, lo que les permite definir el perfil de la respuesta inmune adaptativa, siendo capaces tanto de promoverla como de inhibirla [86]. Las CDs presentan funciones específicas muy diferentes según su estado de maduración. Las CDs inmaduras (iCDs) tienen alto potencial endocítico e incorporan, procesan y presentan diversos antígenos, incluyendo antígenos tumorales [87]. La endocitosis de antígenos solubles puede ser inespecífica, a través del mecanismo de macropinocitosis, pero también puede ser específica, ya que estas células cuentan con un repertorio de receptores endocíticos. Entre estos receptores se destacan CD16, que detecta inmunocomplejos; receptores de lectinas de tipo C, que permiten reconocer antígenos glicosilados, y CD36 que, mediante el reconocimiento de fosfolípidos oxidados y participa en la internalización de células apoptóticas promoviendo la inflamación estéril [88, 89].

Las CDs son capaces de detectar la presencia de infecciones y procesos inflamatorios en los tejidos debido a que expresan RRP que permiten detectar patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*, PAMPs por sus siglas en inglés) y patrones moleculares asociados a daño (*Damage-Associated Molecular Pattern*, DAMPs por sus siglas en inglés). Entre los PRRs se destacan los receptores de tipo toll (*Toll-like Receptors*, TLR por sus siglas en inglés), compuestos por una familia de proteínas transmembrana localizadas en la superficie celular o en endosomas; los receptores tipo NOD (*NOD-like Receptors*) de localización citoplasmática; los receptores de tipo RIG-I (*RIG-like Receptors*), que reconocen RNA viral, y los ya mencionados receptores de lectinas de tipo C, entre otros. El reconocimiento a través de cualquier PRR induce la maduración y la activación de las CDs; sin embargo, cada PRR desencadena la activación de distintas vías de señalización específicas en las CDs, induciendo la producción de distintos patrones de mediadores solubles (citoquinas y quemoquinas), lo que permite el perfilado diferencial de la respuesta inmune adaptativa. Los PAMPs son estructuras moleculares conservadas en distintos grupos de patógenos (como LPS, DNA bacteriano, RNA de doble cadena, flagelina, etc) y sus receptores están bien caracterizados. Tanto los PAMPs como los DAMPs cobran vital importancia ya que como se mencionará más adelante, son potentes adyuvantes y podrían ser utilizados

en la generación de nuevas vacunas [90].

Una vez que las CDs reconocen estructuras a través de sus PRR, comienza su maduración con un cambio en el patrón de expresión de sus receptores de quemoquinas, disminuyendo la expresión de los que las atrajeron a los tejidos, como CCR1, CCR5 y CCR6, así como la de la molécula de adhesión E-cadherina que las mantiene ancladas a la epidermis. Asimismo, comienzan a expresar CCR7, lo que las hace sensibles a las quemoquinas CCL21 y CCL19 que las guían, primero, hacia los vasos linfáticos aferentes y, luego, a través de los órganos linfáticos secundarios donde se producirá el encuentro con los LT naïve que también expresan CCR7. Durante esta migración se completa la maduración de las CDs, que disminuyen su capacidad fagocítica e incrementan los niveles de expresión de moléculas relacionadas con la presentación antigénica, tales como las moléculas de clase I y de clase II del CMH y moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, lo que les permitirá activar a los LT naïve en el ganglio [91].

Además de las vías clásicas de presentación de antígeno, la vía exógena o endocítica y la vía endógena o biosintética, existen mecanismos adicionales que permiten que estas vías se crucen. Mediante el fenómeno denominado presentación antigénica cruzada, una fracción de los antígenos exógenos endocitados son transportados al citosol, procesados en el proteasoma y presentados en moléculas de clase I del CMH. De esta forma, la presentación antigénica cruzada representa un mecanismo fundamental para la activación de LT CD8⁺ específicos contra antígenos virales y tumorales [92].

CDS EN CÁNCER

El microambiente tumoral representa una matriz muy compleja y aún no se comprende del todo cómo las CDs se activan en ausencia de estímulos inflamógenos exógenos y orquestan una respuesta inmune antitumoral espontánea. En este contexto, toma particular importancia el reconocimiento de los DAMPs, entre los cuales el DNA derivado del tumor parece ser el más relevante [93]. Aunque aún no se conoce cómo el DNA endocitado alcanza el citosol de las CDs, recientemente se demostró en modelos murinos que las CDs, son capaces de detectar DNA derivado del tumor a través de cGAS (sigla en inglés de *cyclic GMP-AMP Synthase*), lo que activa la vía de STING e induce la producción de IFN- β que favorece la presentación

antigénica cruzada y la activación de LT CD8⁺ específicos contra antígenos tumorales [94]. Sin embargo, los tumores no sólo inducen la activación y la maduración de las CDs, sino que también pueden inhibir su funcionalidad a través de distintos mecanismos tales como el óxido nítrico, diversos gangliósidos e IL-10 [95]. Recientemente se ha demostrado que la expresión de PD-1 juega un rol importante en la apoptosis de CDs maduras (mCDs) y que diversos tumores expresan PD-L1 [96].

Adicionalmente, la maduración de las CDs puede estar inhibida en el microambiente tumoral, favoreciendo la acumulación de iCDs. En las últimas décadas, numerosos grupos describieron en distintos estudios los alcances de este fenómeno. En pacientes con cáncer de colon, cuello de útero, pulmón, hígado y mama, se ha encontrado que las CDs expresan bajos niveles de moléculas coestimuladoras [97-101]. En algunos casos no sólo presentan un fenotipo alterado, sino también pueden estar afectadas la producción de IL-12, la capacidad endocítica y la maquinaria de presentación antigénica [102, 103].

Así, vemos que las CDs, gracias su gran plasticidad funcional, adquieren un rol central en la inmunología tumoral. Por un lado, son esenciales para la puesta en marcha de la respuesta adaptativa antitumoral e interactúan recíprocamente con células NK [104] y otras células de la inmunidad innata, pero también pueden ser responsables de generar tolerancia frente al tumor en crecimiento.

MACRÓFAGOS

Los macrófagos son actores fundamentales de la respuesta inmune y se descubrieron hace más de 100 años por su rol fagocítico en la inmunidad. Sin embargo, los macrófagos son células fagocíticas por demás prodigiosas que eliminan aproximadamente 2×10^{11} eritrocitos por día; lo que equivale a más de 7 g de hierro y hemoglobina por año que es 'reciclada' para que el cuerpo reutilice [105]. Este proceso de eliminación es una contribución metabólica vital sin la cual el huésped no podría sobrevivir. Los macrófagos también participan en la eliminación de restos celulares que se generan durante la remodelación tisular, y limpian rápida y eficientemente las células que han sufrido apoptosis [106]. Estos procesos ocurren miles de millones de veces por día independientemente de la presencia de otras células inmunes, y la eliminación de las células muertas o apoptóticas parece dar como resultado una producción escasa de mediadores solubles por parte de los macrófagos que puede

tener como mucho un efecto local [107]. Los receptores que median estos procesos de depuración homeostática incluyen receptores depuradores (*scavenger*), receptores de fosfatidilserina, receptores de trombospondina, integrinas y receptores del complemento. Es por este motivo que la función principal de los macrófagos no es funcionar como una célula efectora de la inmunidad, sino como una célula de limpieza, cuya función principal es despejar el espacio intercelular.

Sin embargo, la necrosis que resulta de un trauma o estrés también genera desechos celulares que deben ser eliminados por los macrófagos. En contraste con los ejemplos citados anteriormente, la eliminación de estos residuos altera notablemente la fisiología de los macrófagos. En muchos casos, los desechos de la necrosis contienen señales de peligro endógenas, como proteínas de choque térmico, proteínas nucleares –entre las que se destaca HMGB1- histonas, ADN y otros nucleótidos y componentes de la matriz extracelular que son escindidos por proteasas celulares. La fagocitosis de estos componentes por los macrófagos conduce a cambios dramáticos en su fisiología, que incluyen alteraciones en la expresión de proteínas de superficie y la producción de citoquinas y mediadores proinflamatorios [108]. Similar a lo que se comentó para las CDs, estas señales de peligro son detectadas por TLRs presentes en los macrófagos.

Siguiendo la nomenclatura utilizada para las poblaciones de linfocitos T CD4⁺, los macrófagos se han clasificado a lo largo de lo que podría verse como una escala lineal, en la que los macrófagos M1, secretores de citoquinas proinflamatorias, óxido nítrico y especies reactivas del oxígeno representan un extremo y los macrófagos M2, con funciones fagocíticas, reparadoras de tejidos e inmunoregulatorias representan el otro. En esta clasificación, la designación M1 se reservó para macrófagos activados de forma clásica y la designación M2 para macrófagos activados alternativamente [14]. Sin embargo, la designación M2 se ha expandido rápidamente para incluir esencialmente todos los otros tipos de macrófagos. Esta clasificación persiste a pesar del creciente cuerpo de evidencia que indica que la designación M2 abarca células con diferencias dramáticas en su bioquímica y fisiología.

MACRÓFAGOS EN CÁNCER

El papel de los macrófagos en el cáncer ha sido controvertido y muchos aspectos siguen sin resolverse. La evidencia preliminar mostró que los mecanismos de vigilancia de los macrófagos son esenciales para prevenir el crecimiento de células

transformadas o pretransformadas, y hay evidencia que muestra que los macrófagos activados pueden matar las células transformadas *in vitro* [109]. Sin embargo, también hay evidencia de que la depleción de macrófagos tiene poco efecto sobre la susceptibilidad del huésped al cáncer y, en algunos casos, incluso puede ser beneficioso para el huésped [110]. Queda claro que los macrófagos no escapan a una realidad de todas las células del sistema inmune: pueden tener funciones contrapuestas en los tumores según el estadio de diferenciación que presenten.

Los macrófagos activados de forma clásica tienen el potencial de contribuir a las etapas más tempranas de la neoplasia, principalmente porque los radicales libres que producen pueden conducir al daño del ADN, causando mutaciones que pueden predisponer a las células del huésped a la transformación [111]. Un ejemplo anecdótico de esta inducción de tumorigénesis mediada por macrófagos es la neoplasia que se asocia con antiguas cicatrices de tuberculosis en los pulmones de pacientes previamente infectados. Los macrófagos activados de forma clásica se acumulan en estas cicatrices, dañan el tejido del huésped e inducen la transformación celular [112]. Este escenario contrasta con los primeros estudios *in vitro*, que demostraron convincentemente que los macrófagos activados clásicamente eran citotóxicos para las células tumorales, pero no para las células normales y, por lo tanto, sugerían que los macrófagos activados clásicamente contribuían a la erradicación temprana de las células transformadas [113]. Por lo tanto, aunque existe controversia sobre los papeles de los macrófagos en las primeras etapas del cáncer, parece haber un acuerdo general en que estas células se parecen a los macrófagos activados de forma clásica que tienen un fenotipo inflamatorio.

Sin embargo, a medida que los tumores progresan y crecen, el microambiente tumoral influye notablemente en los macrófagos asociados a tumores (*Tumor Associated Macrophages*, TAMs por sus siglas en inglés). Estos macrófagos cambian su fisiología y adquieren un fenotipo que se asemeja más a los macrófagos con capacidad regulatoria. No se han identificado los agentes derivados del tumor que inducen el desarrollo de estos macrófagos reguladores, pero los candidatos incluyen prostaglandinas, hipoxia, nucleótidos extracelulares y células apoptóticas del microambiente tumoral [114]. Estudios recientes indican que la inducción de una población de macrófagos supresores en tumores puede ocurrir a través de la activación de NFκB dependiente de MyD88 [115]. Independientemente del estímulo que promueve su diferenciación, estos macrófagos asociados a tumores producen altos niveles de IL-10, pueden inhibir respuestas inmunes a neoantígenos que se expresan en células tumorales y pueden inhibir a los macrófagos vecinos [116].

Además, se ha demostrado también que los macrófagos reguladores pueden contribuir con la angiogénesis y de ese modo promover el crecimiento tumoral [117]. Estudios recientes muestran que la presencia de macrófagos activados por la vía clásica (M1) correlaciona con una mejor respuesta a los tratamientos [118, 119] e incluso se están desarrollando nuevas terapias para reeducar a los TAMs [120, 121].

LIGANDOS DE NKG2D

El receptor NKG2D juega un papel importante en la protección del huésped frente a infecciones y cáncer [122]. Al reconocer ligandos inducidos en células infectadas o tumorales, NKG2D promueve la actividad citotóxica y secreción de citoquinas por parte de las células NK y funciona como señal coestimuladora en LT CD8⁺ y otras poblaciones de LT [122].

En humanos se describieron hasta la fecha dos familias de ligandos de NKG2D: la familia de MIC (siglas de: *MHC Class I chain related*) y la familia de ULBP/RAET (siglas de: UL16-Binding Protein, también conocido como *Retinoic Acid Early Transcript 1*). La familia de genes MIC fue identificada en 1994 por el grupo de Thomas Spies cuando buscaba nuevos genes en la región del HLA en el brazo corto del cromosoma 6 [123]. Esta familia se compone de 2 genes funcionales (MICA y MICB) y 5 pseudogenes (MICC, MICD, MICE, MICEF y MICG) [124, 125]. En cuanto a la familia de NKG2DLs denominados ULBP/RAET, los primeros 3 ULBPs fueron descubiertos mientras se intentaba encontrar los ligandos de la glicoproteína de citomegalovirus [126], por lo que fueron denominados ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3. Posteriormente se encontraron otros 3 ULBPs o ligandos RAET [127, 128] (**Figura 3**).

Se ha demostrado que los genes MIC están conservados en muchos mamíferos, entre los que se encuentran varios primates, cabra, cerdo, vaca, perro y hámster [129]. Sin embargo, estos genes están ausentes en ratón. No obstante, se cree que la familia de genes MILL (sigla de: *MHC class I-like Located near the LRC*, siendo además LRC la sigla de: *Leukocyte Receptor Complex*) podría ser el ortólogo murino de los genes MIC aunque no se ha observado que estos ligandos interactúen con NKG2D [130]. Sin embargo, en ratones se encuentran otros NKG2DLs que no están presentes en humanos. Hasta la fecha se conocen cinco miembros de la familia Rae-1 (Rae-1 α , Rae-1 β , Rae-1 γ , Rae-1 δ , Rae-1 ϵ), tres miembros de la familia H60 (H60a, H60b, H60c) y el producto del gen MULT1 [131] (**Figura 3**).

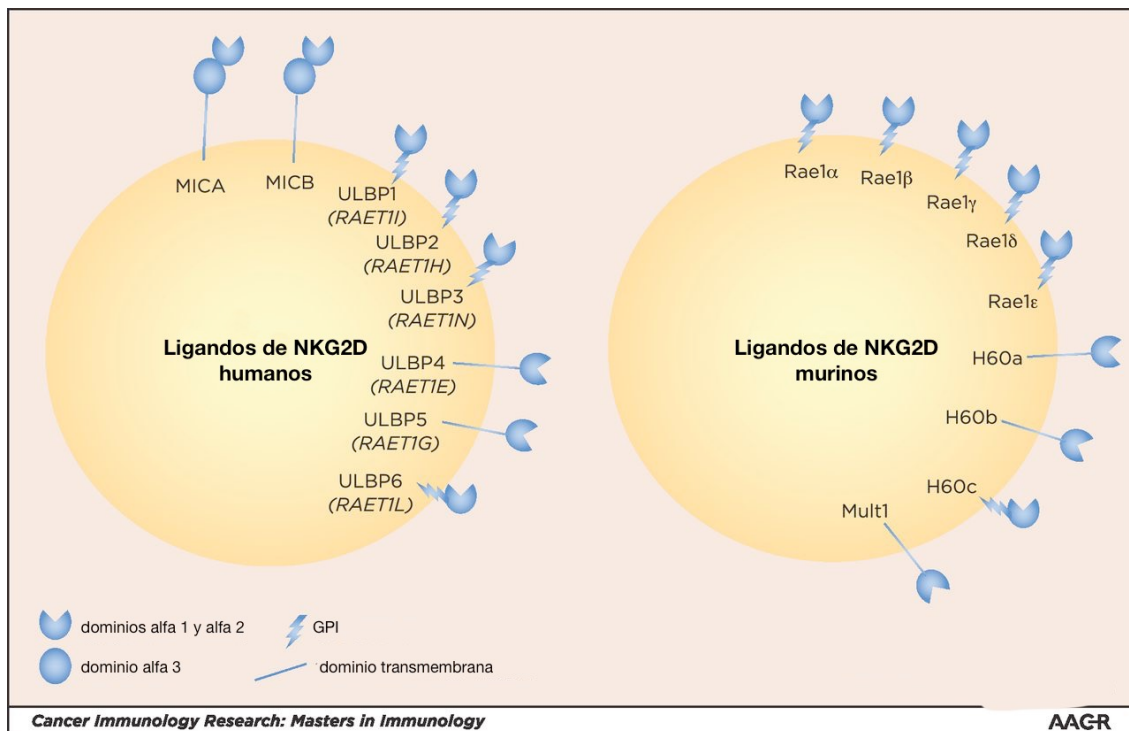


Figura 3: Ligandos humanos y murinos de NKG2D. En humanos, NKG2D reconoce proteínas codificadas por MICA y MICB, que se encuentran dentro del CMH en el cromosoma 6 cerca del locus HLA-B. Actualmente, se han identificado en la población humana más de 100 alelos de MICA que codifican 79 variantes de proteínas y más de 40 alelos de MICB que codifican 26 variantes de proteínas (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). El receptor NKG2D humano también se une a otra familia de glicoproteínas codificadas por los genes RAET1 (también conocidos como ULBP) ubicados en el cromosoma 6q24.2-25.3, que comprende 10 genes, RAET1E-N, que incluye seis loci que codifican proteínas funcionales: ULBP-1 (RAET1I), ULBP-2 (RAET1H), ULBP-3 (RAET1N), ULBP-4 (RAET1E), ULBP-5 (RAET1G) y ULBP-6 (RAET1L). Los genes RAET1 muestran menos polimorfismo que los genes MICA y MICB. MICA, MICB, RAET1E (ULBP-4) y RAET1G (ULBP-5) son glicoproteínas ancladas en transmembrana, mientras que RAET1I (ULBP-1), RAET1H (ULBP-2), RAET1N (ULBP-3) y RAET1L (ULBP-6) están anclados por GPI, aunque RAET1H (ULBP-2) se puede expresar en ambas formas, anclado a transmembrana y anclado a GPI, y RAET1G (ULBP-5) puede estar anclado a GPI. Los ratones tienen ortólogos de los genes RAET1 en el cromosoma 10, pero ninguno de los ligandos de ratón corresponde a un ortólogo a MICA o MICB o están codificados dentro del CMH de ratón. Los ligandos de ratón incluyen Rae1 α , Rae1 β , Rae1 γ , Rae1 δ y Rae1 ϵ , MULT1 y H60a, H60b y H60c, siendo MULT1, H60a y H60b proteínas de transmembrana y los otros anclados por GPI. Todos los NKG2DLs tienen dos dominios extracelulares ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) con homología con moléculas de clase I del CMH (las proteínas MICA y MICB también poseen un dominio $\alpha 3$), pero ninguno presenta péptidos ni se asocia con $\beta 2$ -microglobulina. Modificado de [132].

Los genes MICA y MICB, de 8799 pb y 11.716 pb respectivamente, son inusualmente largos comparados con los genes del HLA-A al HLA-G, que tienen una longitud promedio de 3,5 kb [133, 134]. La estructura genómica general es, sin embargo, similar a la de los genes de clase I del CMH, donde cada dominio está

codificado por un exón diferente [135]. Tanto MICA como MICB poseen intrones muy largos entre el exón 1 y 2, de 6840 pb y 7352 pb, respectivamente, comparados con los genes HLA-A a -G, donde ese intrón es de aproximadamente 200 pb. El exón 1 codifica para una secuencia líder, los exones 2-4 para los dominios extracelulares $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, el exón 5 para la región transmembrana y el exón 6 para la cola citoplasmática.

El gen de MICA codifica para un ARNm de 1.382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1.149 nt, originando un polipéptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa [124]. Esta longitud varía de acuerdo con el número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos [136]. El gen de MICB genera un transcripto de 2.376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia aminoacídica [133].

En 1999 se cristalizó la porción extracelular del alelo MICA*001 (**Figura 4**, [137]) y se pudo observar que efectivamente el hipotético bolsillo de unión de péptido es muy angosto (10 Å de ancho) como para contener un ligando, comparado a los 18 Å del bolsillo de las moléculas clásicas de clase I del CMH. Además, la estructura obtenida confirmó que MICA no se une a $\beta 2$ -microglobulina.

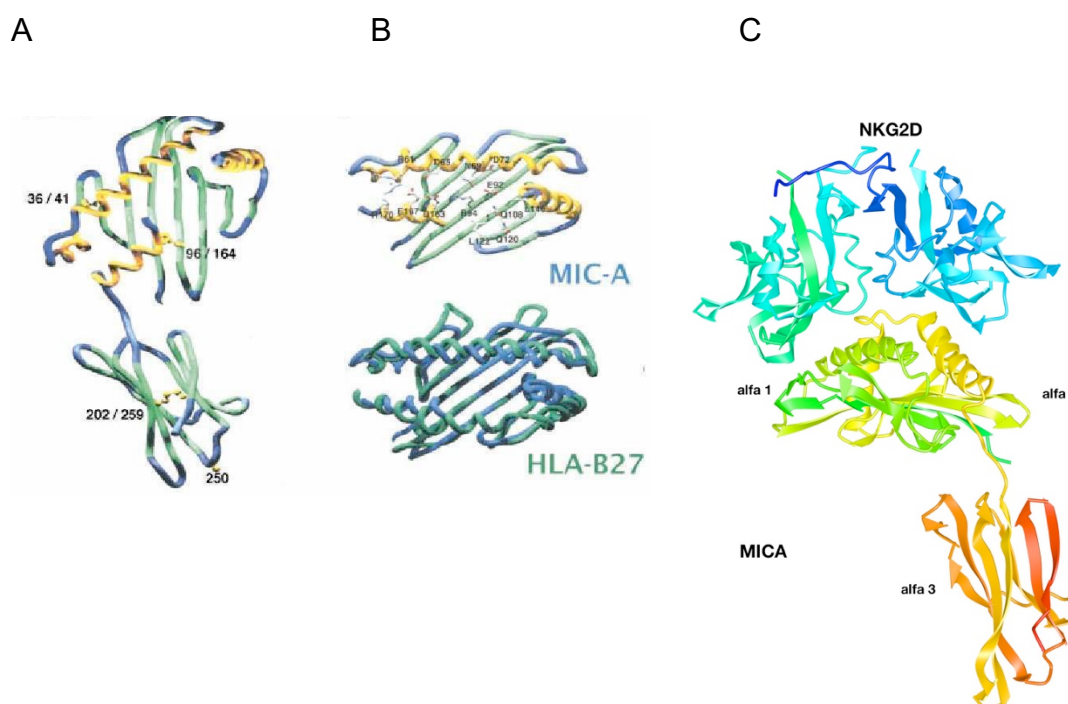


Figura 4: Representación de MICA y MICA-NKG2D. **A)** La estructura de los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ responden a la estructura general de las moléculas de clase I del CMH, pero **B)** el bolsillo formado por los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ es demasiado angosto para contener un péptido, comparado con la molécula clásica HLA-B27 (tomado de [137] y de [138]). **C)** Interacción de MICA con NKG2D según datos cristalográficos. La estructura fue creada con el algoritmo de modelado de SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org>) [139].

POLIMORFISMO

Al igual que los genes de clase I del HLA, MICA y MICB son polimórficos y se expresan de forma codominante, conociéndose hasta la fecha más de 100 alelos de MICA y más de 40 alelos de MICB [140].

Los alelos más frecuentes en diferentes grupos étnicos son MICA*008 (entre 41,5 y 78,3% dependiendo de la población, www.allelefrequencias.net), una versión truncada de MICA, seguido por MICA*002, MICA*004 y MICA*010, aunque el orden de las frecuencias puede depender de la población estudiada [125]. Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, ya que en algunas poblaciones se ha detectado un porcentaje elevado de individuos que carecen de MICA e incluso de MICB [141-143]. A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de genes funcionales de clase I o clase II del CMH, los individuos deficientes para genes MIC son aparentemente normales, probablemente debido a que NKG2D puede reconocer diversos ligandos adicionales.

EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DE MICA

Originalmente se demostró que MICA se expresa en respuesta a estrés oxidativo [144], exposición a genotóxicos y daño al DNA [56], el uso de inhibidores de deacetilasas de histonas [145], hipoxia –que genera aumento de la expresión y liberación de formas solubles de MICA con capacidad inmunosupresora [146, 147]- o transformación tumoral, como una forma de señal celular de “peligro” [56, 148]. Más adelante, se observó expresión de MICA en el tejido gastrointestinal normal y en algunos otros pocos tipos celulares como células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos y monocitos [149, 150]. Sin embargo, recientemente se descubrió que MICA se expresa en más tejidos de los que se creía, pero de manera intracelular [151] y que existen diversos mecanismos transcripcionales, posttranscripcionales y posttraduccionales por los cuales MICA se mantiene dentro algunas células y se expresa en la superficie celular de otras [151-154].

Nuestro grupo ha demostrado que MICA se induce en LT CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con células alogénicas *in vitro*, proceso en el que interviene la microagregación del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora CD28 [155]. La señalización intracelular involucra la activación de las vías de transducción de señales Lck/Fyn, ERK1/2, p38 MAPK, calcineurina, las rutas de señalización dependientes de IL-2, Jaks/STATs y p70^{S6} quinasa [156] y al factor de transcripción NF-κB [157].

En concordancia con nuestros resultados, se ha observado que la expresión de distintos NKG2DLs se induce *in vitro* en LT CD4⁺ y CD8⁺ estimulados con superantígeno, con células alogeneicas o antígenos específicos [158]. Tal activación promueve la fosforilación de la proteína (ATM), una de las quinasas requeridas para la expresión de NKG2DLs durante la respuesta de daño al DNA. Asimismo, la inhibición de la vía *ATM/Rad3-related kinase* (ATR) en linfocitos T bloqueó la inducción de MICA en un proceso dependiente de NF-κB.

NKG2DLs EN TUMORES

Como se comentó anteriormente, la expresión de MICA y de otros NKG2DLs se asocia a la neotransformación. Se ha descripto previamente que varios tumores, así como también distintas líneas celulares tumorales expresan altos niveles de MICA [159-163]. El análisis bioinformático de la expresión de MICA utilizando el algoritmo r2 disponible en <http://r2.amc.nl> en bases de datos de casi 1000 pacientes con tumores, reveló que, comparado con tejidos normales, MICA está aumentado significativamente en tumores de mama, próstata, colon, ovario y riñón, entre otros (**Figura 5A**). Sin embargo, la expresión de MICA también está relacionada con diversas características de los procesos malignos. El análisis de Microarrays de muestras de tumores y cultivos primarios utilizando GEO2R disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/> reveló, tal como se hemos reportado en nuestro laboratorio [164], un aumento de la expresión de MICA en resistencia al tratamiento con agentes quimioterapéuticos (**Figura 5B**) así como también un aumento en la expresión de MICA en las metástasis de melanoma y en carcinoma hepatocelular (**Figura 5C**). Asimismo, un análisis de sobrevida con datos depositados en la plataforma R2, encontramos una relación inversamente proporcional entre la expresión de MICA y la sobrevida de pacientes con diversos tumores (**Figura 5D**).

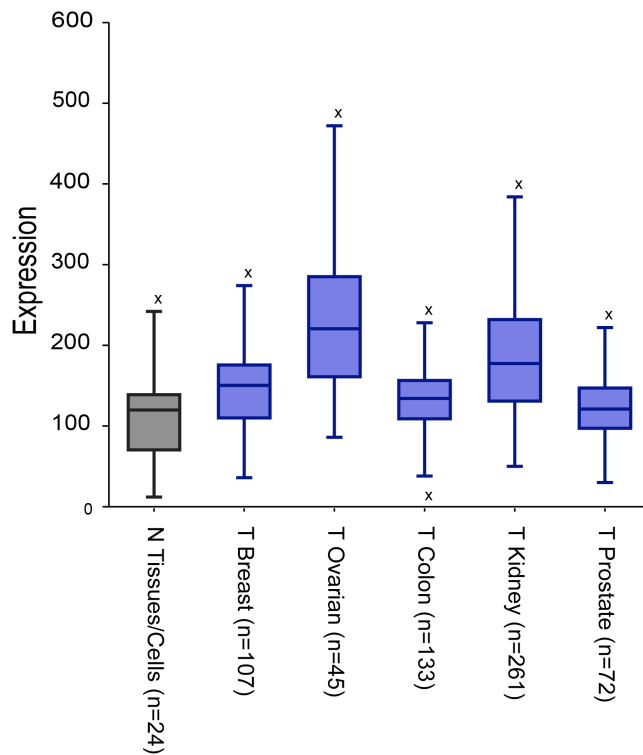
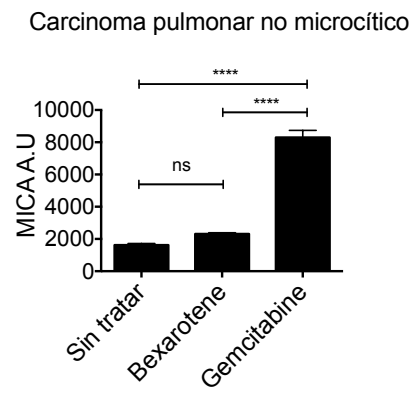
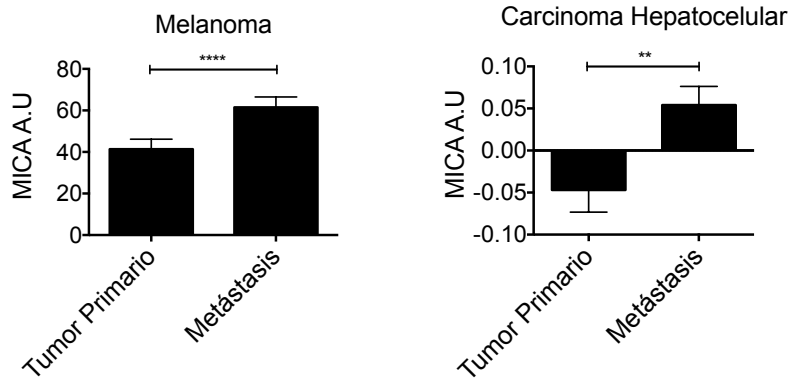
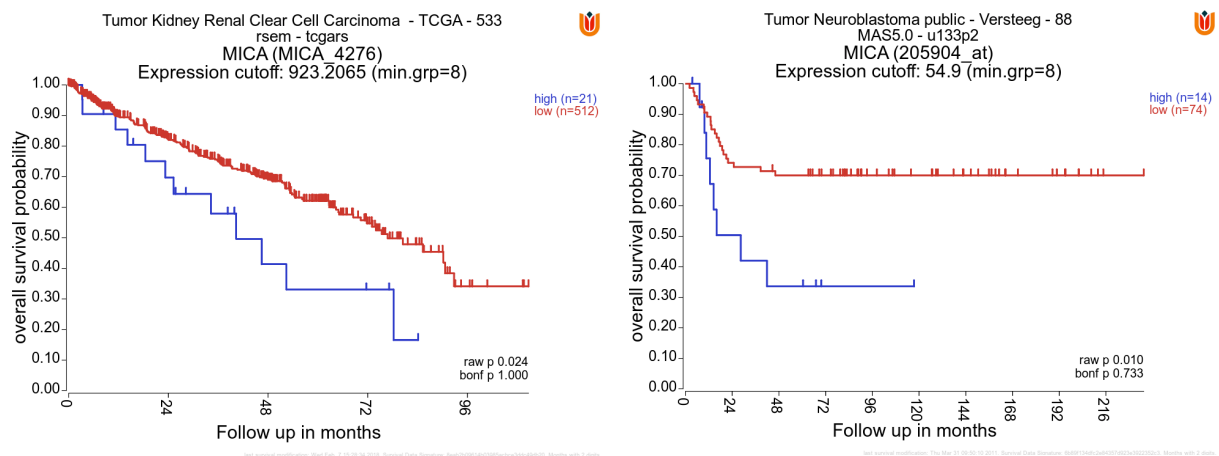
A**B****C****D**

Figura 5: Expresión de MICA en tumores y correlación con sobrevida. **A)** MICA (AU, unidades arbitrarias) se encuentra sobre-expresado en diversos tumores comparado con tejidos normales y **B)** MICA se encuentra sobre-expresado en respuesta a agentes quimioterapéuticos **C)** MICA (AU) se encuentra sobre-expresado en metástasis comparado con tumores primarios **D)** expresión de MICA en función de la sobrevida de los pacientes.

Sin embargo, a pesar de expresar esta “marca”, resulta paradójico que la mayor expresión de MICA se asocie con menor sobrevida. Este hecho podría ser indicativo de la existencia de mecanismos de inmunoevasión tumoral que involucren a MICA. En general, las células tumorales poseen estrategias que les permiten evadir el ataque de las células NK y de los linfocitos T CD8⁺. Uno de los mecanismos a través de los cuales las células tumorales intentan evitar el sistema inmune es mediante el control de proteínas involucradas en el procesamiento y presentación antigénica. Se han descrito alteraciones incluyendo defectos en la expresión de LMP2 y LMP7 [165], integrantes del proteasoma e involucrados en la generación de los péptidos a ser presentados por moléculas de clase I del CMH; alteraciones en la expresión de las proteínas TAP-1 y TAP-2, necesarias para la entrada de los péptidos al retículo endoplásmico; e incluso, la propia disminución en la expresión de las moléculas de clase I del CMH [166-168]. Aunque este mecanismo evita el reconocimiento por parte de los LT CD8⁺, podría hacer a las células susceptibles de ser eliminadas por las células NK. Sin embargo, también se han descrito diversos mecanismos de evasión de la respuesta mediada por células NK relacionados con el sistema NKG2D-NKG2DLs [169]. Entre ellos, se destaca la retención de NKG2DLs en el retículo endoplásmico evitando su expresión en superficie [170, 171], el desprendimiento a través de la secreción de exosomas con NKG2DL y TGFβ, capaces de suprimir por ambos mecanismos a las células linfoides [172-174], y la secreción de formas solubles por *splicing* alternativo [175, 176] y el clivaje del ectodominio de NKG2DLs por acción de metaloproteasas [177]. El clivaje y la secreción no sólo generan variantes tumorales con menor expresión de NKG2DLs, afectando su reconocimiento por las células citotóxicas, sino que esas formas solubles actúan como antagonistas del receptor NKG2D inhibiendo la funcionalidad de las células NK y de los LT CD8⁺ [178, 179].

ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS

El cáncer constituye actualmente la segunda causa de muerte a nivel mundial y, además, se estima que en el futuro su incidencia aumentará debido al

envejecimiento de la población y al aumento de la prevalencia de ciertos factores de riesgo [180].

¿QUE ES UNA NEOPLASIA?

Neoplasia significa literalmente nuevo crecimiento. La definición de qué es una neoplasia es compleja dado que muchas de las propiedades de las “células tumorales” también se encuentran en las “células normales”. Sin embargo, debido a que los tumores suelen crecer en tamaño a lo largo del tiempo –al menos los que primero se estudiaron- se le atribuyó un rol clave a la desregulación del ciclo celular y al consecuente crecimiento descontrolado en el desarrollo del cáncer [181, 182]. Una de las teorías históricamente más fuertes sobre el origen del cáncer es la teoría de la mutación somática (SMT, por sus siglas en inglés), cuyas bases se sentaron en 1914 sobre los trabajos de un zoólogo alemán llamado Theodor Boveri [183]. Esta teoría sugiere que los tumores espontáneos -que representan la mayoría de los tumores- derivan de una única célula que acumuló suficientes mutaciones con el tiempo y escapó a la regulación del ciclo celular. En este sentido esto implica la premisa de que el cáncer es una enfermedad monoclonal. La segunda premisa de la SMT es que las células en ausencia de estímulos externos son naturalmente quiescentes [184, 185]. La tercera premisa es que el cáncer es una enfermedad en la tasa de proliferación de las células y que las mutaciones causales ocurren en genes que controlan la proliferación o el ciclo celular. Con el descubrimiento de los protooncogenes, y de los genes supresores de tumores, que protegían a las células de desregulaciones del ciclo celular, la SMT fue ganando adeptos dado que el panorama parecía completo. Sin embargo, como dijeron Hahn y Weinberg en un artículo en 2002: “Para aquellos que creen en la simplificación del cáncer, la investigación acerca de sus bases moleculares ha sido bastante decepcionante. En vez de haber descubierto un pequeño número de genes y moléculas clave, cada vez se descubre un número más vasto de factores” [181]. Nuevas versiones de la SMT propusieron la existencia de seis alteraciones esenciales en la fisiología celular, presentes en todas las enfermedades neoplásicas: la capacidad proliferativa ilimitada de las células tumorales, facilitada por la presencia de señales proliferativas sostenidas y la evasión de mecanismos supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la capacidad de inducir angiogénesis y, finalmente, la invasión de tejidos distantes creando focos metastásicos [182].

EL ROL DEL MICROAMBIENTE

Más allá de estas definiciones, una de las principales características de las neoplasias es la alteración de la organización tisular [186], motivo por el cual los patólogos hoy en día diagnostican la presencia de un gran número de distintos tumores observando cortes de tejidos.

En 1981 se observó que embriones trasplantados en lugares ectópicos generaban neoplasias llamadas teratocarcinomas. Interesantemente, estos teratocarcinomas al ser inyectados en blastocistos eran capaces de generar tejidos normales y hasta órganos y gametas [187]. También se vio que si trasplantaban células de carcinomas renales de rana en huevos de rana enucleados, el huevo terminaba desarrollando un renacuajo y los tejidos formados eran indistinguibles de los de un renacuajo normal o hasta que células tumorales humanas eran reprogramadas si se trasplantaban en la glándula mamaria de un ratón y hasta eran capaces de producir leche [188]. Con estos y otros trabajos, una vieja teoría, la teoría de la organización de los tejidos (TOFT, por sus siglas en inglés) fue cobrando fuerzas [189]. Esta teoría propone que las neoplasias surgen de errores en las interacciones entre distintas partes de los tejidos que normalmente se regulan las unas a las otras y que fuera de este control las células tienden a proliferar –porque según esta teoría, las células proliferan naturalmente y son los estímulos externos los que las detienen. De acuerdo con esta teoría, las mutaciones en genes supresores de tumores pierden protagonismo lo que cobra mayor sentido dado que se estima que un único tumor puede tener hasta 11.000 mutaciones por célula [190]. Incluso se postula que muchas de estas mutaciones en genes del ciclo celular puedan suceder después del desarrollo del nuevo tumor. Asimismo, esta teoría contempla la reversibilidad de este fenómeno, es decir que la reorganización del tejido es capaz de reconvertir los tejidos enfermos en sanos [191-194]. Ya en los últimos años, la visión reduccionista del cáncer como un fenómeno dependiente de la biología de un grupo de células desreguladas, prevaleciente durante muchísimos años, fue abandonada, y ahora éste se concibe como un tejido complejo compuesto por múltiples tipos celulares que conforman el microambiente tumoral. En esta visión del cáncer, el sistema inmune adquiere protagonismo como uno de los principales componentes de ese microambiente [195].

La respuesta inmune antitumoral es el resultado de un complejo proceso dinámico que se establece entre las células tumorales, las células del sistema inmune y las células del estroma que conforman el microambiente tumoral. A pesar de que los mecanismos a través de los cuales las células de la inmunidad detectan la presencia

de un tumor son complejos, sabemos que el sistema inmune es capaz de montar respuestas antitumorales y que todas las lesiones neoplásicas presentan en menor o mayor medida un infiltrado inflamatorio compuesto por células tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa [196]. El crecimiento de tumores en pacientes inmunocompetentes evidencia la existencia de mecanismos tumorales de evasión de la respuesta inmune, como la inflamación crónica promovida por el tumor que puede estimular la angiogénesis, la producción de factores de crecimiento y especies reactivas del oxígeno que pueden favorecer la progresión de la enfermedad [197].

En los últimos años, la profundización del estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune antitumoral se ha vuelto de suma importancia ya que representa la base del desarrollo de nuevas terapias basadas en la restauración del sistema inmune o inmunoterapias y de nuevos biomarcadores con utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer [198-201].

INMUNOLOGÍA TUMORAL: TEORÍA DE LAS 3 E

Aunque como se comentó anteriormente, la inflamación crónica generada por el sistema inmune debido a la persistencia de un foco infeccioso, por ejemplo, puede favorecer la tumorigénesis [202-205], los primeros indicios sobre el rol del sistema inmune vinieron de la mano de su rol protector. A fines del siglo XIX, el médico William Coley, padre de la inmunoterapia, trató a los primeros pacientes con cáncer con una mezcla de bacterias para generarles una inflamación aguda [206, 207] y Paul Ehrlich en 1909 propuso que “durante la vida fetal y post fetal, la aparición de células aberrantes es extremadamente común. Afortunadamente en la mayoría de las personas, se mantienen completamente invisibles gracias a la acción de mecanismos positivos de protección” [208]. Lewis Thomas sugirió que el sistema inmune es capaz de eliminar tumores que reconoce por la expresión de neoantígenos, similar a lo que ocurría con los rechazos de tejidos, y así mantener la homeostasis del organismo [209]. Durante el transcurso del siglo XX, la idea de que el sistema inmune es capaz de proteger de la aparición de tumores ganó una alta aceptación y, como se comentó anteriormente, se descubrieron muchos tumores inducidos por virus y los genes relacionados con su oncogenicidad. Entre estos se encuentran el cáncer de hígado inducido por el virus de la hepatitis B (HBV) [210, 211], el cáncer de cuello de útero inducido por algunos subtipos de papilomavirus [212], el linfoma de Burkitt y el carcinoma nasofaríngeo inducidos por el virus de Epstein-Barr [213], el sarcoma de

Kaposi inducido por un herpesvirus [214] y la leucemia T en adultos inducida por el virus linfotrópico humano de células T [215].

La evidencia de que el sistema inmune es capaz de controlar no sólo el volumen tumoral sino también su inmunogenicidad contribuyó enormemente al campo de la inmunología tumoral [216, 217]. Así, se determinó que en ratones inmunodeficientes que carecían de la respuesta mediada por IFN- γ o en ratones deficientes del gen RAG-2 (RAG-2^{-/-}; lo que impide la generación de células T, B y NKT) se desarrollan más neoplasias espontáneas en el tiempo y son más susceptibles a padecer sarcomas inducidos por el carcinógeno metilcolantreno (MCA) comparados a los ratones *wild type* o salvajes. Además, una proporción significativa (40%) de los sarcomas inducidos por MCA derivados de los ratones inmunodeficientes RAG-2^{-/-} se rechazaron espontáneamente cuando se trasplantaron a ratones singeneicos salvajes que no habían sido desafiados previamente con el tumor, mientras que todos los sarcomas inducidos por MCA derivados de ratones inmunocompetentes salvajes crecieron progresivamente al ser trasplantados en huéspedes singeneicos salvajes que no habían sido desafiados con el tumor previamente. Por lo tanto, los tumores que se forman en ausencia de un sistema inmune intacto y completamente funcional son, en conjunto, más inmunogénicos que los tumores que se generan en huéspedes inmunocompetentes.

Estos resultados demuestran que el sistema inmune no solo protege al huésped de la formación de tumores, sino que también edita la inmunogenicidad de las células cancerígenas. Estos nuevos datos dieron lugar a la formulación de la teoría de la inmunoección del cáncer. De acuerdo con esta nueva visión, la inmunoección se concibe como un proceso dinámico conformado por tres fases distintas: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 6**) [218-222].

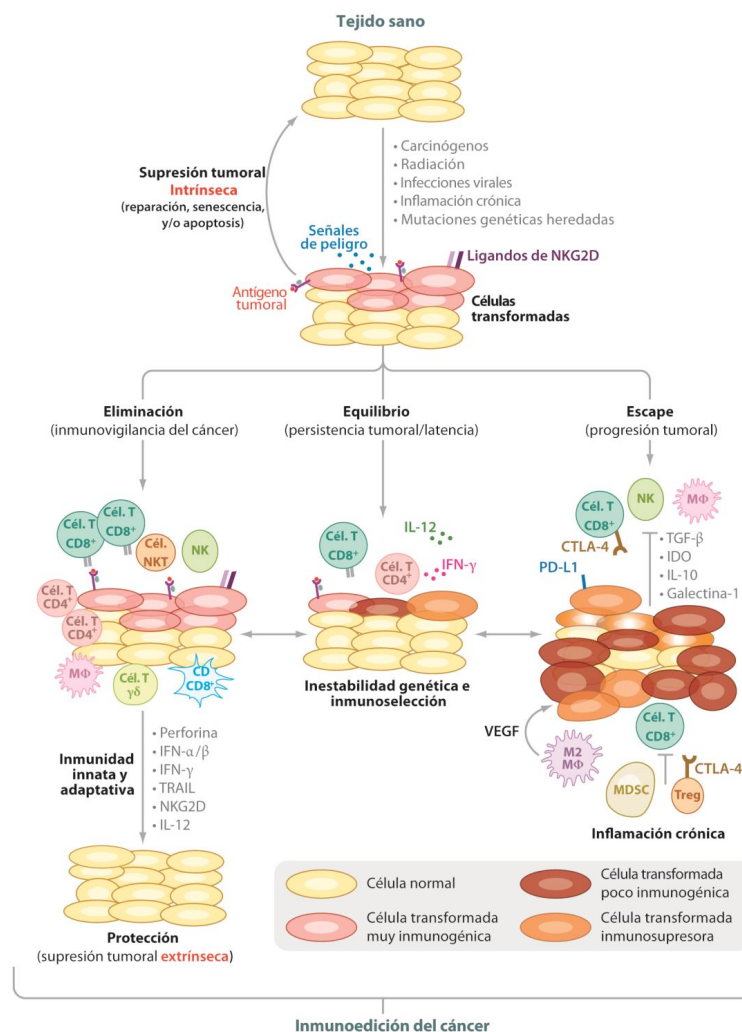


Figura 6. Las tres fases de inmunoección del cáncer. La inmunoección es el resultado de tres etapas que funcionan de manera secuencial para controlar o dar forma al tumor. Abreviaturas usadas en la figura: MΦ: macrófagos; IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa; CTLA-4: proteína-4 asociada al linfocito T citotóxico; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; Treg: célula T regulatoria. Modificado de [223].

Tras los primeros eventos que desencadenan la aparición de una célula tumoral, eventos que como ya se comentó antes son aun objeto de debate puesto que nadie ha visto un tumor formarse “*in statu nascendi*”, comienza la etapa de eliminación. Esta etapa constituye una visión más moderna de la inmunovigilancia del cáncer, proceso durante el cual los componentes moleculares y celulares de la inmunidad innata y adaptativa trabajan conjuntamente para detectar la presencia de un tumor en desarrollo y destruirlo antes de que sea clínicamente detectable. En circunstancias en las que se ejercen efectos deletéreos completos sobre la célula tumoral, la fase de eliminación representa el punto final de la inmunoección del cáncer.

Sin embargo, algunas veces el sistema inmune actúa como seleccionador darwiniano de algunas variantes de las células tumorales menos inmunogénicas, que no siendo eliminadas totalmente pueden entrar en una fase de equilibrio o avanzar directamente hacia el escape. Durante la etapa de equilibrio, las células tumorales ingresan en un estado de latencia funcional y pueden permanecer clínicamente indetectables, incluso durante el resto de la vida del huésped. En ese caso la fase de equilibrio también representa un segundo punto final estable de la inmuoedición del cáncer. En la clínica, la existencia de la fase de equilibrio se evidencia por ejemplo cuando órganos de donadores sanos –pero con tumores en equilibrio- pueden dar lugar a nuevos tumores en los receptores inmunosuprimidos por la ausencia de la presión de selección del sistema inmune del receptor [224].

Finalmente, distintos eventos tales como la acumulación de nuevas mutaciones en la población de células tumorales que no son afectadas por la inmuoedición por ser poco inmunogénicas o bien por una disfunción en el sistema inmune como consecuencia de una inmunosupresión debido al proceso de envejecimiento natural, por otras enfermedades o por factores exógenos (drogas, exposición a radiación UV, etc.), pueden alterar el estado de equilibrio. En este caso se avanza hacia la tercera fase o escape durante la cual las células tumorales comienzan a crecer de una manera pobremente controlada por el sistema inmune y emerge la enfermedad detectable clínicamente. En esta fase, se ponen en juego una gran variedad de mecanismos que permiten a las células neoplásicas crecer de forma descontrolada, favoreciendo la progresión tumoral y el eventual establecimiento de metástasis. Durante esta fase, el microambiente inmune del tumor puede adquirir incluso propiedades regulatorias que contribuyen a crear un microambiente inmunosupresor protumoral [225]. El tumor podrá crecer exponencialmente en tanto los requerimientos de nutrientes y oxígeno no superen la capacidad de la vasculatura existente. Cuando esto ocurre, se genera una condición de hipoxia en el tejido que induce la expresión de factores activadores de la angiogénesis como el factor de crecimiento de fibroblastos FGF (sigla en inglés de *Fibroblast Growth Factor*), el factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (sigla en inglés de *Vascular Endothelial Growth Factor*), y el factor de crecimiento de placenta PLGF (sigla en inglés de *Placenta Growth Factor*), entre los cuales el VEGFA es el más ubicuo entre los tumores. A medida que aumenta la hipoxia en el tejido, aumenta la secreción de VEGFA generando un desbalance entre los factores proangiogénicos y antiangiogénicos que determina el *switch* de la célula endotelial de un estado quiescente a uno angiogénico [226-228]. El *switch* angiogénico permite que la formación de vasos sanguíneos acompañe el crecimiento

del tumor promoviendo su desarrollo. Los pericitos, que en la vasculatura normal se encuentran en estrecho contacto con el endotelio, son menos abundantes en la vasculatura tumoral y pueden ser reemplazados por células tumorales [229]. De esta manera, se facilita el acceso de las células tumorales a la vasculatura, a través de la cual son capaces de colonizar nichos distantes dando origen a focos metastásicos donde el sistema inmune ejerce escaso control sobre el crecimiento tumoral.

MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL

A pesar de que las células cuentan con diversos mecanismos para evitar el crecimiento descontrolado y que el sistema inmune cuenta con poderosas herramientas para evitar el desarrollo de tumores, las enfermedades neoplásicas se manifiestan incluso en pacientes inmunocompetentes. Esto se debe a que bajo la presión de selección que ejerce el sistema inmune se favorece la supervivencia de aquellas células con menor inmunogenicidad y con mejores mecanismos para evadir la respuesta inmune generando zonas o nichos de inmunosupresión. Estos mecanismos de escape incluyen modificaciones en la expresión de proteínas de superficie en las células tumorales, expansión y reclutamiento de células inmunosupresoras, y secreción de factores inmunosupresores [225].

MODIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE SUPERFICIE

Los tumores pueden evadir la respuesta inmune o actuar directamente contra la misma. Uno de los primeros mecanismos demostrados de contraataque que promueve el escape tumoral involucra la vía de Fas/FasL [230]. FasL se expresa en las células tumorales y les permite interactuar con Fas en los LT que infiltran el tumor [231, 232]. La interacción con FasL induce la trimerización de Fas en los LT promoviendo la activación de una cascada de caspasas que conduce a la apoptosis [69, 233, 234]. Incluso se observó que el silenciamiento de la expresión de FasL en líneas celulares de ratón produce una disminución del tamaño tumoral [235, 236] y la transducción de FasL en diversas líneas tumorales que naturalmente no expresan dicha molécula inducen la apoptosis de LT CD8⁺ activados *in vivo* [237, 238].

Otro mecanismo de contraataque de los tumores es el aumento en la expresión

de ligandos de PD-1, un regulador negativo de la respuesta inmune. PD-1 tiene dos ligandos denominados PD-L1 y PD-L2. Sin embargo PD-L1 es el que se expresa en elevados niveles en la mayoría de los tumores sólidos [239, 240] mientras que la expresión de PD-L2 se encuentra más restringida [241]. La expresión de PD-L1 puede verse incrementada en las células tumorales como un mecanismo de resistencia asociado a la activación de distintas vías de señalización oncogénicas durante el transcurso de la enfermedad [242] y su expresión también puede ser inducida por citoquinas inflamatorias [243].

Por otra parte, se ha detectado que, en varios tumores, las mismas células del tumor pueden expresar el receptor NKG2D y algunos NKG2DLs simultáneamente. Sorprendentemente, esto favorece la activación de ciertas vías de transducción de señales que favorecen el crecimiento del tumor, la transición epitelio-mesenquimal y la metástasis [244-246].

EXPANSIÓN Y RECLUTAMIENTO DE CÉLULAS INMUNOSUPRESORAS Y LIBERACION DE FACTORES SOLUBLES

Además de los mecanismos descritos, la secreción de factores solubles y la llegada al tumor de células regulatorias también contribuye a la generación de un ambiente inmunosupresor. Las células T regulatorias Treg son una subpoblación de LT CD4⁺ con funciones inhibitorias que se caracterizan fenotípicamente por la expresión constitutiva de CD25 (cadena alfa del receptor de IL-2) y del factor de transcripción FoxP3. Estas células son capaces de suprimir la proliferación de LT naïve y su diferenciación a LT efectores. Además, pueden inhibir las funciones efectoras de LT CD4⁺ [247-249], LT CD8⁺ [250, 251], células NK [251, 252], linfocitos B (LB) [253], macrófagos [254] y CDs [255]. Fisiológicamente, son indispensables para el mantenimiento de la tolerancia y para evitar el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Sin embargo, se observó que los tumores son capaces de promover su reclutamiento a través de la secreción de las quemoquinas CCL17, CCL22 y CCL1 entre otras, su expansión a través de la producción de TGF- β y de IL-10, y su activación [256-258]. Las células Treg son capaces de expresar diversas moléculas de superficie tales como CTLA-4, TIGIT, CD39 y CD73, y de secretar citoquinas inmunosupresoras tales como TGF- β e IL-10, pudiendo inhibir la respuesta inmune a través de diversos mecanismos [259, 260]. En individuos portadores de tumor, se

demostró que las células Treg regulan la respuesta inmune principalmente a través de CTLA-4 [261-263]. CTLA-4 es un receptor inhibitorio que, al igual que CD28, reconoce a CD80 y CD86. Sin embargo, CTLA-4 reconoce a ambas moléculas coestimuladoras con mayor afinidad que CD28, desplazando su unión e inhibiendo de esta manera la activación de los LT, controlando la magnitud de la respuesta inmune [264, 265]. El bloqueo de CTLA-4 induce un fuerte efecto antitumoral en modelos tumorales de ratón [266, 267] y en pacientes con melanoma [268, 269] e incluso otros tumores [269, 270]. Interesantemente, se ha descrito que pacientes que respondían favorablemente al tratamiento con Ac anti-CTLA-4 y también al tratamiento con células tumorales autólogas irradiadas que expresan, por ingeniería genética GM-CSF, desarrollan altos títulos de Ac anti-MICA [271, 272]. Esto está correlacionado con una disminución de sMICA en circulación y un aumento de la capacidad citotóxica de células NK y de linfocitos T CD8⁺. Se vio que estos Ac que eran capaces de opsonizar las células tumorales para la presentación cruzada por células dendríticas, lo que a su vez favorece la diversificación de antígenos tumorales reconocidos por el sistema inmune.

Las células mieloides supresoras MDSCs (siglas en inglés de *Myeloid-Derived Suppressor Cells*) son otra población heterogénea de células con roles fisiológicos que pueden ser reclutadas por el tumor. Se caracterizan fenotípicamente por la coexpresión de CD11b y Gr-1 en ratones con baja expresión de marcadores de células mieloides maduras y conforman otra población regulatoria que se expande debido a la presencia del tumor [273]. En condiciones fisiológicas, continuamente se generan en la médula ósea células mieloides inmaduras con el mismo fenotipo que las MDSCs que se diferencian finalmente en células mieloides maduras (como macrófagos, CD⁺s y neutrófilos). Sin embargo, diversos factores solubles tales como GM-CSF, G-CSF y M-CSF, que son liberados por el tumor y por células estromales asociadas al tumor, desregulan la maduración de las células mieloides y dan origen a las MDSCs [274]. Las MDSCs están compuestas mayoritariamente por dos poblaciones: células CD11b⁺Gr-1^{high} (MDSC-G) con un fenotipo similar a los granulocitos inmaduros y las células CD11b⁺Gr-1^{low/int} (MDSC-M) con un fenotipo similar a los monocitos inmaduros [273]. Las MDSCs inducidas por el tumor, que se acumulan en médula ósea, sangre y bazo, generan una variedad de citoquinas inmunorregulatorias como TGF-β e IL10, estrés oxidativo a través de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno e inducen la privación de aminoácidos esenciales como arginina y cisteína y triptófano a través de la producción de la enzima IDO [275, 276]. De esta manera, suprimen la proliferación de los LT y favorecen la progresión tumoral [277].

INMUNOTERAPIAS

La plétora de mecanismos de escape, que les permite a las células tumorales evadir la respuesta inmune antitumoral provee al mismo tiempo blancos terapéuticos farmacológicos con el fin de restaurar la capacidad del sistema inmune de eliminar eficazmente los tumores.

La **Figura 7** resume, en verde, los blancos terapéuticos que se busca estimular y, en rojo, aquellos que se desea inhibir durante las distintas etapas del orquestado de la respuesta inmune antitumoral.

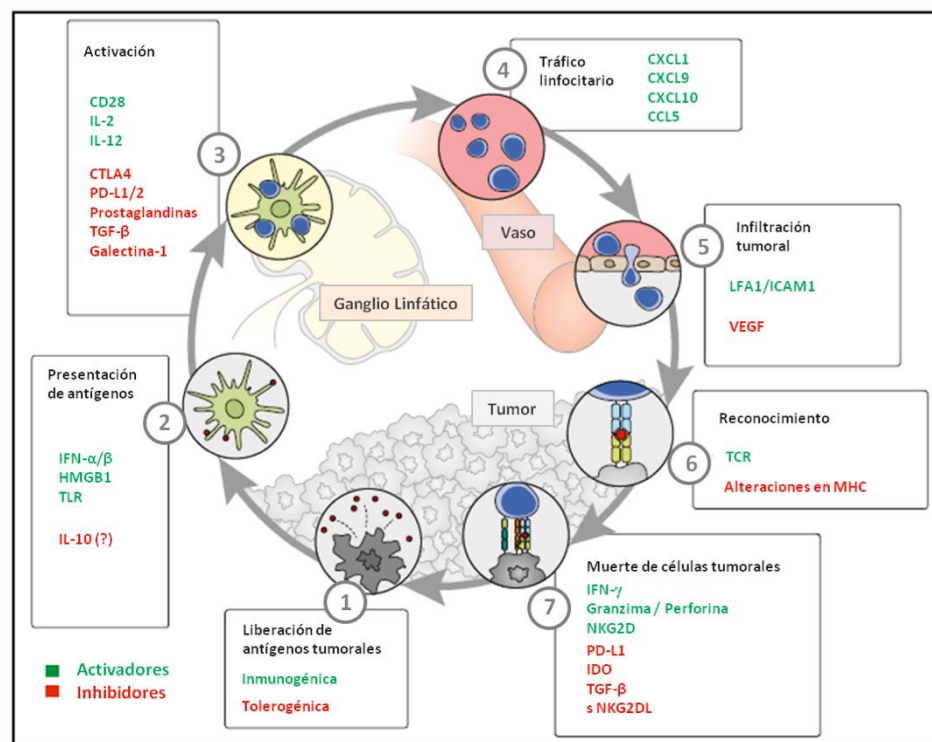


Figura 7: Blancos terapéuticos para modular la inmunidad antitumoral. Cada etapa del circuito de la inmunidad antitumoral requiere de la coordinación de numerosos factores tanto activadores (en verde) como inhibidores (en rojo). Todos estos factores representan potenciales blancos terapéuticos, muchos de los cuales ya están siendo estudiados en ensayos clínicos. Modificado de [278].

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

administran oligodeoxinucleótidos CpG que actúan como adyuvantes promoviendo la activación de CD8 a través de TLR9 [279]. Por otra parte, la presentación cruzada de antígenos puede ser estimulada por IFN de tipo I y se demostró que su administración aumenta la retención de antígenos tumorales y la sobrevida de las CD8⁺, favoreciendo así la respuesta de LT CD8⁺ [280]. De manera concordante, el PEG-Intron, un derivado del IFN- α ampliamente utilizado para el tratamiento de hepatitis C, produce un aumento significativo en el índice de sobrevida libre de recidiva en pacientes de melanoma en estadio III y su uso ha sido aprobado en varios países [281, 282]. Asimismo, también se han desarrollado terapias orientadas a activar directamente la respuesta de los LT, tales como la administración de IL-2 recombinante aprobada por la FDA en 1992 para tratar el carcinoma avanzado de células renales y el melanoma metastásico [283].

El siguiente desafío es conseguir que los LT infiltren el tumor. Existen agentes quimioterapéuticos, como la dacarbazina, que además de actuar como citostáticos sobre las células tumorales, producen un aumento en la expresión de las quemoquinas CCL5, CXCL9 y CXCL10 que facilitan el reclutamiento de LT, lo que se asoció con mejor control del crecimiento tumoral y mayor sobrevida en pacientes con melanoma [284]. Más allá de que los linfocitos infiltren, que de hecho normalmente lo hacen, es importante que puedan ejercer su función. Es en este terreno donde las inmunoterapias adquirieron especial protagonismo gracias a los “inhibidores de puntos de control”, que fueron reconocidos por la revista *Science* como la Revelación del Año 2013 y que le valieron el premio Nobel de Medicina en 2018 a James P. Allison y Tasuku Honjo.

Aprobados por la FDA, se destacan los inhibidores de las vías de CTLA-4 (Ipilimumab) y de PD-1 (Nivolumab). Como se mencionó previamente, estas moléculas intervienen en diferentes fases de la respuesta inmune para regular la duración e intensidad de respuesta de los LT. CTLA-4 actúa principalmente en la fase inicial de la activación de los LT en los órganos linfoides secundarios y cumple una función primordial poniéndole un freno a la magnitud de la respuesta inmune, mientras que la vía de PD-1/PD-L1 actúa fundamentalmente en la fase efectora de la respuesta inmunológica, evitando el daño tisular colateral durante la respuesta inmune [268, 285]. El hecho de que estas moléculas actúen en distintas fases de la respuesta de los LT explica la diferencia en la incidencia de los efectos adversos que causa la administración de los Ac bloqueantes de estas vías. El uso de Ipilimumab en melanoma produce efectos adversos de grado 3 y 4 en el 15% de los pacientes debido

a la sobre-estimulación del sistema inmune en piel, tracto gastrointestinal, páncreas, hígado, riñones y sistema endócrino, que llegan a ser fatales en el 2% de los casos [286]. En cambio, el Nivolumab tiene beneficios clínicos similares al Ipilimumab, pero con menor toxicidad, produciendo efectos adversos de grado 3 y 4 sólo en el 5% de los pacientes, sin casos fatales reportados [287].

Si bien estos resultados son muy prometedores, muchos pacientes no se benefician con el uso de estas inmunoterapias y los beneficios en supervivencia de los pacientes que reciben estos tratamientos aun en algunos casos es bajo [287, 288]. Por lo tanto, resulta necesario el estudio de nuevas moléculas que sean potenciales blancos terapéuticos y de nuevos biomarcadores que permitan seleccionar a los pacientes candidatos para estas terapias. Y en definitiva, para el diseño de inmunoterapias contra el cáncer, cualquiera sea el mecanismo por el cual funcionen, el objetivo último es siempre el mismo: restablecer un sistema inmune competente incluyendo la efectividad de sus células efectoras antitumorales [289]. En este contexto, un tratamiento orientado al eje NKG2D-NKG2DLs cobra particular importancia.

EL EJE NKG2D-NKG2DLs COMO BLANCO DE INMUNOTERAPIAS

Como se comentó antes la presencia de Ac anti-MICA contribuye al efecto antitumoral de otras terapias [271, 272] y actualmente es posible estudiar si el tumor de un paciente expresa MICA. Aunque la expresión en superficie de MICA en células normales no es tan restringida como se creía antes [151], en estos tejidos, MICA se localiza mayoritariamente dentro de la célula. Por lo tanto, si se diseñara una terapia dirigida contra MICA, no se espera que se desencadene una fuerte respuesta contra el tejido sano en ausencia de otras señales activadoras [169]. Además, debido a que los niveles de NKG2DLs solubles se asocian al tamaño tumoral, la eficacia de una eventual terapia dirigida contra el eje NKG2D/NKG2DLs se podría monitorear midiendo los niveles de NKG2DLs solubles y de Ac específicos.

Con estas ideas en mente, nos propusimos generar un sistema capaz de inducir la producción activa de Ac anti-MICA, los que podrían tener múltiples beneficios al promover la depuración de sMICA, la restauración de la expresión de NKG2D en células NK y linfocitos T debido a esta depuración y la promoción de CCDA por unión de los Ac anti-MICA a las células tumorales. Sin embargo, como se verá en

el transcurso de la tesis, MICA no es intrínsecamente demasiado inmunogénica.

Por ello, con el objeto de inducir tales Ac es esencial buscar un adyuvante adecuado. En el siglo XIX, William Coley trató tumores inoperables con lisados bacterianos [290] cuyo efecto se demostró más tarde que era mediado por PAMPs. Charles Janeway demostró que las respuestas de la inmunidad adaptativa son precedidas por fuertes respuestas de la inmunidad innata [291]. Uno de los adyuvantes más utilizados en modelos murinos es el adyuvante de Freund. Éste existe en dos presentaciones: incompleto (IFA, por sus siglas en inglés), que consta solo del aceite mineral y completo (CFA, por sus siglas en inglés) que contiene *M. tuberculosis* inactivada. Sin embargo, a pesar de la irritación que produce su administración y de su elevada toxicidad, ha sido usado en casi 100 formulaciones de vacunas antitumorales considerando el costo/beneficio, aunque con poco éxito, mayormente debido a que las células del sistema inmune son reclutadas fuertemente al sitio de la inmunización en vez de ser reclutadas en el tumor, donde se acumulan y finalmente mueren [292]. A la fecha, solo dos adyuvantes han demostrado ser lo suficientemente seguros para su uso en humanos y a la vez eficientes: las sales de aluminio y el MF59. Lamentablemente, tanto el MF59 como las sales de aluminio que sirvieron de adyuvantes por casi 100 años no han tenido éxito en vacunas antitumorales [293, 294]. Teniendo en cuenta la falta de nuevos adyuvantes para vacunas antitumorales y en colaboración con el laboratorio del Dr. Fernando Goldbaum decidimos usar la plataforma ya establecida por ellos de la lumazina sintasa de *Brucella sp.* (BLS, por sus siglas en inglés) con el objeto de crear un inmunógeno capaz de inducir Ac anti-MICA.

BLS es una proteína multimérica compuesta por un monómero de 18 KDa que se pliega formando un dímero de pentámeros muy estable (**Figura 8**). Cada monómero posee casi la mitad de su superficie escondida en la estructura tridimensional de la proteína de manera similar a la estructura formada por la altamente inmunogénica toxina colérica [295].

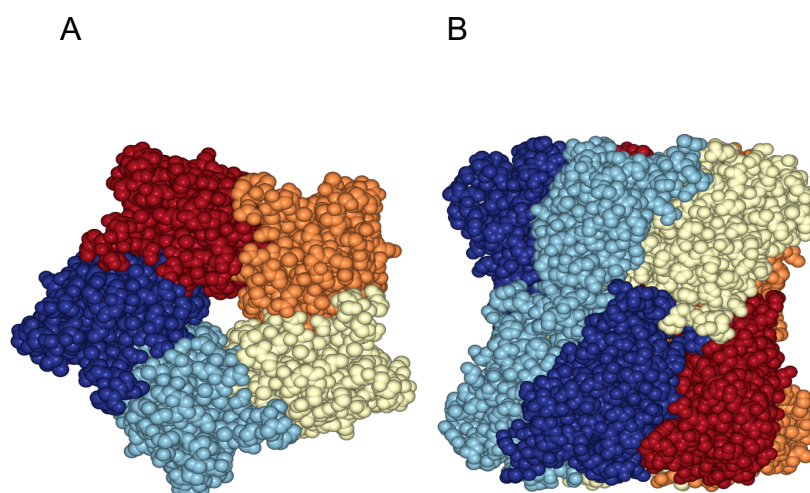


Figura 8: Estructura de BLS. **A)** Pentámero de BLS, donde cada monómero está representado en distinto color. **B)** El dímero de pentámeros de BLS es la conformación nativa de la proteína en condiciones fisiológicas [296]. Las estructuras de **A)** y **B)** se modelaron utilizando NGL según el algoritmo disponible en <http://www.rcsb.org> descrito en [297].

Esto le da a BLS una gran estabilidad y la hace resistente a la desnaturalización por urea y por calor (T_m de 84 °C) [296]. Una de las características más interesantes de BLS que la convierte en una herramienta valiosa es que el análisis de su estructura revela que su extremo N terminal tiene una naturaleza desordenada con libertad conformacional y que modificaciones en este extremo no afectan el plegamiento, la estabilidad ni la inmunogenicidad de la proteína [298]. Por ingeniería genética fácilmente puede anclarse cada subunidad de BLS a un antígeno por el extremo N terminal de cada uno de sus monómeros [296] y emplear esta proteína quimérica como inmunógeno para promover la formación de altos títulos de Ac contra el antígeno en ausencia de otros adyuvantes [299-301]. Este efecto depende de la activación de CDs vía TLR4 [302]. Hallazgos recientes sobre la función de los TLR facilitaron la elucidación de las bases moleculares de la actividad adyuvante [303]. La señalización a través de TLR induce IFNs, quemoquinas, citoquinas proinflamatorias y CDs maduras y estimulan de forma aguda la macropinocitosis de antígenos, lo que conduce a una mejor presentación en las moléculas de clase I y de clase II del CMH [304].

OBJETIVOS

El **objetivo general** de este trabajo fue producir una proteína quimérica entre el inmunógeno BLS y MICA capaz de inducir altos títulos de Ac anti-MICA, evaluar la actividad terapéutica de estos Ac y elucidar los mecanismos subyacentes. Para evaluar los efectos de estos Ac, nos propusimos primero expresar MICA en la superficie de distintas líneas de células tumorales de ratón. Estas líneas fueron utilizadas en ratones C57BL/6 para:

- Evaluar el efecto de una inmunización activa con BLS-MICA sobre el crecimiento tumoral en ratones portadores de tumores que expresan MICA.
- Evaluar si el efecto protector de BLS-MICA se debe a Ac anti-MICA inducidos por el inmunógeno, realizando inmunizaciones pasivas de ratones portadores de tumores con los Ac anti-MICA generados en ratones naïve.
- Caracterizar el infiltrado tumoral para intentar esclarecer los mecanismos subyacentes a la respuesta antitumoral mediada por los Ac anti-MICA.
- Desarrollar un método basado en citometría de flujo (CF) capaz de detectar sMICA en los sueros de ratones portadores de tumor.
- Realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar el rol de la CCDA en el efecto antitumoral de los Ac anti-MICA.

MATERIALES Y MÉTODOS

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE BLS-MICA

La proteína quimérica BLS-MICA, fue construida de la siguiente manera:

La secuencia de BLS se obtuvo por amplificación por PCR con primers específicos para el gen de la lumazina sintasa de *B. abortus* y se clonó en el vector pET11a. Para generar el *cassette*, se realizó mutagénesis dirigida sobre la secuencia codificante de BLS, introduciendo dos sitios de restricción en la región 5' del gen: un sitio de corte para Nsil y otro para AflII.

La secuencia de MICA*001 que codifica para el ectodominio entero fue modificada para ser insertada en el plásmido pET11a-BLS. Para ello se agregó una secuencia río arriba para corte por la enzima Nsil y una secuencia de enlace (*linker*) seguida de un sitio de corte para la enzima AflII. Asimismo, como MICA posee un sitio interno de corte para Nsil, se modificó esta región con una sustitución silenciosa. La secuencia modificada de MICA*001 fue introducida en un plásmido pIDTSMART (IDT Company).

Los plásmidos pET11a-BLS y pIDTSMART-MICA fueron digeridos con 3 unidades de las enzimas Nsil y AflII en NEBuffer2 por 4 horas a 37 °C. Los productos de digestión fueron corridos en geles de agarosa y las bandas con los tamaños esperados fueron cortadas y purificadas usando el kit de extracción QIAquick (Qiagen). Los productos de digestión purificados fueron luego ligados usando 5 unidades de DNA T4 ligasa (New England Biolabs) durante 16 hs a 16°C. La ausencia de mutaciones en la secuencia que codifica la proteína quimérica (**Tabla 1**) fue luego confirmada por secuenciación.

Para la producción de la proteína BLS-MICA, el plásmido pET11a-BLS-MICA fue usado para transformar bacterias competentes *E. coli* BL21-RIPL (DE3). Las bacterias fueron crecidas a 37°C en agar LB suplementado con ampicilina y con agitación (250 rpm). Los cultivos con una densidad óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,7 fueron inducidos con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM e incubados por 4 hs a 37°C con agitación. Luego se centrifugaron las bacterias a 10.000g durante 10 min a 4°C. Las células fueron lisadas por sonicación en buffer de lisis (50mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 40μg/ml DNasa, 1mM PMSF, pH 8,0). Los cuerpos de inclusión con BLS-MICA se solubilizaron por 16 hs en buffer 50mM Tris-HCl, 8M urea, 50mM glicina, pH 8,0 y agitación constante a temperatura ambiente. Luego la proteína solubilizada fue purificada por cromatografía de intercambio aniónico en una columna

de Q sefarosa (Pharmacia, GE Healthcare Life Sciences) en un cromatógrafo HPLC (Dionex Ultimate 3000) conectado a un detector UV/vis. La elución se realizó con un gradiente lineal de entre 0 y 1 M de NaCl en un buffer 50mM Tris-HCl, 8M urea, 50mM glicina, pH 8,0. La fracción con la proteína, determinado por SDS-PAGE, fue dializada en un buffer 50 mM Tris-HCl pH 8, 1M L-arginina, 0,5mM EDTA y 0,02% azida sódica. Luego se purificó BLS-MICA por cromatografía en gel con una columna Superdex 200 (Pharmacia, GE Healthcare Life Sciences) usando un buffer 50mM Tris-HCl pH 8,0, 1M L-arginina, 0,5mM EDTA. Se determinó la presencia de la proteína por SDS-PAGE (Figura 9A).

Finalmente se concentró BLS-MICA usando tubos Vivaspín (Sartorius) y se guardó la proteína concentrada a 4°C. Finalmente se utilizó la proteína para sensibilizar una placa de ELISA y se detectó su presencia utilizando los Ac anti-MICA/B clon 6D4 (Biolegend), el AcMo anti-MICA/B (clon D7) o el AcMo BI24 anti-BLS (Figura 9B).

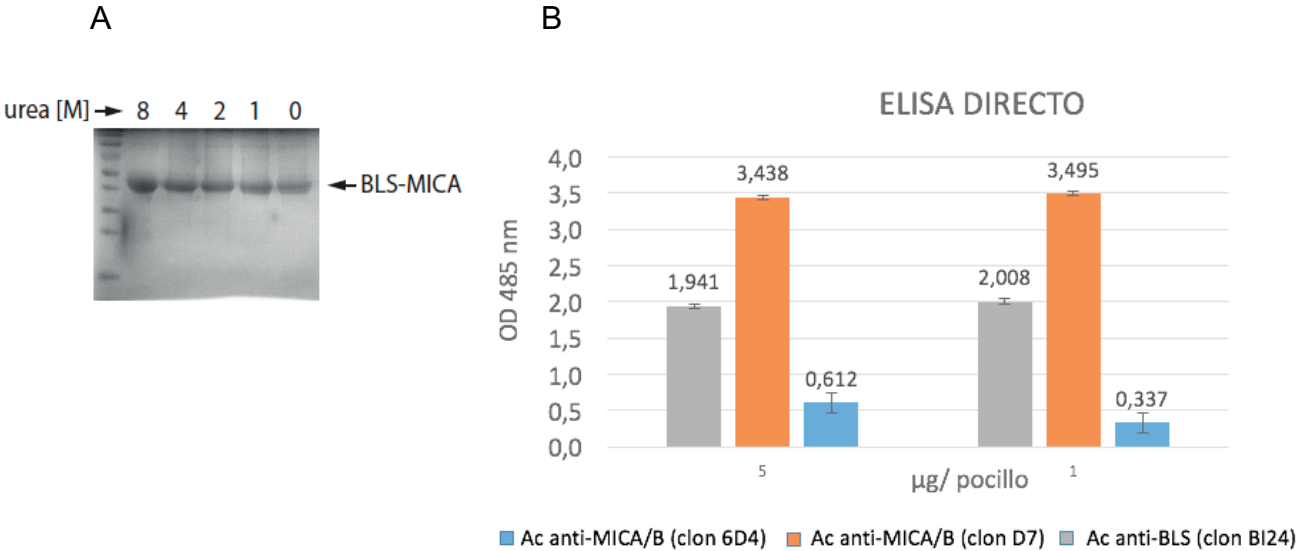


Figura 9: Purificación de la proteína BLS-MICA. A) SDS-PAGE de la proteína BLS-MICA a 8 M, 4 M, 2 M, 1 M y sin Urea. **B)** ELISA directo usando 5 o 1 µg/pocillo de BLS-MICA. La detección se realizó usando el AcMo anti-MICA/B comercial (clon 6D4, Biolegend), el AcMo anti-MICA/B clon D7 obtenido en el laboratorio o AcMo BI24 anti-BLS.

Secuencia de nucleótidos de BLS-MICA

ATGCATGAGCCCCACAGTCTTCGTTATAACCTCACGGTGCTGTCCTGGGATGGATC
TGTGCAGTCAGGGTTTCTCACTGAGGTACATCTGGATGGTCAGCCCTTCCTGCGCT

GTGACAGGCAGAAATGCAGGGCAAAGCCCCAGGGACAGTGGGCAGAAGATGTCCTG
 GGAAATAAGACATGGGACAGAGAGACCAGAGACTTGACAGGGAACGGAAAGGACCT
 CAGGATGACCCTGGCTCATATCAAGGACCAGAAAGAAGGCTTGCATTCCCTCCAGG
 AGATTAGGGTCTGTGAGATCCATGAAGACAACAGCACCAGGAGCTCCCAGCATTTT
 TACTACGATGGGGAGCTCTTCCTCTCCCAAACCTGGAGACTAAGGAATGGACAAT
 GCCCCAGTCCTCCAGAGCTCAGACCTTGCCATGAACGTCAGGAATTTCTTGAAGG
 AAGATGCCATGAAGACCAAGACACACTATCACGCTATGCATGCAGACTGCCTGCAG
 GAACTACGGCGATATCTAAATCCGGCGTAGTCCTGAGGAGAACAGTGCCCCCAT
 GGTGAATGTCACCCGCAGCGAGGCCTCAGAGGGCAACATTACCGTGACATGCAGGG
 CTTCTGGCTTCTATCCCTGGAATATCACACTGAGCTGGCGTCAGGATGGGGTATCT
 TTGAGCCACGACACCCAGCAGTGGGGGGATGTCCTGCCTGATGGGAATGGAACCTA
 CCAGACCTGGGTGGCCACCAGGATTTGCCAAGGAGAGGAGCAGAGGTTACCTGCT
 ACATGGAACACAGCGGGAATCACAGCACTCACCTGTGCCCTCTGGTAGCGGTAGC
 GGTCTTAAGACATCCTTTAAAATCGCATTCATTCAGGCCCGCTGGCACGCCGACAT
 CGTTGACGAAGCGCGCAAAGCTTTGTGCGCGAACTGGCCGCAAAGACGGGTGGCA
 GCGTCGAGGTAGAGATATTCGACGTGCCGGGTGCATATGAAATTTCCCTTCACGCC
 AAGACATTGGCCAGAACCAGGGCGCTATGCAGCCATCGTCGGTGCGGCCTTCGTGAT
 CGACGGCGGCATCTATCGTCATGATTTCTGTGGCGACGGCCGTTATCAACGGCATGA
 TGCAGGTGCAGCTTGAAACGGAAGTGCCGGTGCTGAGCGTCGTGCTGACGCCGCAC
 CATTTCCATGAAAGCAAGGAGCATCACGACTTCTTCCATGCTCATTTCAAGGTGAA
 GGGCGTGGAAGCGGCCCATGCCGCCTTGAGATCGTGAGCGAGCGCAGCCGCATCG
 CGCTTGTCTGA

Secuencia aminoacídica de BLS-MICA

MHEPHSLRYNLTVLSWDGSGVQSGFLTEVHLDGQPFLRCDRQKCRAPQGQWAEDVLG
 NKTWDRETRDLTGNGKDLRMTLAHIKDQKEGLHSLQEIRVCEIHEDNSTRSSQHFY
 YDGELFLSQNLETKEWTMPQSSRAQTLAMNVRNFLKEDAMKTKTHYHAMHADCLQE
 LRRYLKSGVVLRRTPPMVNVTRSEASEGNITVTCRASGFYPWNITLSWRQDGVSL
 SHDTQQWGDVLPDGNQTYQTWVATRICQGEEQRFTCYMEHSGNHSTHPVPSGSGS
 LKTSFKIAFIQARWHADIVDEARKSFVAELAAKTGGSEVEIFDVPGAYEIPLHAK
 TLARTGRYAAIVGAAFVIDGGIYRHDFVATAVINGMMQVQLETEVPVLSVVLTPHH
 FHESKEHHDFFHAHFKVKGVEAAHAALQIVSERSRIALV

Tabla 1: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la construcción BLS-MICA. Arriba: Secuencia de nucleótidos de BLS-MICA. Abajo: Secuencia aminoacídica de BLS-MICA. En verde el ectodominio de MICA*001, en rojo la secuencia de unión y en azul un monómero de BLS.

LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CULTIVO

La línea celular murina EL4 (linfoma de *background* C57BL/6) y las líneas celulares humanas K562 (leucemia mieloide crónica humana) y HCT116 (cáncer de colon humano), fueron obtenidas de ATCC. La línea celular murina MB49 (carcinoma de vejiga de *background* C57BL/6) fue gentilmente cedida por el Dr. Mariano Gabri (Universidad Nacional de Quilmes). Las líneas celulares K562 (leucemia mieloide crónica humana) y HCT116 (cáncer de colon humano) fueron obtenidas de ATCC.

Todas las líneas murinas y la línea HCT116 fueron mantenidas en cultivo en estufa gaseada a 37°C en medio de Eagle con modificación de Dulbecco (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Natocor, Córdoba, Argentina), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, (ambos de Invitrogen) y 40 µg/ml de gentamicina (Bagó) como antibiótico (DMEM completo). La línea K562 fue mantenida en el medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) suplementado con 10% SFB (Natocor, Córdoba, Argentina), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, (ambos de Invitrogen) y 40 µg/ml de gentamicina (Bagó) como antibiótico (RPMI completo).

ANTICUERPOS Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Los siguientes AcMo fueron utilizados: anti-MICA/B AcMo conjugado con PE (clon 6D4, Biolegend), anti-MICA/B biotinilado (clon 6D4, Biolegend), anti-MICA/B (clon D7, desarrollado y producido en nuestro laboratorio [170]), anti-MICA conjugado con AlexaFluor488 (clon 159227, Biotechne), anti-MICB conjugado con APC (clon 236511, Biotechne), anti-F4/80 conjugado con FITC o PE (clon BM8, Biolegend), anti-CD3ε conjugado con PE, FITC o PerCP/Cy5.5 (clon 17A.2; Biolegend), anti-CD8 conjugado con APC (clon 53-6.7, Biolegend), anti-CD4 conjugado con FITC (clon RM4-5; Biolegend), anti-CD11b conjugado con APC o APC/Cy7 (clon M1/70, Biolegend), anti-CD11c conjugado con PE/Cy7 (clon N418, Biolegend), anti-Gr-1 conjugado con PE/Cy7 (clon RB6.8C5, Biolegend), anti-CD45R/B220 conjugado con

PerCP/Cy5.5 (clon RA3-6B2, Biolegend), anti-CD86 conjugado con PE (clon GL-1, Biolegend), anti-CD44 conjugado con PE/Cy7 (clon IM7, Biolegend), anti-CMH-II conjugado con PE/Cy5 (I-A/E, clon M5/114, Biolegend), anti-CD274 conjugado con PE (PD-L1, clon 10F.9G2, Biolegend). Anti-CD44 conjugado con FITC (clon 1M7.8.1, eBioscience) y anti-CD24 conjugado con APC (clon SN3b, eBioscience), IgG2a de ratón (clon MOPC-173, Biolegend).

Para las marcaciones de CF, las células se lavaron con buffer de lavado de citometría (buffer salino de fosfatos, PBS, con 1% de SFB) y se bloquearon durante 15 min en hielo en 20 µl de sobrenadante de cultivo del hibridoma 2.4G2 (ATCC® HB-197™) que contiene un AcMo bloqueante del FcγRII/III. Posteriormente, las células se centrifugaron a 400g durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 20 µl de una dilución de los AcMo acorde a la titulación realizada de cada uno. Luego de 30 min de incubación en hielo y oscuridad, se centrifugaron y resuspendieron en 50-100 µl de PBS. Se utilizaron dos citómetros de flujo: MACSQuant 10 (Milenyi Biotec) equipado con 3 láseres y 10 detectores y FACSCanto II (BD) equipado con 3 láseres, 9 fotomultiplicadores (PMT, por sus siglas en inglés) y un fotodiodo de avalancha (APD, por sus siglas en inglés). Posteriormente, los datos obtenidos fueron analizados con el software Flowjo 10 (Tree Star, BD).

Además, se utilizó un FACS Aria IIu (BD) para la separación de células por citometría (FACS, por sus siglas en inglés) equipado con 3 láseres, 11 PMT y un APD. Las células marcadas como se mencionó anteriormente se resuspendieron en condiciones asépticas en buffer Miltenyi (PBS, pH=7,2 con 0,5% de albúmina sérica bovina y 2 mM de EDTA). El equipo FACS Aria IIu previamente descontaminado fue configurado con el *nozzle* de 70 µm y la cámara de toma de muestra a 4°C para el FACS. Las células aisladas fueron recolectadas en tubos estériles (cuya carga fue previamente neutralizada con SFB puro) conteniendo medio de cultivo suplementado con 20 % de SFB. La pureza de las células obtenidas fue siempre mayor al 90%.

RATONES

Se utilizaron ratones C57BL/6 de entre 6 y 12 semanas dependiendo del experimento, cuyos progenitores provinieron del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata. Machos y hembras fueron utilizados indistintamente de manera balanceada en los experimentos con EL4. En los experimentos con MB49 sólo se utilizaron ratones machos dado que las hembras

rechazan los tumores. La cría y los experimentos fueron realizados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) de acuerdo con las pautas establecidas por el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (*National Institute of Health*, NIH). Los estudios realizados con animales de laboratorio contaron con la aprobación del comité de ética institucional (IBYME-CONICET). En los experimentos en los cuales los ratones requerían anestesia, se utilizó una mezcla de ketamina (100 mg/kg) con xilacina (16 mg/kg) administrada por vía intra-peritoneal (i.p.) En protocolos dolorosos como las cirugías, se administró Tramadol (40 mg/kg) en el agua inmediatamente antes y después del procedimiento. Para minimizar el riesgo de infecciones en la zona de cirugía, la sutura se curó con una solución de Tiomersal y se utilizó enrofloxacina (50 mg/kg) en el agua desde 2 días antes, durante el ensayo y durante 2 días más una vez finalizado el experimento. Los ratones anestesiados fueron mantenidos en camas termostatzadas, alejados de la luz y con gotas oftálmicas en los ojos hasta su recuperación. En los ensayos de crecimiento tumoral a tiempo final, los ratones fueron eutanasiados cuando el volumen tumoral alcanzó los 2000 mm³, al presentar signos de dolor o en el caso de la línea MB49 por ulceración supurante de los tumores.

INMUNIZACIÓN DE RATONES C57BL/6 CON LA PROTEÍNA BLS-MICA

Grupos de 5 ratones C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas fueron inmunizados con PBS como control, 13 µg de MICA recombinante (rMICA), 10 µg de BLS o 20 µg de BLS-MICA (para compensar el peso aportado por BLS) diluidos en 200 µL de PBS por vía i.p. Cuando se usó CFA, las proteínas se diluyeron en 100 µL de PBS y luego se homogeneizó con 100 µL de CFA. Las inmunizaciones se repitieron semana de por medio según el esquema de la **Figura 10**. A las semanas 3 y 5 se realizaron sangrías exploratrices por medio de punción del seno facial con aguja 25G. A la semana 7, la sangría se realizó a blanco con los ratones anestesiados por medio de punción cardíaca. Para obtener los sueros, la sangre recolectada en tubos Eppendorf fue mantenida a 37°C durante 1 h para favorecer la coagulación y durante 4 hs en heladera para favorecer la retracción del coagulo. Luego se aspiró el suero y se guardó a -20°C hasta la determinación por ELISA del título de Ac anti-MICA. Los sueros con títulos de Ac comparables fueron mezclados para su uso en experimentos de inmunización pasiva.

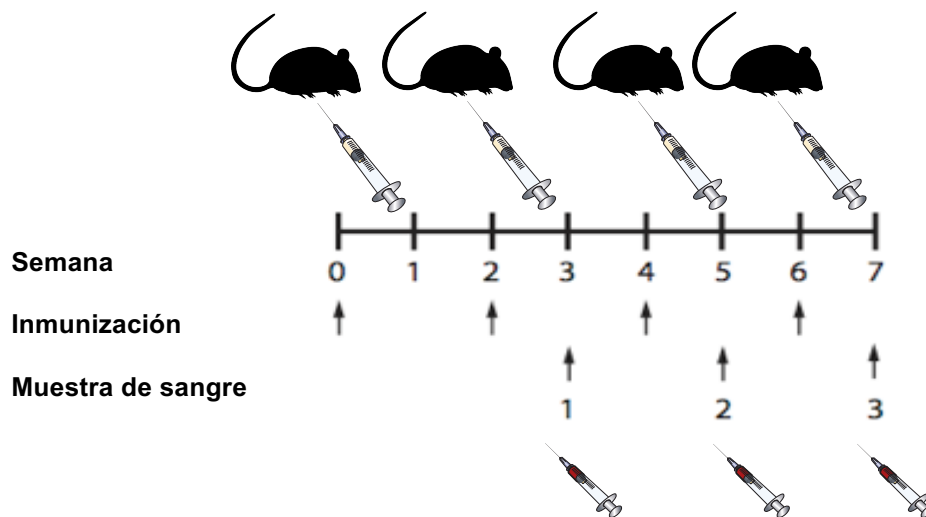


Figura 10: Esquema de inmunización con BLS, rMICA y BLS-MICA. Ratones de entre 8 y 12 semanas fueron utilizados para las inmunizaciones con BLS-MICA, BLS, rMICA o PBS solo; todos con o sin CFA. Las inmunizaciones se realizaron semana de por medio y entre inmunizaciones se extrajo sangre para el dosaje por ELISA de Ac anti-MICA.

El esquema de inmunización con BLS y con BLS-MICA se repitió de la misma manera con otros grupos de ratones de entre 8 y 12 semanas con el fin de obtener volumen de suero para los experimentos *in vivo* e *in vitro*.

PRODUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES DE RATÓN QUE EXPRESAN ESTABLEMENTE MICA

Las líneas celulares EL4 y MB49, se transdujeron con el virus murino de células madre (pMSCV por sus siglas en inglés), un vector retroviral, para expresar los alelos MICA*008 o MICA*019 y también con el virus solo (sin el gen de MICA) para generar las líneas control. Para ello, se cultivaron células empaquetadoras PT67 (ATCC) en medio OPTI-MEM (Gibco) sin antibiótico con los plásmidos pEGFP-N1 (Clontech) y los plásmidos pCMVgag-pol (de proteínas estructurales de citomegalovirus), pMD2.G (de la envoltura del virus VSV) y con los plásmidos virales pMSCV, o pMSCV-MICA*008 o pMSCV-MICA*019 usando FUGENE® HD Transfection Reagent (Promega) en relación 5:1, 3:1 y 1:1. Los plásmidos utilizados se amplificaron en bacterias *E. coli* competentes empleando el método del CaCl_2 y se purificaron con un kit midiprep (Qiagen). Los plásmidos pMSCV, pMSCV-MICA*008 y pMSCV-MICA*019 fueron gentilmente cedidos por la Dra. Alessandra Zingoni y la Dra.

Angela Santoni del Laboratorio de Inmunología Molecular e Inmunopatología del Departamento de Medicina Molecular de la Universidad de Sapienza de Roma, Italia. A las 48 hs se agregó 1 µg/mL de Geneticina (Gibco) y 2 µg/mL de Puomicina (Enzo) para la selección de las células transfectadas. Con un microscopio de fluorescencia (Olympus IX70) realizamos el seguimiento de las transfecciones y se recolectó el sobrenadante durante 2 semanas de aquellos cultivos con mayor número de células EGFP positivas. Los sobrenadantes se filtraron utilizando membranas de 0,22 µm (Microclar), se mezclaron y se ultra-centrifugaron a 40.000g durante 90 minutos a 4 °C. Los stocks virales pMSCV, pMSCV-MICA*008 y pMSCV-MICA*019 se utilizaron para infectar células EL4 y MB49. Para ello, monocapas de células al 70% de confluencia cultivadas en placas de 6 fosas fueron infectadas con 1 mL de sobrenadantes virales en presencia de 8 µg/mL de Polibreno (Sigma Aldrich) durante 2 hs a 4°C para promover la unión de varios viriones a las células y la infección sincrónica. Las células fueron luego cultivadas a 37°C y a las 48 horas se agregó Puomicina a una concentración determinada experimentalmente capaz de matar las células no antes de las 48 hs, a saber: 1 µg/mL para EL4 y 2 µg/mL para MB49. Luego, las células positivas para MICA fueron separadas por FACS y re-infectadas bajo las mismas condiciones. Con una última ronda de FACS seleccionamos aquellas células con mayor expresión de MICA. Los stocks virales se guardaron a -80 °C.

EXPERIMENTOS DE DESAFÍO TUMORAL

Los tumores EL4 o MB49 controles o manipulados para expresar MICA*008 o MICA*019 se inocularon por vía sub-cutánea (s.c.) en el flanco izquierdo de los animales a razón de 2×10^5 células por ratón. El crecimiento tumoral se midió tres veces por semana usando un calibre digital. Para calcular el volumen tumoral se aplicó la fórmula elipsoidal modificada $(\text{largo} \times \text{ancho}^2)/2$. Para los experimentos de inmunización pasiva terapéutica, una vez que los tumores alcanzaron un tamaño palpable, generalmente entre 7 y 10 días después de la inoculación del tumor, los ratones fueron pasivamente inmunizados por vía i.p. con 200µl de una dilución 1/4 de un grupo de sueros de ratones previamente inmunizados con BLS (sueros control) o con un volumen idéntico de un conjunto de sueros de ratones previamente inmunizados con BLS-MICA (sueros anti-MICA) cada dos días y hasta la eutanasia de cada animal como se muestra en la **Figura 11**.



Figura 11: Esquema de inmunización pasiva de ratones portadores de tumores. Ratones de entre 8 y 12 semanas fueron inoculados con 200.000 células tumorales. Cuando el tumor se tornó palpable, los ratones comenzaron con un esquema de inmunización pasiva cada dos días con los sueros control o suero anti-MICA hasta la eutanasia de cada ratón. Los tumores se midieron 3 veces por semana.

En algunos experimentos, se recogieron tumores de animales en el momento de la eutanasia con el fin de analizar la composición del infiltrado celular por CF. Para tal fin se extrajeron los tumores, se lavaron con PBS con el objeto de remover el exceso de sangre, se cortaron en pequeños trozos con una tijera quirúrgica de acero y se desagregaron mecánicamente en PBS con 5% de SFB con émbolos de jeringa sobre filtros de nylon con poros de 70 μm en placas de Petri de 60 mm. Luego se resuspendieron en una solución enzimática compuesta por 2% de SFB y 100 U/ml de colagenasa IV (Invitrogen) en RPMI 1640 y se incubó durante 30 min a 37°C con el objeto de realizar la digestión enzimática del tejido. Posteriormente, se centrifugó a 800g durante 5 min, se trató con 3 ml de buffer Amonio-Cloruro-Potasio (ACK, 155 mM de cloruro de amonio y 10 mM de bicarbonato de potasio) durante 5 min y se lavó con 10 ml de PBS estéril o solución fisiológica.

Para experimentos de inmunización terapéutica activa, un día después de la exposición tumoral, los ratones fueron inmunizados por vía i.p. con BLS o con BLS-MICA (10 o 20 μg / ratón, respectivamente) sin adyuvantes cada siete días hasta la eutanasia de cada animal debido al crecimiento tumoral como se muestra en la **Figura 12**.

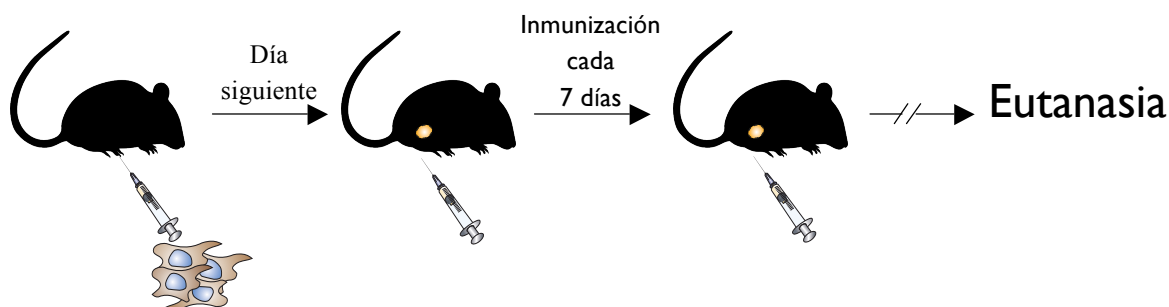


Figura 12: Esquema de inmunización activa en ratones portadores de tumor. Ratones de entre 8 y 12 semanas fueron inoculados con 200.000 células tumorales. Al día siguiente, los ratones comenzaron con un esquema de inmunización activa cada 7 días con BLS o BLS-MICA hasta la eutanasia de cada ratón. Los tumores se midieron 3 veces por semana.

Para experimentos de inmunización profiláctica activa (**Figura 13**), los ratones fueron inmunizados por vía i.p. con BLS o con BLS-MICA (10 o 20 μg / ratón, respectivamente) sin adyuvantes cada nueve o diez días. Se realizaron cuatro inmunizaciones en cada animal. Tres semanas después de la última inmunización, cuando los Ac anti-MICA ya no eran detectables por ELISA, los ratones fueron desafiados con células tumorales MB49-MICA*008. En todos los casos, el crecimiento del tumor se evaluó como se describió previamente. Además, se tomaron muestras de sangre de los ratones. Los animales fueron sacrificados a partir de un tamaño tumoral de 2000 mm^3 o por ulceración de los tumores.

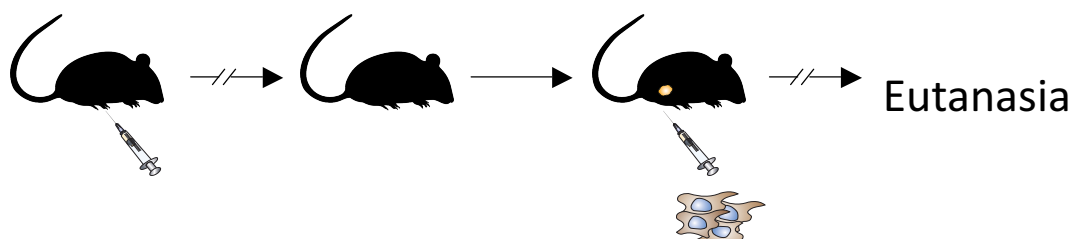


Figura 13: Esquema de inmunización profiláctica activa. Ratones de entre 6 y 8 semanas fueron inmunizados según el protocolo de la **Figura 10**. 3 semanas después de la última inmunización, los ratones fueron desafiados con las líneas tumorales MB49-pMSCV o MB49-MICA*008. Los tumores se midieron 3 veces por semana hasta el momento de la eutanasia.

ELISA

Los ensayos de ELISA para detectar sMICA se realizaron según las instrucciones del fabricante (R&D). Para la medición del título de Ac anti-MICA, se

recubrieron placas de poliestireno (Maxisorb, Nunc) con 1 µg/ml de rMICA*001 en PBS durante 16 hs. Después de bloquear con leche descremada al 5% en PBS durante 1 h a 37°C, las placas se incubaron con diluciones seriadas de sueros de los diferentes ratones durante 1 h a 37°C. Luego se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 al 0,05% y se incubaron con un Ac anti-IgG de ratón acoplado a HRP en una dilución 1/2000 (BioRad) durante 1 h a 37°C. Luego se lavó con PBS-Tween 20 y se reveló con una dilución de tetra-metil bencidina (TMB) en buffer citrato fosfato (pH=5) y H₂O₂. La reacción se detuvo luego de 20-30 minutos por el agregado de H₂SO₄ 2N y se determinó la absorbancia a 450 nm y a 550 nm en un lector de ELISA Versa max (Molecular Devices).

ENSAYOS DE ACTIVIDAD METABÓLICA, PROLIFERACIÓN Y MUERTE CELULAR

Se evaluó la actividad metabólica de las células transducidas por el método del MTS. El método se basa en la reducción de MTS por células viables para generar formazán, un subproducto del MTS soluble en medios de cultivo celular. Esta conversión sólo puede ser llevada a cabo por las enzimas deshidrogenasas dependientes de NADPH en células metabólicamente activas. El formazán producido por las células viables se puede cuantificar midiendo la absorbancia a 490-500 nm. Brevemente, distintas cantidades de células, entre 1.500 y 100.000, fueron incubadas por triplicado en placas de 96 fosas de fondo plano en 200 µL de medio de cultivo. Luego se agregaron 20 µL de MTS por pocillo y se incubó durante 4 hs a 37°C. Seguidamente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de ELISA con agitación Versa max (Molecular Devices).

Para evaluar la capacidad de proliferación de las células, las líneas MB49-pMSCV, MB49-MICA*008, EL4-pMSCV y EL4-MICA*008 fueron marcadas con el reactivo CFSE (por las siglas en inglés de *Carboxy Fluorescein succinimidyl ester*, Thermo Fisher). Se siguieron las instrucciones del fabricante y se evaluó por CF el porcentaje de células positivas para CFSE en cada generación.

Para evaluar los porcentajes de células muertas antes de las inoculaciones, se incubaron las células con el reactivo Zombie Green (Biolegend) según las instrucciones del fabricante y se midió el porcentaje de células *high* y *low* por CF.

AISLAMIENTO DE CÉLULAS NK

Ratones de entre 6 y 10 semanas fueron sacrificados y esplenectomizados y luego los bazoos fueron disgregados para generar la suspensión de esplenocitos. Para aislar células NK empleamos un método de selección positiva mediante marcación con un AcMo anti-CD49b y utilizando un kit comercial de separación inmunomagnético (Miltenyi). La pureza de las células NK se evaluó mediante CF y fue siempre superior a 85%. Las células NK obtenidas fueron lavadas con solución fisiológica y resuspendidas en RPMI 1640 completo.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD *IN VITRO*

Células YAC-1, MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 fueron marcadas con eFluor dye 670 (eBioscience) e incubadas durante 1 h en presencia de los sueros control o sueros anti-MICA. A continuación, se realizó el co-cultivo con las células NK previamente estimuladas durante 16-18 h con condiciones sub-óptimas de las citoquinas IL12 e IL18 (10 ng/mL de cada una, Peprotech) e IL15 (1 ng/mL, PeproTech) y se evaluó la muerte celular luego de 5 hs por marcación con Zombie Aqua (Biolegend) y CF.

ENSAYO DE CITOTOXICIDAD *IN VIVO*

Células MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 fueron marcadas con CFSE o eFluor dye 670, respectivamente y se incubaron durante 1 h en presencia de los sueros control o sueros anti-MICA. Luego se inoculó por vía s.c. en ratones C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas, una mezcla de 200.000 células MB49-pMSCV con 200.000 células MB49-MICA*008. A las 72 hs se removieron los tumores y se analizó por CF el porcentaje de células recuperadas de cada población.

Otro grupo de ratones fue inoculado con 200.000 células MB49-pMSCV incubadas en presencia de sueros control o sueros anti-MICA o con 200.000 células MB49-MICA*008 incubadas en presencia de sueros control o sueros anti-MICA y se monitoreó el crecimiento tumoral. Los ratones que rechazaron los tumores fueron re-desafiados con una mezcla de 200.000 células MB49-pMSCV con 200.000 células MB49-MICA*008 marcadas con CFSE o eFluor dye 670, respectivamente. A las 72 hs

se removieron los tumores y se analizó por CF el porcentaje de células recuperadas de cada población.

ANÁLISIS DE TUMORES *IN SÍLICO*

Para el análisis de la expresión de MICA en tejido normal vs muestras de tumores y para la construcción de curvas de sobrevivencia se utilizó la base R2 (<http://r2.amc.nl>) y se analizaron los grupos de datos indicados en cada figura. El análisis de *Microarrays* de muestras de tumores y cultivos primarios se realizó utilizando GEO2R (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r/>) con los grupos de datos GDS4106, GSE8401, GSE364, GDS2777 y GSE33482 con MICA como *Query* (Affymetrix ID number: 205904_at).

MODELADO DE BLS-MICA Y PREDICCIÓN DE PROPIEDADES

La secuencia de BLS-MICA indicada en la **Tabla 1** se modeló por homología (o modelado comparativo) usando el algoritmo de modelado I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>). Este algoritmo se basa en la búsqueda de estructuras evolutivamente relacionadas (*templates*) para generar un modelo estructural de una proteína de interés (*target*) [305].

Para la predicción de las propiedades de BLS-MICA se utilizó el algoritmo ProtParam [306] (<https://web.expasy.org/protparam/>).

Para predecir los epitopes lineales de LB de MICA se utilizó la herramienta BepiPred, disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/>, con un *threshold* de 0,5 (valor en el cual la especificidad y la sensibilidad son iguales). Para predecir epitopes discontinuos superficiales se utilizó el algoritmo DiscoTope de inteligencia artificial del NIH disponible en <http://tools.iedb.org/discotope> con un *Threshold* de 0,6. Los epitopes encontrados por la herramienta BepiPred sobre MICA se visualizaron con la aplicación PyMol (pymol.org) utilizando la secuencia 1HYR [138] disponible en <https://www.rcsb.org/structure/1HYR>.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se emplearon los tests ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías con pruebas post-hoc de Dunnett o Tukey para comparar el crecimiento tumoral y la expresión de marcadores de superficie celular de células inmunes. Cuando no se requirieron comparaciones múltiples, se usaron pruebas *t* pareadas. Los datos se analizaron usando el software GrapPad Prism 6.0.

RESULTADOS

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA QUIMÉRICA BLS-MICA

Con el objetivo de inducir Ac terapéuticos contra MICA para evaluar su rol en la respuesta antitumoral, clonamos el ectodominio del alelo MICA*001 en un plásmido conteniendo la secuencia del inmunógeno BLS. (**Tabla 1**). Este plásmido fue luego usado para transformar bacterias y producir la proteína recombinante BLS-MICA. Tras la solubilización de los cuerpos de inclusión en los que se acumula BLS-MICA, purificamos la proteína para su utilización en los ensayos realizados para este trabajo de tesis doctoral.

ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA BLS-MICA

Con el objetivo de conocer las propiedades de BLS-MICA antes de comenzar con los primeros experimentos, realizamos el modelado por homología (o modelado comparativo) usando el algoritmo de modelado I-TASSER (<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) que se basa en la búsqueda de estructuras evolutivamente relacionadas (*templates*) para generar un modelo estructural de una proteína de interés (*target*). El proceso típicamente comprende los siguientes pasos: (i) identificación de/los *template*, (ii) selección, (iii) construcción del modelo y (iv) estimación de la calidad del modelo [305]. Si se identifican uno o más *templates*, la información de la alineación del *target* y las secuencias de los *templates* junto con sus estructuras 3D se utilizan para construir un modelo estructural para la proteína de interés y se estima la calidad del modelo calculado. El 86% de la estructura generada pudo ser alineada con proteínas conocidas (**Figura 14**) y obtuvo un Z-score (probabilidad de plegamiento correcto) de 2,34; es decir, una secuencia con una probabilidad significativa de modelado correcto (<1 malo, >1 y <2 bueno, >2 muy bueno) [307].

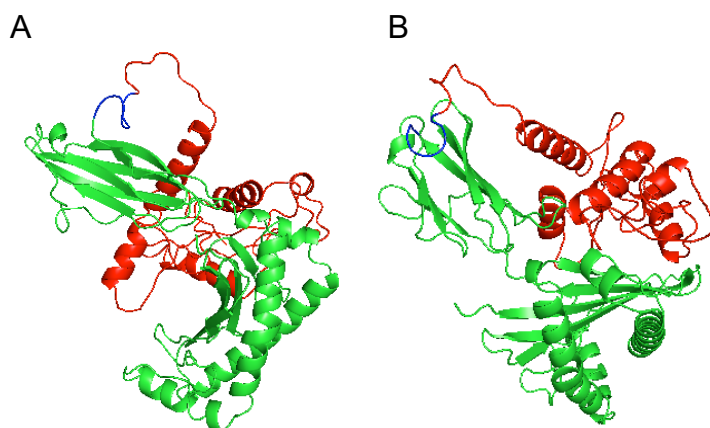


Figura 14: Estructura de la quimera BLS-MICA. A) y B) Vistas desde dos perspectivas diferentes de la predicción de la estructura de un monómero de BLS-MICA según el algoritmo de modelado de I-TASSER [305]. Verde: MICA, Rojo: BLS, Azul: Linker.

Según el algoritmo ProtParam [306] (disponible en <https://web.expasy.org/protparam/>) la estructura de BLS-MICA tiene una vida media estimada *in vitro* de 30 hs y según el índice de estabilidad, la proteína es moderadamente estable a 4°C. Según el algoritmo SCooP [308] (disponible en <http://babylone.ulb.ac.be/SCooP/index.php>) BLS-MICA posee un T_m de 62,3°C, probablemente debido a su índice alifático de 75,60 –definido como la proporción del volumen ocupado por alanina, valina, isoleucina y leucina-; valor relativamente alto para proteínas de organismos mesofílicos [309].

INMUNIZACIÓN DE RATONES C57BL/6 CON LA PROTEÍNA BLS-MICA

Uno de los objetivos principales del proyecto fue evaluar si se podría obtener cantidades elevadas de Ac anti-MICA utilizando la proteína quimérica BLS-MICA. Para ello inmunizamos ratones C57BL/6 de entre 8 y 12 semanas de edad vía i.p. con BLS-MICA según un protocolo de inmunización descrito en la **Figura 10**, en donde los ratones fueron inmunizados semana de por medio y se realizaron sangrías exploratrices en las semanas 3, 5 y 7 con el fin de analizar por ELISA la presencia de Ac anti-MICA. Para poder evaluar si BLS-MICA evoca una respuesta satisfactoria realizamos además inmunizaciones con rMICA, rMICA con CFA y BLS-MICA con CFA, más los controles inmunizados con BLS y BLS con CFA. En los ratones inmunizados con BLS y BLS + CFA no encontramos Ac anti-MICA (**Figura 15A y 15B**, respectivamente), mientras que en los ratones inmunizados con rMICA + CFA la respuesta fue muy baja (**Figura 15C**).

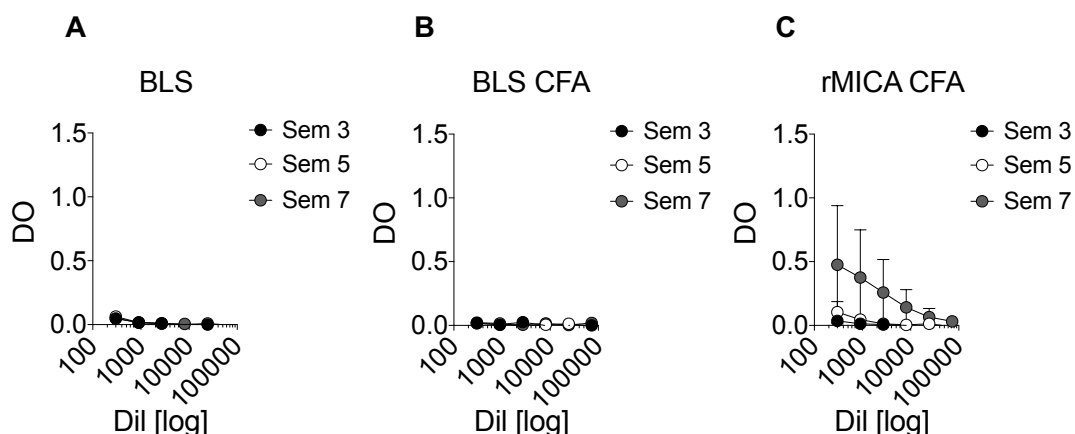


Figura 15: Inmunización de los ratones con rMICA usando CFA como adyuvante. 3, 5 y 7 semanas después de iniciar el protocolo de inmunización se tomaron muestras de sangre a los distintos grupos de ratones inmunizados con **A)** BLS, **B)** BLS + CFA y **C)** rMICA + CFA. Se analizaron los sueros por ELISA en búsqueda de Ac anti-MICA realizando diluciones seriadas los mismos en placas recubiertas con rMICA. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de ELISA (media $\pm$ error estándar de la media) representativos de las inmunizaciones realizadas. n=6 para cada grupo.

En trabajos anteriores se reportó la producción de Ac anti-MICA en ratones y conejos utilizando mayores concentraciones de rMICA, esquemas de inmunizaciones más prolongados, otros adyuvantes y péptidos inmunogénicos [149, 310-312]. En cambio, en humanos los Ac anti-MICA suelen presentarse en pacientes trasplantados [313-316] y en pacientes que responden bien a determinadas inmunoterapias [271, 317].

Sin embargo, el análisis bioinformático de rMICA revela que su estructura no posee características antigénicas intrínsecas fuertes. El algoritmo DiscoTope de inteligencia artificial del NIH (<http://tools.iedb.org/discotope>) es un software para predicción de epitopes discontinuos en la estructura tridimensional de las proteínas comparando la estructura cristalográfica de la misma con una base de datos de interacciones de epitopes/Ac conocidos por métodos cristalográficos [318, 319]. El análisis de la estructura cristalográfica de MICA con el algoritmo DiscoTope mostró que solo unas pocas porciones de MICA son probables epitopes antigénicos discontinuos (**Figura 16A y B**). Mientras tanto, el análisis de la secuencia de MICA con la red neuronal BepiPred disponible en <http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred-2.0/> [320] mostró que de las 4 regiones encontradas por la predicción de la secuencia y estructura tridimensional, solo 3/4 de estas regiones se encuentran en zonas de hélices super-enrolladas expuestas, que son las porciones con mayor probabilidad de unirse a Ac (**Figura 16C y D**).

Figura 16: Predicción de epitopes antigénicos. A) Score de antigenicidad en función de la posición en la secuencia aminoacídica de MICA según la predicción del algoritmo DiscoTope. Unas pocas regiones en la superficie de MICA poseen potencial antigénico tridimensional según este algoritmo, que compara la estructura de MICA con la estructura de epitopes conocidos ($p < 0,01$). **B)** En naranja, ubicación de estos posibles epitopes antigénicos tridimensionales. **C)** Predicción de los epitopes lineales basados en la secuencia y estructura de MICA. Sólo 3 de 4 secuencias son epitopes probables (marcados con seguidillas de E en la fila “*Epitopes*”), poseen una conformación de hélices superenrolladas (marcado con seguidillas de C resaltadas en amarillo en la fila “*Structural*”) y se encuentran expuestos en la estructura de la proteína (marcado con seguidillas de E en la fila “*Surface*”). Seguidillas de H (*helix*) resaltada en rosa corresponde a hélices alfa y seguidillas de E resaltadas en celeste corresponde a hojas beta. Seguidillas de B (*buried*) resaltadas en naranja corresponden a zonas internas de la proteína. En cada caso la intensidad del color resaltado indica probabilidad de dicha estructura. (threshold=0,5, $p < 0,05$). **D)** Epitopes encontrados por el algoritmo BepiPred (marcados en rojo) de la proteína MICA (verde) visualizados sobre dos vistas de la estructura cristalográfica de la misma.

De este modo, la quimera BLS-MICA resulta particularmente atractiva para ser empleada como inmunógeno puesto que BLS promueve la formación de altos títulos de Ac debido a en parte la estimulación de TLRs y al aumento de presentación en moléculas del CMH [302-304].

La inmunización de ratones con la proteína quimérica mostró que todos los ratones inmunizados con BLS-MICA o BLS-MICA + CFA (**Figura 17**) desarrollaron niveles de Ac similares, con la ventaja de que, a diferencia de las combinaciones con CFA, BLS-MICA no provoca inflamación peritoneal en los ratones inmunizados.

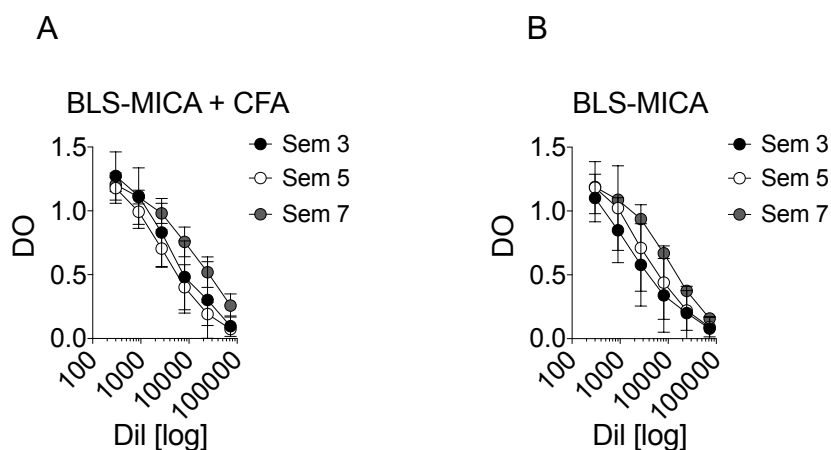


Figura 17: Inmunización de los ratones con BLS-MICA. 3, 5 y 7 semanas después de iniciar el protocolo de inmunización se tomaron muestras de sangre a los distintos grupos de ratones inmunizados con **A)** BLS-MICA + CFA o **B)** BLS-MICA. Se analizaron los sueros por ELISA en búsqueda de Ac anti-MICA realizando diluciones seriadas los mismos en placas recubiertas con rMICA. Los gráficos muestran los resultados de los ensayos de ELISA (media $\pm$ error estándar de la media) representativos de las inmunizaciones realizadas. n=6 para cada grupo.

CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE NKG2D TRAS LA ADMINISTRACIÓN DE BLS-MICA

Como se comentó previamente, se ha descrito que la liberación de sMICA por parte de las células tumorales es capaz de disminuir la expresión de NKG2D en las células del sistema inmune. Debido a que uno de nuestros objetivos a largo plazo es investigar la utilidad de BLS-MICA como terapia para pacientes con tumores que expresan MICA, exploramos si la quimera BLS-MICA inyectada en ratones naïve afecta la expresión de NKG2D de la misma manera que sMICA, partiendo de la hipótesis de que al estar MICA en un complejo con BLS, pudiera ser que sus efectos biológicos sean distintos ya sea por impedimentos estéricos para unirse a NKG2D o porque BLS-MICA es depurado más rápidamente que sMICA. Para ello inmunizamos ratones con BLS-MICA o con rMICA. Antes de la primera inmunización y luego cada 24 horas, tomamos sangre de los ratones por un período de 5 días y analizamos la expresión de NKG2D en células NK y en LT CD8⁺. A las 24 hs, observamos que BLS-MICA y rMICA promovieron una disminución de NKG2D en LT CD8⁺ (**Figura 18**), mientras que esta disminución no se observó hasta el día 3 en células NK. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en los niveles de NKG2D en ninguna de las dos poblaciones celulares en función del tratamiento con rMICA o BLS-MICA sugiriendo que la presencia de BLS en BLS-MICA, comparado con MICA soluble, no afecta diferencialmente la expresión de NKG2D.

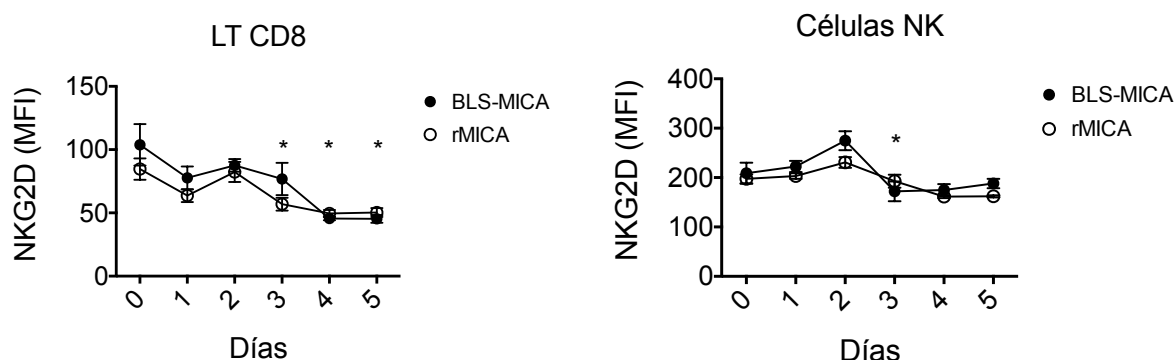


Figura 18: Expresión de NKG2D en LT CD8⁺ y células NK luego de la inmunización con BLS-MICA o rMICA. Expresión de NKG2D en células NK y en LT CD8⁺ en ratones C57BL/6 inmunizados con BLS (n=4) o con BLS-MICA (n=4). Se muestra la media del MFI $\pm$ error estándar de la media de las muestras recolectadas cada día. ANOVA de dos factores, n=4, $p < 0,05$.

TRANSDUCCIÓN DE LÍNEAS CELULARES MURINAS CON MICA

Uno de los objetivos principales de nuestro trabajo fue analizar el efecto terapéutico de los Ac anti-MICA generados mediante la inmunización con BLS-MICA en ratones portadores de tumores. Sin embargo, MICA no se expresa en células murinas por lo que tuvimos que emprender la tarea de modificar genéticamente células tumorales de ratón para que expresen MICA en la superficie celular. Para ello elegimos las células MB49 (carcinoma de vejiga) y EL4 (timoma), ambas de *background* C57BL/6. Como la expresión de MICA se perdía/silenciaba cuando transfectábamos las células con MICA, decidimos utilizar un sistema de vectores retrovirales basados en el virus MSCV. La ventaja de los vectores retrovirales es que el ciclo del virus requiere la integración en el genoma celular, y por consiguiente la de MICA también [321]. Realizamos las infecciones con el vector vacío -pMSCV-, con el vector que contiene MICA*008 -el alelo truncado más frecuente en la población (www.allele frequencies.com)- y MICA*019 -alelo completo prototípico de MICA-. Tras varias rondas de infección y FACS, logramos obtener las líneas con el gen de MICA integrado en el genoma. Sin embargo, la mayor parte del trabajo lo realizamos con las líneas EL4 y MB49. Obtuvimos 6 líneas transducidas con las que seguimos trabajando: EL4-pMSCV, EL4-MICA*008, EL4-MICA*019, MB49-pMSCV, MB49-MICA*008 y MB49-MICA*019. Por CF observamos que todas las líneas transducidas con ambos alelos de MICA expresan niveles comparables a la expresión en la línea

humana HCT116 que expresa MICA naturalmente, y que, al mismo tiempo, las líneas murinas no expresan el ligando relacionado MICB (**Figura 19**).

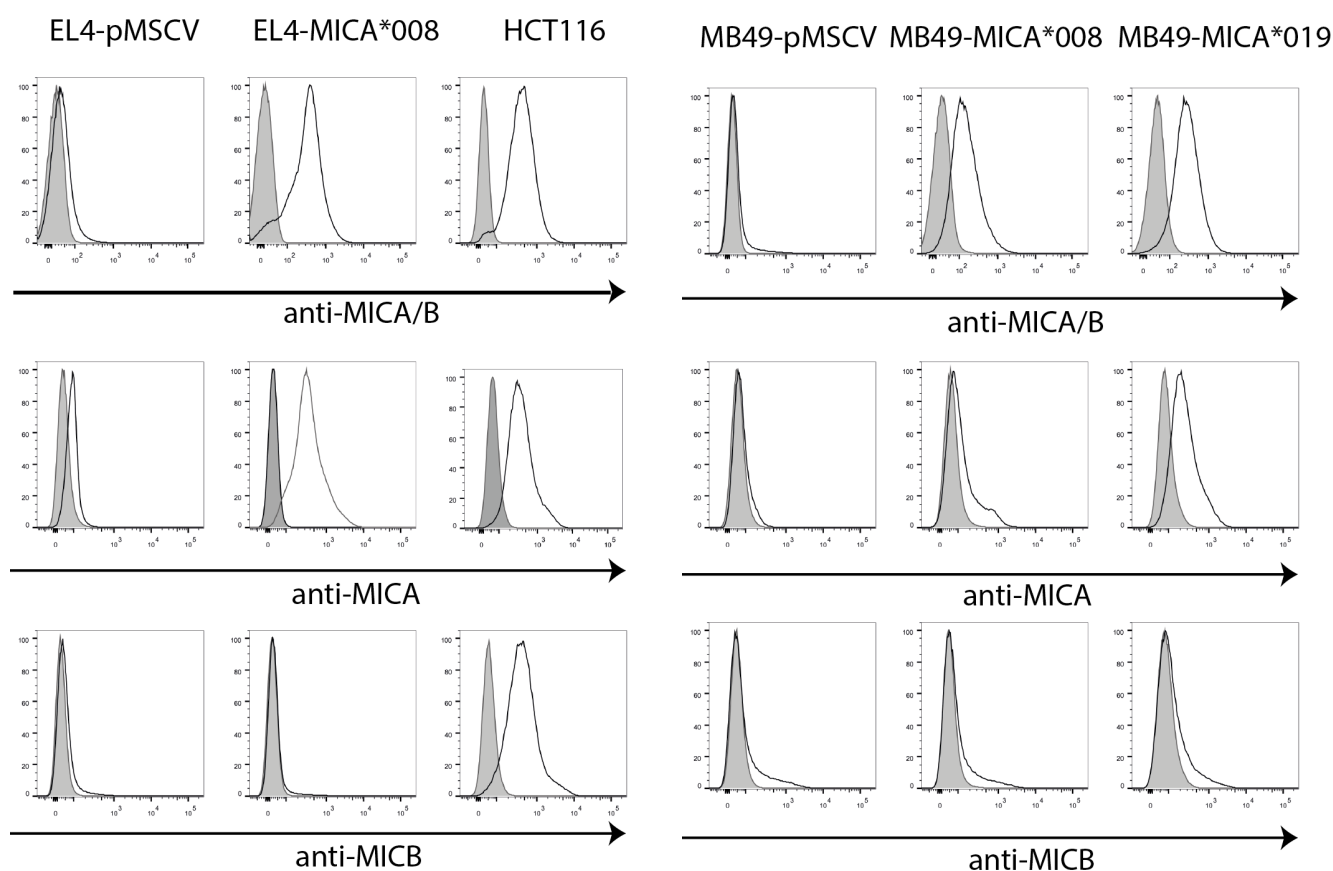
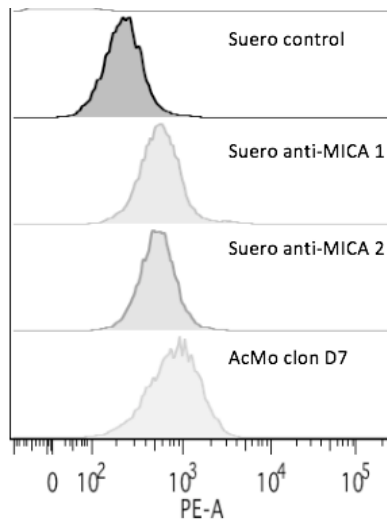


Figura 19: Expresión de MICA en las líneas transducidas. Células EL4 y MB49 fueron transducidas con vectores retrovirales conteniendo MICA*008, MICA*019 o con el vector vacío (pMSCV). La expresión de MICA se analizó por CF usando AcMos contra MICA/B, MICA o MICB (histogramas vacíos). Como control positivo de expresión de MICA, se empleó la línea humana HCT116 que expresa MICA y MICB naturalmente. Histogramas grises, control de Isotipo IgG2a de ratón.

Seguidamente, investigamos si los Ac anti-MICA generados en ratones por inmunización con BLS-MICA son capaces de reconocer MICA nativa expresada en superficie celular. Para ello, realizamos marcaciones de las células transducidas o de la línea K562 (que naturalmente expresa NKG2DLs) con los sueros policlonales y analizamos por CF indirecta la expresión de MICA (**Figura 20**). Como se puede ver en la **Figura 20A**, los Ac generados presentes en mezclas de sueros de ratones inmunizados con BLS-MICA fueron capaces de reconocer MICA expresado naturalmente por la línea humana K562. Además, esta mezcla de sueros policlonales fue capaz también de reconocer MICA en la línea murina MB49-MICA*008 y en la línea humana HCT116 (**Figura 20B**).

A



B

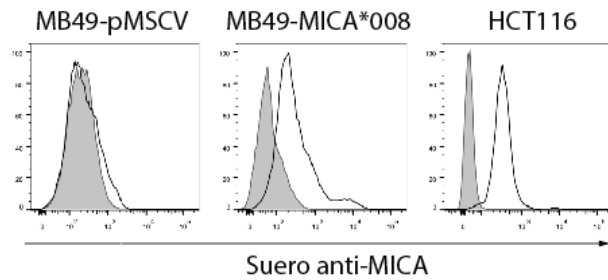
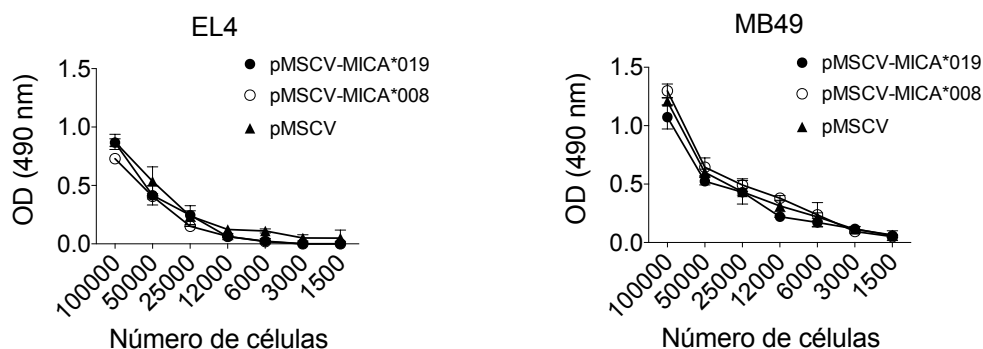


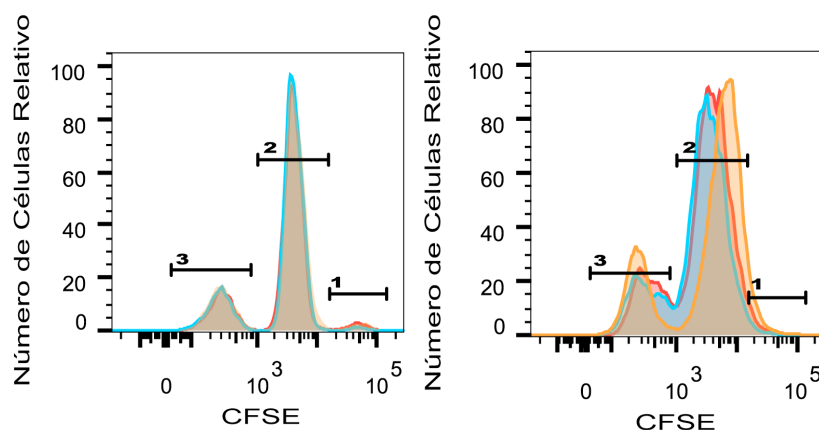
Figura 20: Capacidad de los sueros policlonales generados con BLS-MICA de reconocer MICA en la superficie celular. A) Se corroboró la capacidad de los Ac generados por la inmunización con BLS-MICA de reconocer MICA en células K562 por CF indirecta. Como control se incluyó el suero de ratones inmunizados con BLS (sueros control) para establecer una línea de corte del ruido del sistema y el AcMo desarrollado en nuestro laboratorio anti-MICA/B (clon D7). **B)** La mezcla de sueros anti-MICA reconoció MICA (histogramas vacíos) expresado por la línea murina transducida MB49-MICA*008 pero no reconoció a la línea control MB49-pMSCV, así como también a MICA expresado naturalmente en la línea humana HCT116.

Con el objeto de descartar diferencias de crecimiento entre las líneas transducidas con MICA y las que poseen el vector vacío que pudieran afectar los experimentos *in vivo*, realizamos un ensayo de MTS para evaluar la actividad metabólica de las células y un ensayo de proliferación por el método de dilución de CFSE. Tanto en el caso de EL4-pMSCV, EL4-MICA*008 y EL4-MICA*019 como de MB49-pMSCV, MB49-MICA*008 y MB49-MICA*019 no se encontraron diferencias significativas en la actividad metabólica (**Figura 21A**) así como tampoco en la capacidad de proliferación (**Figura 21B**). Asimismo, antes de inocular las células evaluamos siempre el porcentaje de células muertas presentes en cada cultivo y no encontramos diferencias significativas entre las líneas (**Figura 21C**).

A



B



	Gen 3	Gen 2	Gen 1
EL4 pMSCV	19,4	76,8	3,3
EL4 MICA*008	18,8	77,9	3,0
EL4 MICA*019	19,0	79,3	1,9
MB49 pMSCV	20,0	78,2	1,5
MB49 MICA*008	20,0	78,5	1,2
MB49 MICA*019	19,0	79,3	1,4

C

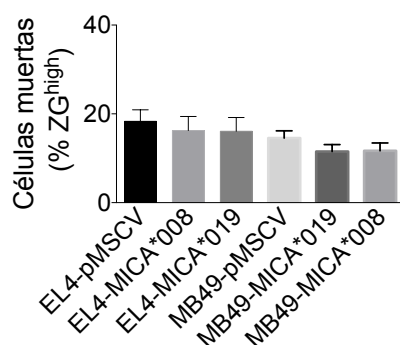


Figura 21: Actividad metabólica y proliferación de las líneas EL4 y MB49. (A) Actividad metabólica evaluada por el ensayo de MTS de las líneas EL4-pMSCV, EL4-MICA*008, EL4-MICA*019 y MB49-pMSCV, MB49-MICA*008 y MB49-MICA*019. **(B)** Proliferación evaluada como porcentaje de células de cada generación (*gates* adyacentes marcados como 1, 2 y 3) marcadas con CFSE de las líneas EL4-pMSCV (histograma amarillo, panel izquierdo), EL4-MICA*008 (histograma rojo, panel izquierdo), EL4-MICA*019 (histograma azul, panel izquierdo) y MB49-pMSCV (histograma amarillo, panel central), MB49-MICA*008 (histograma rojo, panel central) y MB49-MICA*019 (histograma azul, panel central). Los porcentajes de células en cada generación se muestran en el panel de la derecha. **(C)** Porcentaje de células ZG^{high} antes de

las inoculaciones en las líneas EL4-pMSCV, EL4-MICA*008, EL4-MICA*019 y MB49-pMSCV, MB49-MICA*008 y MB49-MICA*019. ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

EFFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL DE LA INMUNIZACIÓN ACTIVA CON BLS-MICA.

Con el objeto de explorar la posibilidad de utilizar BLS-MICA para el tratamiento de individuos portadores de tumores, primero analizamos la posibilidad de realizar una inmunización activa con BLS-MICA o BLS en ratones portadores de tumores, simulando la situación en que un paciente es diagnosticado con un tumor que expresa MICA y que eventualmente se pudiera beneficiar con una terapia basada en la inmunización (vacunación) con BLS-MICA.

Para ello ratones C57BL/6 fueron inoculados con 200.000 células tumorales MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 y un día después, los inmunizamos con BLS-MICA o con BLS. Sin embargo, no observamos diferencias en el crecimiento tumoral entre los grupos de animales tratados con BLS-MICA vs los tratados con BLS (**Figura 22A**). No obstante, observamos que los ratones desafiados con la línea MB49-pMSCV crecen más lento que los ratones desafiados con la línea MB49-MICA*008 y a su vez el crecimiento de los tumores MB49-pMSCV tratados con BLS-MICA fue más lento que el de los ratones MB49-pMSCV. Esto no nos llamó tanto la atención puesto que existen evidencias de que a través de la activación de la vía de TLR4, BLS puede mediar efectos antitumorales [322] indistintamente del péptido al que este conjugada. Sin embargo, sí nos interesó evaluar la diferencia en los crecimientos tumorales entre las líneas que expresan MICA y las líneas control. Debido a que MICA es capaz de mediar inmunosupresión por diferentes mecanismos, los ratones fueron finalmente sacrificados y se analizaron los linfocitos T y células NK de la sangre del día 11 para evaluar si había alteraciones en estas poblaciones celulares. Observamos que los ratones portadores de tumores que expresan MICA tienen un menor porcentaje de células T efectoras CD127⁺KLRG1⁺ (**Figura 22B**) y de células T de memoria efectora CD62L⁺CD44⁺ (**Figura 22C**) significativo. Por el contrario, el porcentaje de células T de memoria central CD62L⁺CD44⁺ (**Figura 22D**) es mayor en los ratones portadores de tumores que expresan MICA.

Mientras tanto, en el compartimiento de células NK, no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células NK maduras CD27⁺CD11b⁺ (**Figura 22E**) ni de células NK en estadio de diferenciación terminal CD27⁺CD11b⁺ (**Figura 22F**).

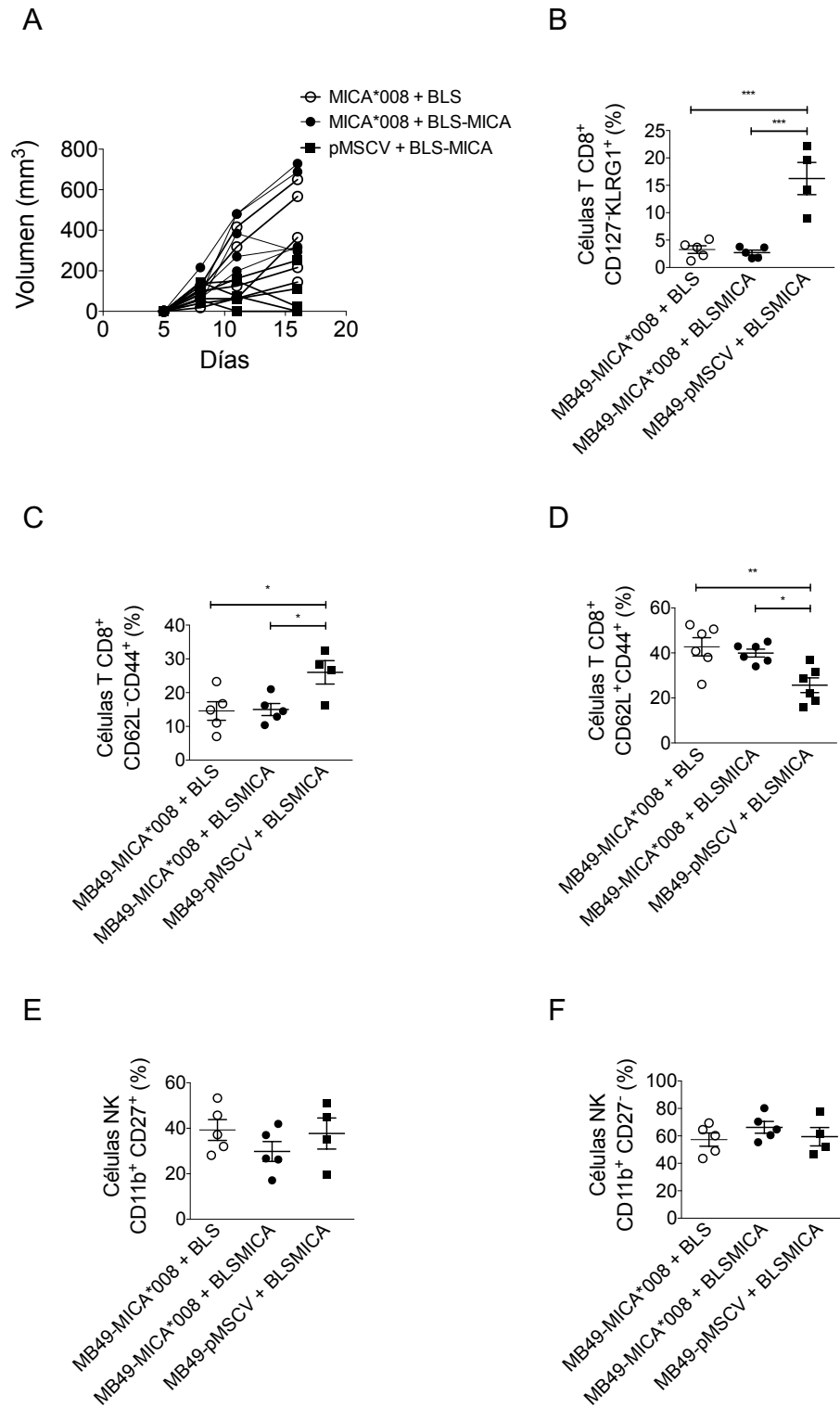


Figura 22: Crecimiento de MB49-pMSCV y MB49-MICA*008 en un esquema de inmunización activa y poblaciones intratumorales. Ratones C57BL/6 fueron desafiados con 200.000 células MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 y un día después, los ratones se inmunizaron con BLS-MICA o con BLS solo con 20 o 10 µg de proteína por ratón, respectivamente. Al día 11 se tomaron muestras de sangre de los ratones para su análisis por CF. **A)** Curva de crecimiento tumoral de los ratones desafiados con las células tumorales e inmunizados activamente con BLS o BLS-MICA. **B)** porcentaje de células T CD8⁺ efectoras CD127⁺KLRG1⁺. **C)** porcentaje de células T CD8⁺ de memoria efectora CD62L⁺CD44⁺ **D)**

porcentaje de células T CD8⁺ de memoria central CD62L⁺CD44⁺ E) porcentaje de células NK maduras CD27⁺CD11b⁺. F) porcentaje de células NK de diferenciación terminal CD27⁺CD11b⁺. Los gráficos muestran la media $\pm$ error estándar. ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

INMUNIZACIONES PROFILÁCTICAS CON BLS-MICA

Considerando que el rápido crecimiento de los tumores podría estar enmascarando un hipotético efecto del tratamiento activo con BLS-MICA, decidimos desafiar ratones C57BL/6 con células MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 y luego de 15 días realizar la resección quirúrgica del tumor visible. Debido a que a partir de ensayos anteriores sabíamos que los ratones operados desarrollaban rápidamente nuevos tumores en el sitio de la operación, al día 16 los ratones fueron tratados día por medio con sueros control o con sueros anti-MICA. Interesantemente, todos los ratones desafiados con 200.000 células tumores MB49-pMSCV -independientemente del tratamiento que recibieron- y los ratones con tumores MB49-MICA*008 tratados con sueros control desarrollaron tumores nuevamente; mientras que solo 2/4 de los ratones con tumores MB49-MICA*008 tratados con sueros anti-MICA desarrollaron nuevos tumores (**Figura 23**).

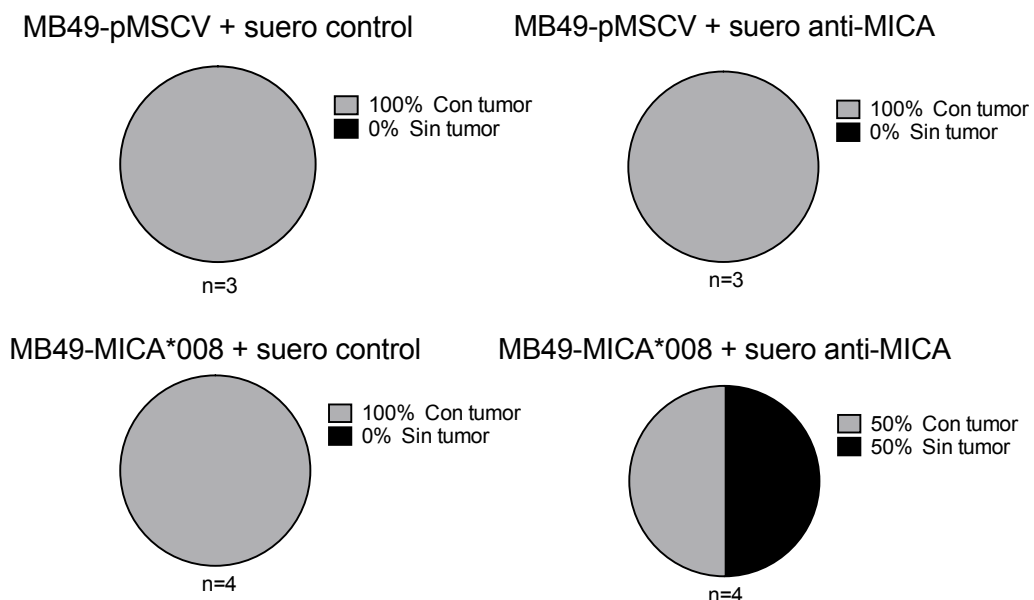
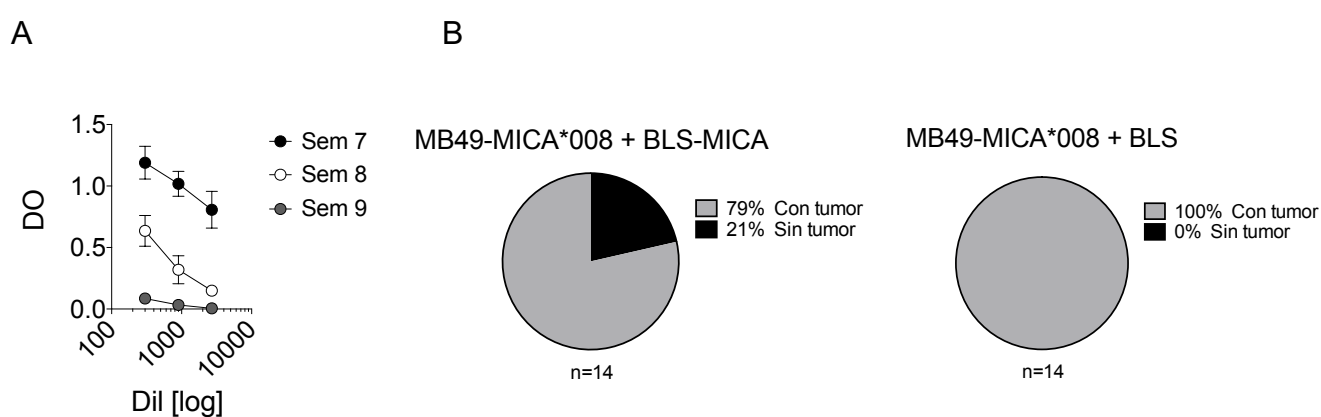


Figura 23: Porcentaje de ratones inoculados con las líneas MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 que desarrollan nuevos tumores luego de la resección quirúrgica del tumor primario y del tratamiento con suero control o suero anti-MICA. Ratones C57BL/6 fueron inoculados con MB49-pMSCV o MB49-MICA*008. Cuando los tumores se tornaron palpables, se extirparon los tumores y se suturó el área de cirugía. Al día siguiente los ratones fueron tratados día por medio con los sueros control o los sueros anti-MICA. Se muestra en los

gráficos de torta el porcentaje de ratones que desarrollaron nuevos tumores tras la resección quirúrgica.

Lamentablemente, la línea MB49 crece sólo en ratones machos y éstos, tras la cirugía requieren cuidados intensivos en jaulas separadas. Debido a la escasez del espacio con el que contábamos en el bioterio de nuestro instituto, no pudimos seguir realizando estos experimentos. Por ello, continuamos trabajando con la línea MB49 transducida con un esquema de inmunización profiláctica con la proteína quimérica. Para estos experimentos, ratones C57BL/6 naïve fueron inmunizados con BLS o BLS-MICA según se describió en **Materiales y Métodos** y luego fueron monitoreados para evaluar la presencia de Ac anti-MICA en el suero. Aproximadamente 2 semanas después de haber terminado el esquema de inmunización, cuando el título de Ac anti-MICA ya no fue detectable (**Figura 24A**), los ratones fueron desafiados con los tumores MB49-MICA*008 por vía s.c. Al día 8 detectamos los primeros tumores en 14/14 de los ratones tratados con BLS y en 11/14 de los tratados con BLS-MICA (**Figura 24B**). Además, en los tratados con BLS-MICA al día 8 sólo 1/14 tumores superaron los 100 mm³ mientras que en los tratados con BLS el 100% de los ratones desarrolló tumores con más de 100 mm³ (**Figura 24C**). El análisis del crecimiento tumoral con este esquema profiláctico reveló que BLS-MICA fue capaz de retrasar el crecimiento significativamente, sugiriendo que el tratamiento con la quimera es capaz de promover una respuesta inmune protectora antitumoral.



C

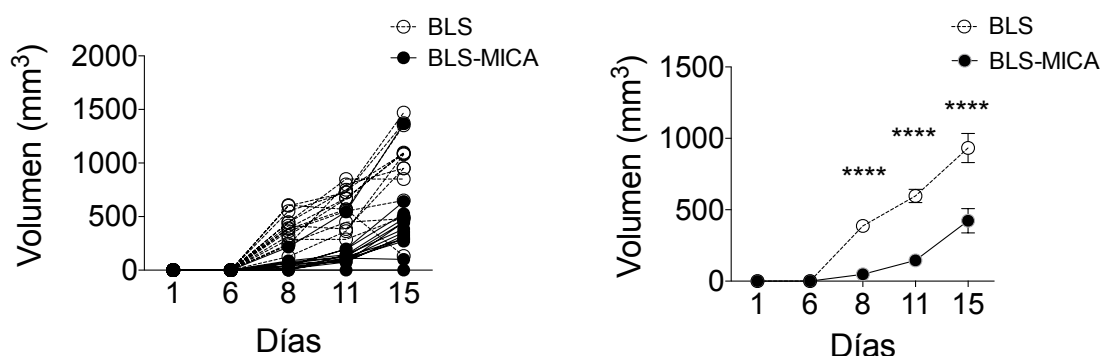


Figura 24: Inmunizaciones profilácticas con BLS-MICA. A) Ratones C57BL/6 fueron inmunizados según el protocolo ya descrito en **Materiales y Métodos**. Se monitoreó por ELISA la presencia de Ac anti-MICA hasta la semana 9 donde los anticuerpos anti-MICA ya no fueron detectables. B) Una vez que los Ac no fueron más detectables, los ratones fueron desafiados con MB49-MICA*008. Se muestra en los gráficos de torta el porcentaje de estos animales que desarrollaron tumor al día 8. C) Izquierda: Curvas de crecimiento tumoral individuales de los ratones inmunizados profilácticamente con BLS o BLS-MICA desafiados con MB49-MICA*008. Derecha: se muestra media $\pm$ error estándar del crecimiento tumoral en función del tiempo en los ratones tratados con BLS vs los tratados con BLS-MICA. ANOVA de dos vías. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DETECCIÓN DE sMICA

Al observar las diferencias en el crecimiento tumoral en el esquema de inmunización activa con BLS y BLS-MICA entre las líneas MB49-pMSCV y MB49-MICA*008, planteamos que esas diferencias podían deberse a la liberación de sMICA por parte de las células MB49-MICA*008. Como se mencionó en la **Introducción**, varios trabajos muestran que los niveles de sMICA y de Ac anti-MICA en suero podrían asociarse con el éxito de una terapia [178, 179, 271, 272]. Lamentablemente, la mayoría de los sistemas disponibles para la detección de sMICA están diseñados para sobrenadantes de cultivos celulares. Utilizando el ELISA de la compañía R&D - validado para sueros humanos- no logramos detectar sMICA en los sueros de los ratones. Por este motivo, decidimos emprender la tarea de desarrollar un nuevo sistema de detección de sMICA por CF. Asimismo, dado que MICA no es el único NKG2DL implicado en mecanismos de escape tumoral, diseñamos un ensayo capaz de detectar al mismo tiempo dos NKG2DLs. Para tal fin bolitas (*beads*) de poli-estireno conjugadas con avidina fueron acopladas al AcMo anti-MICA/B (clon 6D4) biotinilado para generar *beads* de captura capaces unir al mismo tiempo ambos ligandos. Las *beads* fueron luego incubadas con rMICA y rMICB o las muestras de sueros de los

ratones portadores de tumor durante toda la noche a 4°C y luego incubadas con un AcMo anti-MICA conjugado con FITC y un AcMo anti-MICB conjugado con APC capaces de reconocer distintos epitopos en estas moléculas que el Ac de captura (**Figura 25A**). Con este sistema logramos detectar al mismo tiempo MICA y MICB recombinantes, cuyo comportamiento en función de la concentración fue lineal, demostrando que es posible desarrollar un sistema capaz de detectar al mismo tiempo más de un NKG2DL (**Figura 25B**).

A



B

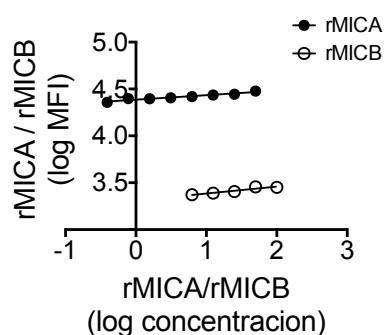


Figura 25: Diseño del sistema de detección de NKG2DLs. **A)** *Beads* de poli-estireno fueron acopladas a AcMos anti-MICA y anti-MICB (*beads* de captura). Luego se incubaron las *beads* de captura con rMICA y rMICB diluidos en suero normal de ratón durante 16 hs a 4°C. Por último, se incubaron las *beads* de captura unidas a rMICA y rMICB con los AcMo anti-MICA conjugado con FITC y anti-MICB conjugado con APC. La detección se realizó por CF. **B)** Comportamiento lineal de la detección de rMICA y rMICB: $Y = 0,048X + 4,39$ $R^2 = 0,94$ y $Y = 0,074X + 3,31$ $R^2 = 0,90$, respectivamente. En particular rMICA pudo ser detectado a concentraciones tan bajas como 300 pg/mL.

Empleando el sistema de detección de sMICA desarrollado, analizamos los sueros de los ratones inmunizados con BLS o BLS-MICA e inoculados con MB49-MICA*008. Observamos que los ratones tratados con BLS-MICA exhibieron significativamente mayor concentración de sMICA que los tratados con BLS (**Figura 26A**), sugiriendo que el tratamiento con BLS-MICA generó una respuesta humoral capaz de neutralizar las moléculas de sMICA liberadas por las células transducidas. Por último, evaluamos si los niveles de sMICA detectados con este sistema en el suero de los ratones correlaciona con el tamaño tumoral. Como se puede observar en la **Figura 26B**, encontramos una correlación positiva significativa ($r= 0,7706$, $p<0,0001$) entre los volúmenes tumorales y los niveles de sMICA.

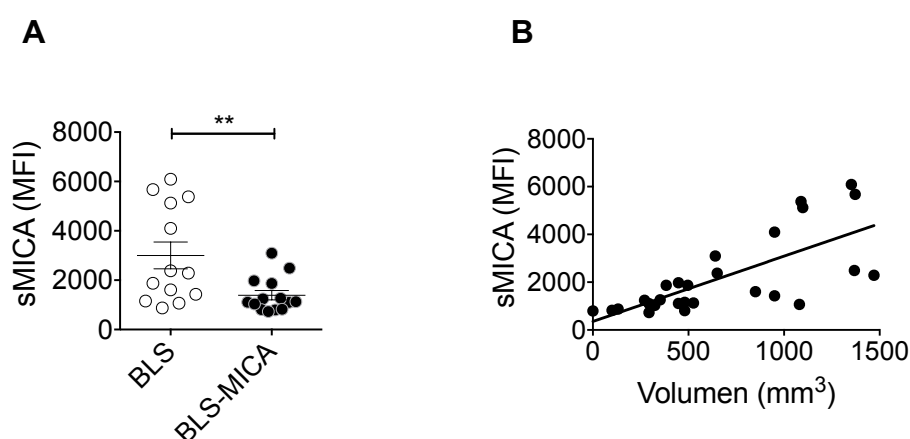


Figura 26: Depuración de sMICA como consecuencia del tratamiento con BLS-MICA. A) Detección por medio del sistema de *beads* por CF de sMICA en los sueros de los ratones inoculados con MB49-MICA*008 tratados con BLS o con BLS-MICA. **B)** Correlación entre el volumen tumoral y cantidad de sMICA medida por CF ($r= 0,7706$, $p<0,0001$).

EFFECTO TERAPÉUTICO DE LOS ANTICUERPOS ANTI-MICA SOBRE EL CRECIMIENTO TUMORAL

Con el objeto de evaluar el potencial terapéutico de estos Ac anti-MICA y aprovechando que logramos transducir varias líneas murinas con MICA, desafiamos ratones C57BL/6 con 200.000 células EL4-pMSCV, EL4-MICA*008 o EL4-MICA*019 en el flanco izquierdo por vía s.c. Cuando los tumores se tornaron palpables, realizamos un protocolo de inmunización pasiva por vía i.p. cada dos días con 200 μ L de una dilución $\frac{1}{4}$ de los sueros control o sueros anti-MICA según se detalla en **Materiales y Métodos**. Observamos que no hubo diferencias de crecimiento en los tumores EL4-pMSCV tratados con los sueros control o con sueros anti-MICA (**Figura 27A**). Sin embargo, la inmunización pasiva con el suero anti-MICA indujo un retraso

significativo en el crecimiento de los tumores EL4-MICA*008 y EL4-MICA*019, en comparación con el efecto ejercido por el suero control (**Figura 27B y C**).

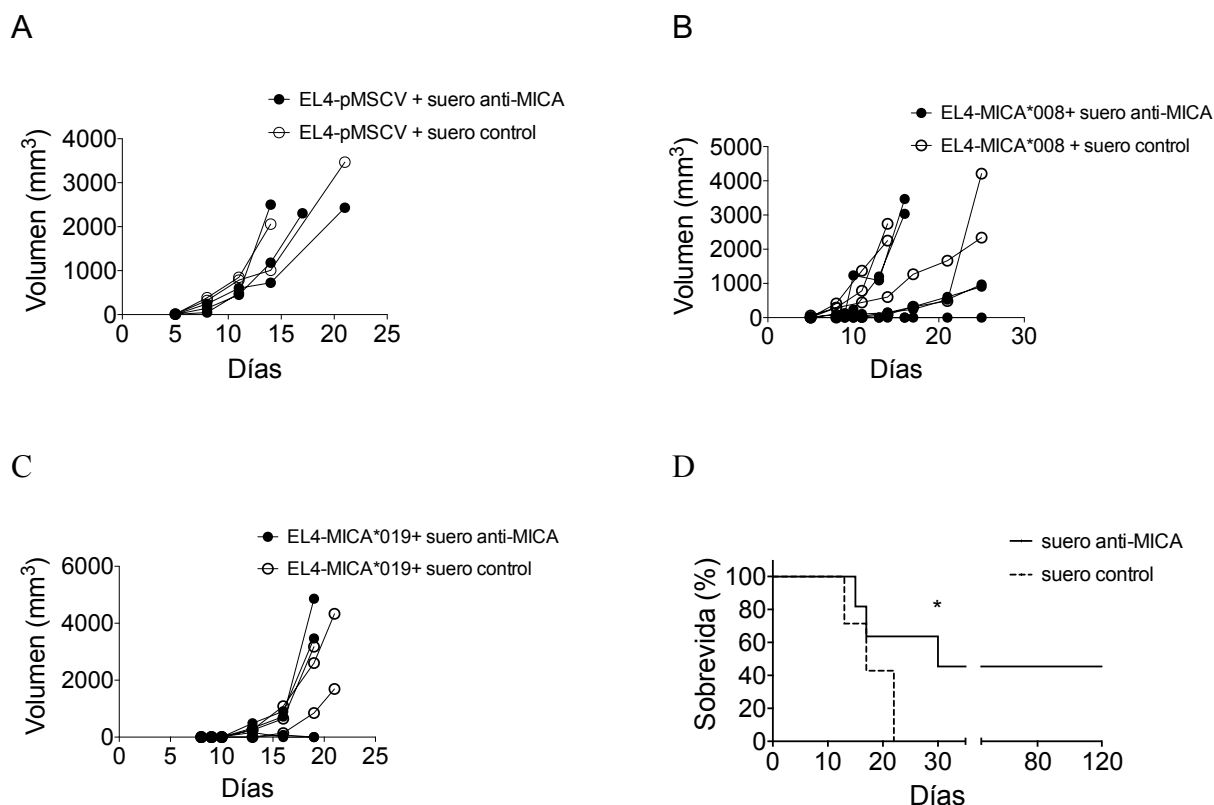


Figura 27: Efecto terapéutico de los Ac anti-MICA sobre el crecimiento de las líneas EL4-pMSCV, EL4-MICA*008 o EL4-MICA*019. Ratones C57BL/6 fueron desafiados con 200.000 células EL4-pMSCV (A), EL4-MICA*008 (B) o EL4-MICA*019 (C) en el flanco izquierdo del ratón, por vía s.c. Cuando los tumores se tornaron palpables, realizamos un protocolo de inmunización pasiva i.p. cada dos días con 200 μ L de una dilución $\frac{1}{4}$ del de suero control o con el suero anti-MICA y seguidamente analizamos el volumen tumoral a lo largo del tiempo. Se muestra también el análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones inoculados con EL4-MICA*008 y EL4-MICA*019 combinados tratados con sueros control o sueros anti-MICA (D). Log-rank (Mantel-Cox) test $p < 0,05$.

Sorprendentemente, en los ratones tratados con sueros anti-MICA del grupo desafiado con EL4-MICA*008, 2/7 ratones no desarrollaron tumor palpable y 1/7 desarrolló un tumor que luego regresionó completamente. Del grupo de ratones desafiados con EL4-MICA*019 y tratados con sueros anti-MICA, 2/4 desarrollaron tumor, pero luego regresionaron completamente. Cabe destacar que al momento de realizar la eutanasia del último ratón con tumor, los ratones que rechazaron los tumores dejaron de recibir suero anti-MICA. En solo uno de estos ratones, al día 35, detectamos un tumor. El resto de los ratones fueron mantenidos durante 2 meses en

seguimiento sin presentar síntomas de la enfermedad, indicando que el tratamiento con los sueros logró promover la remisión efectiva de los tumores. El tratamiento con los sueros anti-MICA no sólo disminuyó el tamaño de los tumores, sino que además este efecto se tradujo en un aumento significativo en la sobrevida de los ratones respecto de los tratados con sueros control según se puede ver en el análisis de Kaplan-Meier (**Figura 27D**).

En cuanto a la línea MB49, dado que la disponibilidad de ratones fue siempre un factor limitante debido a que el modelo tumoral de MB49 es exclusivo de machos C57BL/6 [323] y que no encontramos diferencias de crecimiento entre los alelos de MICA*008 y MICA*019, decidimos realizar los experimentos de inmunización pasiva con las líneas MB49-pMSCV y MB49-MICA*008 solamente.

A diferencia de EL4, los tumores MB49 son de crecimiento más lento y difícilmente llegan a volúmenes mayores a 1000 mm³. Sin embargo, también a diferencia de EL4, los tumores MB49 se ulceran con frecuencia y los ratones deben ser sometidos a eutanasia.

Al igual que con los tumores EL4, desafiámos ratones C57BL/6 con 200.000 células MB49-pMSCV o MB49-MICA*008 en el flanco izquierdo del ratón por vía s.c. Cuando los tumores se tornaron palpables, realizamos un protocolo de inmunización pasiva por vía i.p. cada dos días con 200 µL de una dilución ¼ del suero control o del suero anti-MICA según se detalla en **Materiales y Métodos**. En el caso de tumores MB49-pMSCV no encontramos diferencias en el crecimiento entre los ratones tratados con sueros control o con sueros anti-MICA (**Figura 28A**). En el caso de los tumores MB49-MICA*008, los ratones que recibieron sueros anti-MICA mostraron un crecimiento mucho más lento que los que recibieron sueros control (**Figura 28B**).

Asimismo, mientras que al día 21 los ratones del grupo MB49-MICA*008 que recibieron sueros control tuvieron que ser sacrificados debido a la ulceración de los tumores, los ratones tratados con sueros anti-MICA no presentaron ulceraciones. Interesantemente, los tumores MB49-pMSCV, al igual que los ratones con tumores MB49-MICA*008 tratados con sueros anti-MICA no se ulceraron tan rápidamente. Asimismo, en algunos ratones inoculados con la línea MB49-MICA*008 tratados con sueros anti-MICA, el volumen tumoral tendió a disminuir con el tiempo hasta que se estabilizó (**Figura 28B**). Si consideramos el día del sacrificio para el análisis de Kaplan-Meier de sobrevida, los ratones portadores de tumores MB49-MICA*008 tratados con los sueros anti-MICA presentaron una reducción significativa en la

mortalidad (**Figura 28C**). Sin embargo, a diferencia del modelo EL4, los tumores MB49 no llegaron a rechazarse con un esquema de inmunización pasiva.

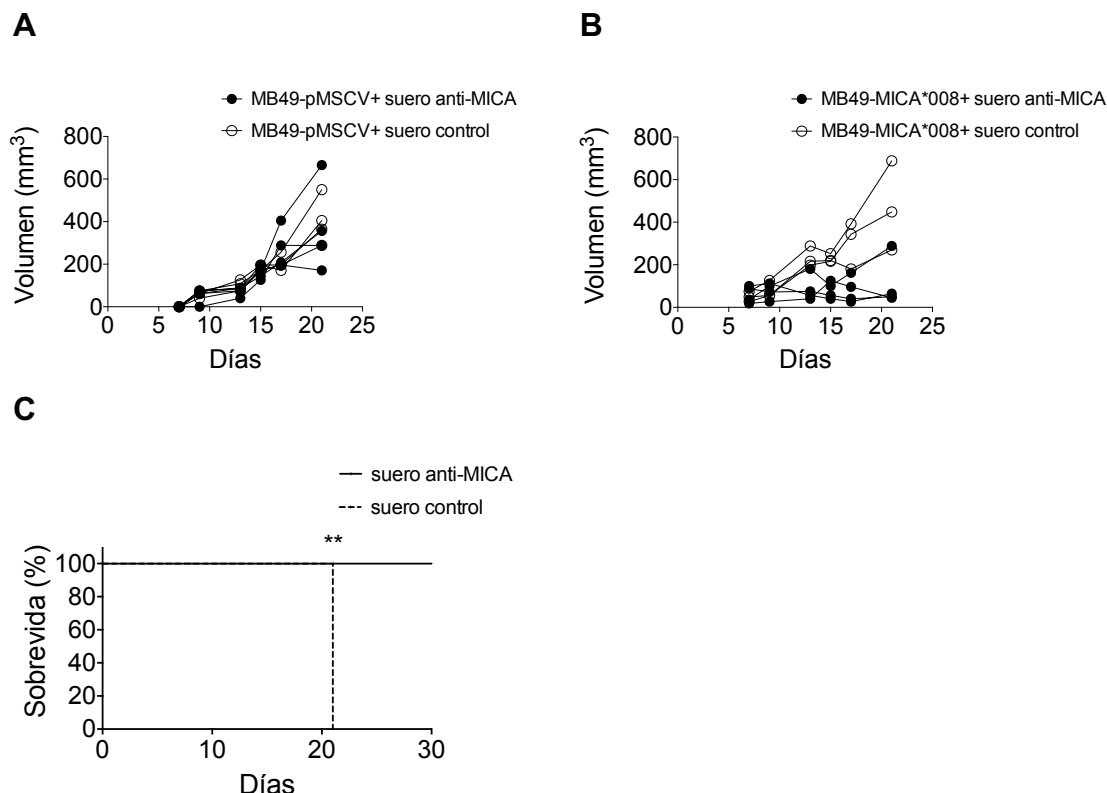


Figura 28: Efecto terapéutico de los Ac anti-MICA sobre el crecimiento tumoral de MB49. Ratones C57BL/6 fueron desafiados con 200.000 células MB49-pMSCV (**A**) o MB49-MICA*008 (**B**) en el flanco izquierdo del ratón por vía s.c. Cuando los tumores se tornaron palpables, realizamos un protocolo de inmunización pasiva i.p. cada dos días con 200 μ L de una dilución $\frac{1}{4}$ de los sueros control o con una dilución $\frac{1}{4}$ de los sueros anti-MICA y seguidamente analizamos el volumen tumoral a lo largo del tiempo. Se muestra también el análisis de Kaplan-Meier de la supervivencia de los ratones inoculados con MB49-MICA*008 tratados con sueros control o sueros anti-MICA (**C**). Log-rank (Mantel-Cox) test $p < 0,01$.

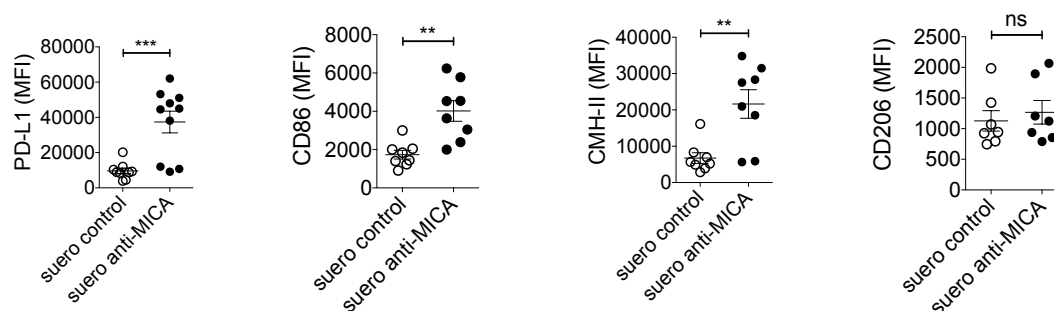
INFILTRADO TUMORAL

Con el objeto de analizar el efecto de los sueros anti-MICA sobre la calidad del infiltrado de células tumorales, utilizamos el modelo tumoral MB49. Nos decidimos a utilizar este modelo y no el EL4 porque los tumores MB49 no se rechazan en los ratones tratados con sueros anti-MICA lo cual lo convierte en un modelo más cercano a la clínica y porque al ser de crecimiento más lento, al momento de sacrificar los animales para el análisis por CF todos los grupos experimentales se encuentran completos sin que ningún ratón haya tenido que ser sacrificado antes por un volumen tumoral excesivo. Consecuentemente, para analizar el infiltrado tumoral inoculamos

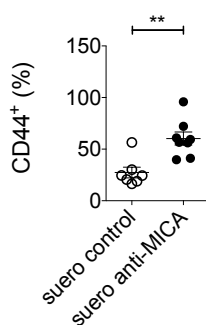
ratones C57BL/6 con MB49-pMSCV o MB49-MICA*008. Cuando el tumor fue palpable comenzamos con el esquema de inmunizaciones descrito previamente. A los 12 días post-inoculación se sacrificaron los animales y se procedió a extirpar y procesar los tumores para su análisis por CF.

Observamos que los ratones que recibieron sueros anti-MICA mostraron macrófagos intra-tumorales (células CD11b⁺F4/80⁺) con mayor expresión de CD274 (PD-L1), CD86 y CMH-II; pero una expresión similar de CD206 que los ratones que recibieron sueros control, lo que sugiere una mayor polarización hacia un fenotipo M1. (**Figura 29A**). Este efecto fue acompañado por un mayor porcentaje de células T CD3⁺CD8⁺CD44⁺ infiltrantes (**Figura 29B**), caracterizadas en la literatura como células T CD8⁺ con experiencia antigénica. Estos resultados indican que los Ac anti-MICA inclinan el equilibrio de las células infiltrantes del tumor hacia un fenotipo antitumoral/pro-inflamatorio. Extrañamente, en los ratones tratados con los sueros control encontramos CDs con mayor expresión del marcador de activación CD86 (**Figura 29C**), quizás debido a que en los ratones tratados con sueros anti-MICA estas células dendríticas CD86^{high} migraron al ganglio drenante donde interactuaron con los LT naïve. En cuanto a la presencia de MDSCs Gr1^{high} o Gr1^{low} (**Figura 29D**), no encontramos diferencias entre los tratamientos con sueros control o sueros anti-MICA.

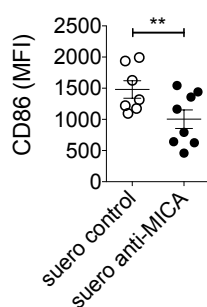
A



B



C



D

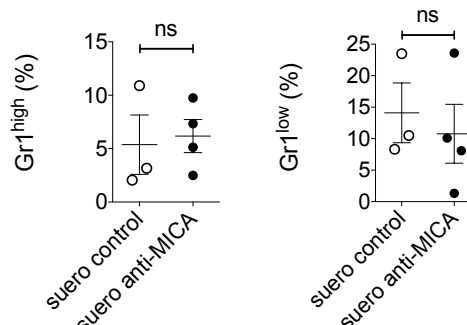


Figura 29: Infiltrado de los tumores MB49-pMSCV y MB49-MICA*008 tratados con sueros control o sueros anti-MICA. Ratones C57BL/6 fueron desafiados con 200.000 células MB49-pMSCV o MB49-MICA*008. Cuando el tumor fue palpable comenzamos con el esquema de inmunizaciones descrito previamente. A los 12 días post-inoculación se sacrificaron los animales y se procedió a extirpar y procesar los tumores para su análisis por CF. **A)** Macrófagos intratumorales definidos como células CD11b⁺F4/80⁺. Se analizó la expresión de CD274 (PD-L1), CD86, CMH-II y CD206. Suero control: n=10. Suero anti-MICA: n=10. **B)** Linfocitos T CD8 definidos como células CD3⁺CD8⁺CD4⁻. Se analizó la expresión del marcador CD44. Suero control: n=7. Suero anti-MICA: n=8. **C)** CD8 definidas como células CD11c⁺NKp46⁻B220⁻CD3⁻. Se analizó la expresión del marcador CD86. Suero control: n=7. Suero anti-MICA: n=8. **D)** MDSCs definidas como células Gr1⁺CD11b⁺. Se analizaron los porcentajes de células Gr1^{high} y Gr1^{low}. Suero control: n=3. Suero anti-MICA: n=4. Los gráficos muestran la media $\pm$ error estándar. Test *t* de Student. * *p*<0,05; ** *p*<0,01; ****p*<0,001, *****p*<0,0001.

CCDA IN VITRO E IN VIVO

En los experimentos anteriores encontramos que los Ac anti-MICA generados son capaces de retrasar el crecimiento tumoral e incluso promover el rechazo del tumor en algunos casos probablemente debido a dos mecanismos distintos: por un lado, los Ac anti-MICA tienen un efecto directo sobre la cantidad de sMICA –que sabemos que es capaz de modular negativamente a través de NKG2D la actividad de células NK y de LT CD8⁺– y por el otro mediante CCDA sobre las células tumorales.

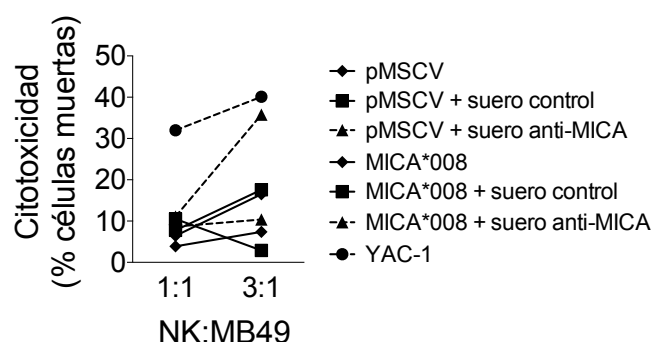
Con el objeto de evaluar la contribución de la CCDA sobre el efecto antitumoral de los Ac anti-MICA, las líneas celulares MB49-pMSCV y MB49-MICA*008 fueron marcadas con eFluor dye 670 y luego incubadas durante 1 h en presencia de los sueros control o de los sueros anti-MICA. Luego las células fueron lavadas e incubadas por 4 hs en presencia de células NK aisladas de ratones C57BL/6 sanos de entre 6 y 10 semanas y se evaluó la muerte celular por marcación con Zombie Aqua y CF (**Figura 30A**).

En este ensayo funcional encontramos niveles basales bajos de citotoxicidad contra las células MB49-pMSCV tanto en la relación 1:1 como en la relación 3:1, probablemente debido a la presencia de moléculas inhibitorias sobre la superficie de las células. Sin embargo, a la relación 3:1, pudimos encontrar un aumento en la CCDA contra las células MB49-MICA*008 en presencia del suero anti-MICA; que no encontramos ni con la línea MB49-pMSCV ni con la línea MB49-MICA*008 tratada con el suero control.

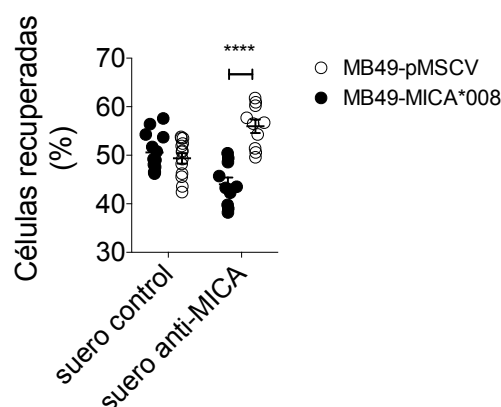
Finalmente, nos propusimos evaluar el rol de la CCDA *in vivo*. Para ello, se marcaron células MB49-pMSCV con CFSE y células MB49-MICA*008 con eFluor dye 670. Las células fueron incubadas por 1 h con los sueros control o con los sueros anti-

MICA y luego lavadas y resuspendidas en PBS estéril. Inoculamos en ratones C57BL/6 sanos de entre 8 y 10 semanas una mezcla de 200.000 células MB49-pMSCV marcadas y 200.000 células MB49-MICA*008 marcadas. A las 72 hs se extrajo la zona alrededor de los focos tumorales por raspado –puesto que los tumores no son visibles– y se evaluó el porcentaje de células recuperadas por CF (**Figura 30B**). Interesantemente, en los ratones que recibieron células tumorales tratadas con sueros control encontramos igual porcentaje de células MB49-pMSCV y MB49-MICA*008. Sin embargo, en los ratones que recibieron células tumorales tratadas con sueros anti-MICA encontramos mayor proporción de células MB49-pMSCV que de MB49-MICA*008, sugiriendo la eliminación preferencial de células MICA⁺ por los Ac por un mecanismo de CCDA. Dada la fuerte inhibición del crecimiento de la línea MB49-MICA*008 en presencia de sueros anti-MICA, indagamos si este efecto era suficiente como para retrasar el crecimiento de los tumores. Para ello, incubamos las líneas celulares en presencia de los distintos sueros y las inoculamos en ratones sanos (**Figura 30C**). En este caso observamos que las líneas MB49-MICA*008 incubadas con sueros anti-MICA no desarrollaron tumor. Sin embargo, tanto células MB49-MICA*008 incubadas con sueros control como células MB49-pMSCV incubadas con sueros control o con sueros anti-MICA, crecieron normalmente, lo que indica que la CCDA constituye un mecanismo eficaz para controlar el crecimiento tumoral de las líneas MICA⁺. Los ratones que fueron inoculados con células MB49-MICA*008 preincubadas con sueros anti-MICA permanecieron libres de tumor durante 2 meses. Sobre estos ratones, decidimos evaluar, si el sistema inmune ante un re-desafío puede controlar por igual a los tumores MB49-pMSCV y MB49-MICA*008. Para ello inoculamos una mezcla de 200.000 células MB49-pMSCV y 200.000 células MB49-MICA*008 en el flanco contrario al que habían recibido el tumor primario. A las 96 horas se extrajo la zona alrededor de los focos tumorales por raspado y se evaluó el porcentaje de células recuperadas por CF. En este caso no encontramos diferencias significativas en el crecimiento tumoral (**Figura 30D**), por lo que suponemos que la propagación de epitopes favoreció la eliminación de ambos tumores por igual.

A



B



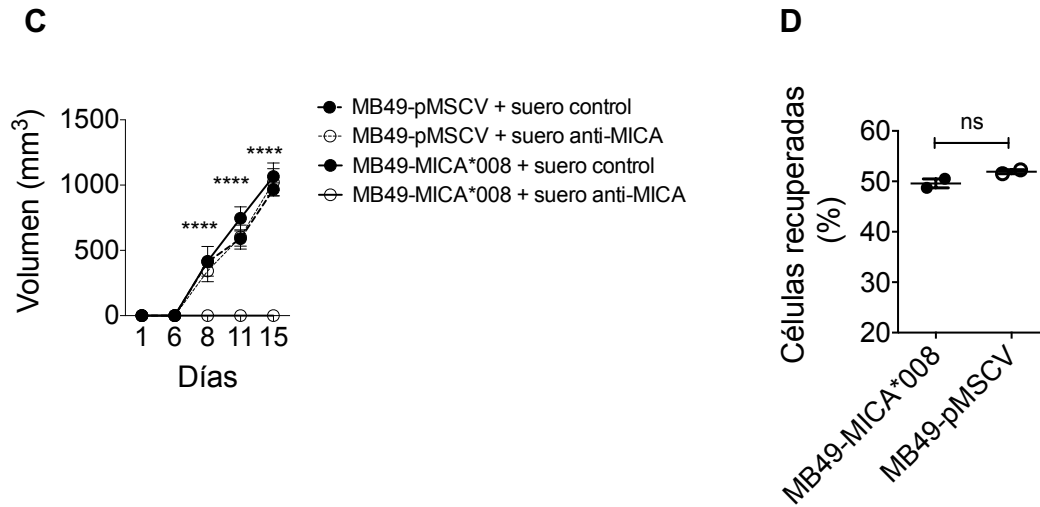


Figura 30: CCDA *in vitro* e *in vivo*. **A)** MB49-pMSCV, MB49-MICA*008 o YAC-1 (como control positivo de citotoxicidad mediada por células NK) fueron marcadas con eFluor dye 670 y luego incubadas durante 1 h en presencia de los sueros control o de los sueros anti-MICA. Luego las células fueron lavadas e incubadas por 4 hs en presencia de células NK aisladas de ratones C57BL/6 sanos de entre 6 y 10 semanas y finalmente se evaluó la muerte celular por marcación con Zombie Aqua y CF. **B)** Se marcaron células MB49-pMSCV con CFSE y células MB49-MICA*008 con eFluor dye 670. Las células fueron incubadas por 1 h con los sueros control o con los sueros anti-MICA y fueron luego inoculadas en ratones C57BL/6 sanos de entre 8 y 10 semanas en igual proporción (sueros control: n=13, sueros anti-MICA: n=10). A las 72 hs se extrajo la zona alrededor de los focos tumorales y se evaluó el porcentaje de células recuperadas por CF. Se muestra media y SEM. ANOVA de dos vías. **C)** MB49-pMSCV y MB49-MICA*008 fueron incubadas en presencia de sueros control o sueros anti-MICA y luego inoculadas en ratones C57BL/6 sanos para evaluar el crecimiento tumoral. Se muestra la media y SEM. ANOVA de dos vías. n=4 para cada grupo experimental. **D)** Los ratones que se mantuvieron sin tumor (n=2) fueron inoculados con una mezcla de 200.000 células MB49-pMSCV y 200.000 células MB49-MICA*008 en el flanco contrario al que habían recibido el tumor primario. A las 96 horas se extrajo la zona alrededor de los focos tumorales por raspado y se evaluó el porcentaje de células recuperadas por CF. Test *t* de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

DISCUSIÓN

NKG2D es uno de los receptores activadores de células NK más importantes y estudiados, que también expresan los LT CD8⁺, [49-52]. Se ha demostrado en modelos *in vivo*, la relevancia de NKG2D en la inmunovigilancia contra tumores epiteliales y linfoides ya que le permite a las células del sistema inmune detectar cambios en la expresión de moléculas propias –los NKG2DLs- que suelen encontrarse en bajos niveles en condiciones basales pero cuya expresión se incrementa durante distintos estímulos que inducen estrés, daño en el ADN, infecciones virales o en células que experimentan transformación tumoral [53, 54]. La expresión de los NKG2DLs estimula a las células NK para que desarrollen funciones efectoras contra estas células [55, 56]. Los humanos poseen 2 familias de NKG2DLs: la familia de MIC [124, 125], en la que se destaca el ligado MICA con el cual trabajamos durante el transcurso de este trabajo y la familia ULBP/RAET1 [127, 128]. Como se comentó anteriormente, la sobre-expresión de MICA y de otros NKG2DLs se asocia a la neotransformación y se ha encontrado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas, entre otros, expresan altos niveles de MICA, así como también distintas líneas celulares tumorales [159-163]. Asimismo, se ha descrito la relevancia clínica de los Ac anti-MICA puesto que se encontró que aquellos pacientes que responden favorablemente al tratamiento con Ac anti-CTLA-4 y también al tratamiento con células tumorales autólogas, desarrollan Ac anti-MICA lo que está correlacionado con una disminución de sMICA en circulación, un aumento de la capacidad citotóxica de células NK y de linfocitos T CD8⁺ y una mejor respuesta a la terapia [271, 272].

Por este motivo resulta particularmente interesante plantear una estrategia terapéutica capaz de inducir deliberadamente Ac anti-MICA en pacientes con tumores MICA⁺, sobre todo teniendo en cuenta que no existen en la actualidad terapias dirigidas al eje NKG2D/NKG2DLs. Lamentablemente, como vimos en este trabajo, la inmunización con rMICA no fue suficiente para desencadenar la producción de anticuerpos. Cuando analizamos la estructura de MICA con el algoritmo de inteligencia artificial del NIH DiscoTope, que predice epitopes discontinuos en la estructura tridimensional de las proteínas comparando la estructura tridimensional de las mismas con una base de datos de interacciones de epitopes/Ac conocidos por métodos cristalográficos, y con la herramienta BepiPred, que busca epitopes en la estructura de la proteína teniendo en cuenta accesibilidad del posible epitope y su conformación tridimensional, encontramos que sólo unas pocas regiones expuestas son probables epitopes, lo que explica la baja inmunogenicidad de rMICA. No obstante, y dada su relevancia en la inmunología tumoral, la molécula MICA resulta ser un candidato

privilegiado para una formulación con un adyuvante capaz de potenciar y perfilar una respuesta inmune eficaz. Los adyuvantes ayudan a evocar una respuesta inmune temprana, alta y duradera utilizando menor cantidad del antígeno, lo que permite ahorrar en los costos de producción de un tratamiento con una proteína recombinante. Además, con el uso de adyuvantes, la respuesta inmune puede orientarse selectivamente hacia diferentes perfiles efectores, según las enfermedades sean causadas por patógenos intracelulares como virus, parásitos, patógenos extracelulares o cáncer [324]. Sin embargo, se encuentran varios problemas en el desarrollo y uso de adyuvantes para vacunas humanas, siendo los mayores la toxicidad, los efectos secundarios adversos de la mayoría de las formulaciones [325], la baja potencia en el efecto adyuvante [326] y el conseguir vencer la tolerancia frente a antígenos propios [327]. Para abordar esta problemática utilizamos una plataforma establecida para producir proteínas quiméricas altamente inmunogénicas basadas en el uso de la proteína BLS -una lumazina sintasa de *Brucella spp* [299-301]- y generamos una proteína quimérica entre BLS y MICA que denominamos BLS-MICA. El análisis computacional de la estructura de BLS-MICA con los algoritmos ProtParam y SCOP sugieren que la proteína quimérica es estable a 4°C por su elevado índice alifático y posee una vida media *in vitro* de 30 hs. Además, ensayos *in vivo* demostraron que la proteína quimérica moduló la expresión de NKG2D en células NK y LT CD8⁺ de la misma manera que rMICA. Asimismo, resultó ser altamente inmunogénica desencadenando la producción de niveles elevados de Ac anti-MICA, sin el uso de adyuvantes adicionales y en un esquema de inmunizaciones corto. De este modo, la proteína quimérica BLS-MICA resulta particularmente atractiva para ser empleada como inmunógeno puesto que es estable y que a través de BLS, promueve la formación de altos títulos de Ac debido en parte a la estimulación de TLRs y al aumento de presentación en moléculas del CMH [302-304], sin el uso de adyuvantes.

Una de las mayores dificultades en el estudio del rol de los NKG2DLs en la inmunovigilancia tumoral reside en que el humano y el ratón poseen distintos ligandos para el mismo receptor [328]. Para poder estudiar el rol de MICA y de los Ac anti-MICA en el modelo murino, creamos vectores retrovirales basados en el virus MSCV capaces de infectar e inducir la expresión estable de dos alelos de MICA en líneas celulares tumorales murinas de *background* C57BL/6 MB49 y EL4, así como también las líneas de *background* BALB7c CT26 y 4T1 y líneas humanas MICA⁻ (datos no mostrados), en niveles similares a los expresados naturalmente por la línea de adenocarcinoma de colon humano HCT-116. Además, la expresión de MICA en las líneas transducidas no afectó su actividad metabólica, la sobrevivencia ni su capacidad

proliferativa.

Asimismo, hemos encontrado que los Ac policlonales generados por los ratones inmunizados con BLS-MICA fueron capaces de reconocer MICA en expresada tanto en líneas humanas MICA⁺ como a ambos alelos de MICA en las líneas murinas transducidas. Esto nos abrió la posibilidad de estudiar el efecto de BLS-MICA *in vivo* en ratones portadores de tumores.

En nuestros ensayos, encontramos que los tumores que expresan MICA, pesar de expresar un ligando del receptor activador NKG2D, crecieron más rápidamente que los tumores MICA⁻, probablemente debido a que las células tumorales MICA⁺ son capaces de evadir la respuesta inmune mediante la secreción de formas solubles de MICA, que actúan como antagonistas del receptor NKG2D inhibiendo la funcionalidad de las células NK y de los LT CD8⁺ [178, 329]. En este sentido, y probablemente debido a la secreción de sMICA, los ratones desafiados con líneas MICA⁺ presentaron significativamente un menor porcentaje de LT CD8⁺ efectores CD127⁺KLRG1⁺ y de LT CD8⁺ de memoria efectora CD62L⁺CD44⁺ que los ratones portadores de tumores MICA⁻, dos fenotipos asociados con una mejor respuesta antitumoral [330].

Empleando las líneas celulares murinas MICA⁺, nos propusimos evaluar el efecto de la inmunización con BLS-MICA sobre el crecimiento de tumores MICA⁺ con un esquema de inmunizaciones activas. Sin embargo, no observamos diferencias en el crecimiento tumoral entre los grupos de animales tratados con BLS-MICA comparados con los grupos de animales tratados con BLS, probablemente debido al rápido crecimiento de los mismos antes de la generación de una respuesta inmune contra MICA eficiente. Por ello, decidimos evaluar el efecto de la inmunización profiláctica con BLS-MICA. Con este esquema de inmunizaciones profilácticas, donde primero favorecimos la producción de Ac anti-MICA y luego desafiábamos a los ratones con las líneas MICA⁺, logramos retardar la aparición de los tumores y reducir significativamente el crecimiento de tumores MICA⁺ y la mortalidad.

Dado que las formas solubles de NKG2DLs son capaces de mediar efectos inmunosupresores, era importante para nosotros poder detectar sMICA en los sueros de los ratones portadores de tumor. Sin embargo, no pudimos detectar MICA con los sistemas comerciales basados en ELISA, optimizados para otro tipo de muestras. Debido a que no existen otros métodos para la detección de sMICA en sueros de ratones, diseñamos un ensayo por CF capaz de detectar esta molécula. Una ventaja de nuestro sistema, respecto de los ELISA comerciales para NKG2DLs, reside en que

su diseño permite identificar al mismo tiempo MICA y MICB en suero en los casos en los que los tumores expresen uno, otro o ambos ligandos. Utilizando este ensayo encontramos que los ratones con tumores MICA⁺ inmunizados con BLS-MICA presentaban niveles de sMICA significativamente más bajos que los ratones inmunizados con BLS, sugiriendo que el tratamiento con la quimera fue capaz de reducir los niveles de sMICA, lo que restauraría la actividad de las células NKG2D⁺ y que sería en parte responsable del retraso en el crecimiento tumoral encontrado. Asimismo, más allá del tratamiento que recibieron los ratones encontramos una correlación positiva significativa entre la concentración de sMICA en los sueros y el volumen tumoral, lo que pone en evidencia la importancia de una terapia capaz de reducir los niveles de sMICA.

Al encontrar una reducción en los niveles de sMICA en los ratones inmunizados profilácticamente con BLS-MICA, nos propusimos investigar si el efecto antitumoral de BLS-MICA se debía a la inducción de Ac anti-MICA. Sorprendentemente, encontramos que los Ac generados mediante inmunización con la quimera BLS-MICA en ratones naïve, administrados pasivamente a ratones portadores de los tumores MICA⁺, retardaron el crecimiento tumoral y hasta en algunos casos lograron la remisión completa del tumor. Interesantemente, encontramos que en parte el efecto del tratamiento con los Ac anti-MICA se debió a una restauración de la inmunidad antitumoral evidenciada como un aumento del infiltrado de linfocitos T CD8⁺ con experiencia antigénica y de macrófagos M1 proinflamatorios/antitumorales (**Figura 31B**).

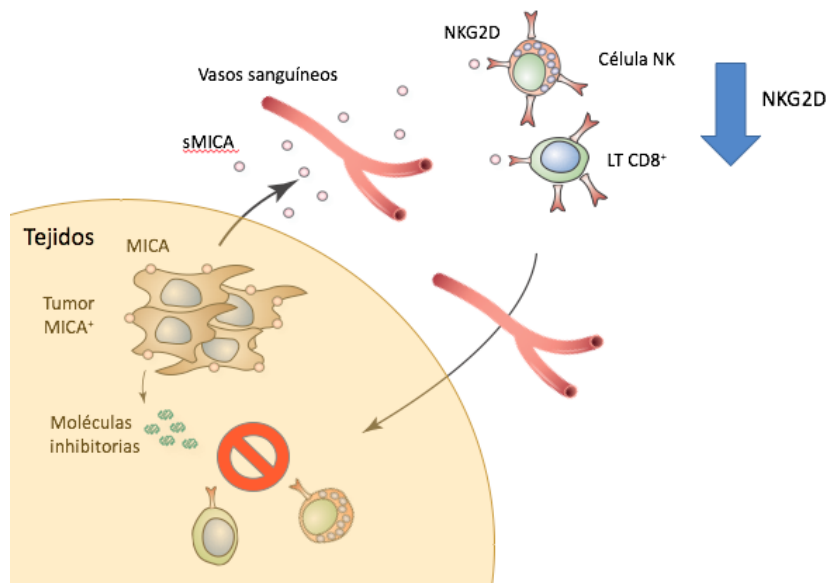
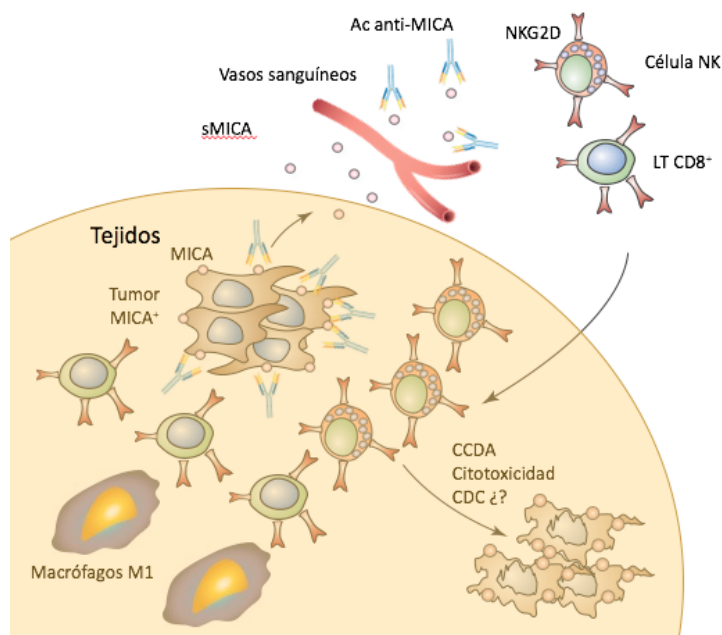
A**B**

Figura 31: A) Los tumores MICA⁺ son capaces de liberar sMICA, que actúa como antagonista del receptor NKG2D, inhibiendo la funcionalidad de las células NK y de los LT CD8⁺. Esto sumado a la expresión y secreción de otras moléculas inhibitorias contribuye a la inmunosupresión mediada por el tumor. **B)** Los Ac anti-MICA generados con BLS-MICA favorecen la depuración de sMICA liberado por los tumores. Esto permitiría la restauración de la expresión de NKG2D en linfocitos T CD8⁺ y en células NK que se traduce en una normalización del infiltrado tumoral proinflamatorio. Asimismo, las células NK pueden ejercer su actividad citotóxica sobre las células tumorales opsonizadas con Ac anti-MICA.

Este efecto antitumoral de los Ac anti-MICA se observó con las dos líneas tumorales murinas y con dos alelos de MICA diferentes, lo que sugiere que el enfoque de usar Ac policlonales anti-MICA como inmunoterapia podría ser una estrategia aplicable a una variedad de tumores diferentes e incluso en pacientes con distintos alelos de MICA. La policlonalidad de la respuesta que desencadena la inmunización con BLS-MICA resulta particularmente interesante dada la gran diversidad de alelos de MICA e incluso cubriría una parte importante de los tumores que expresen alelos de MICB, ligando de NKG2D con el que MICA comparte 85% de su secuencia (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#5813971>), y de posibles patrones de glicosilación aberrantes presentes en los alelos de MICA en el entorno tumoral que pudieran impedir la unión de algunos Ac [331]. Asimismo, existen evidencias de sinergismo utilizando combinaciones de Ac que reconocen distintos epitopes como, por ejemplo, la combinación de Pertuzumab y Trastuzumab en el caso de tumores de mama HER-2 positivos [332]. Con la respuesta policlonal generada mediante la inmunización con BLS-MICA, podríamos entonces obtener los beneficios de utilizar múltiples Ac contra la misma proteína. Sumado a esto, BLS no sólo tiene la ventaja promover la formación de altos títulos de Ac contra el antígeno acoplado en ausencia de otros adyuvantes [299-301], sino que también promueve la activación de CDs vía TLR4 [302, 303] a través de la inducción de IFNs, quimiocinas y citoquinas proinflamatorias. Esto mejora la eficiencia en la presentación antigénica mediante la estimulación de forma aguda de la macropinocitosis de antígenos y conduce a una mejor presentación en las moléculas de clase I y de clase II del CMH [304] lo que finalmente favorece el perfilado antitumoral de la respuesta inmune adaptativa.

La CCDA de células tumorales es clave en el tratamiento de varios tumores que sobreexpresan determinados antígenos. Aunque no encontramos diferencias en el compartimiento de células NK a los tiempos analizados, mediante los ensayos de CCDA *in vitro* logramos poner en de manifiesto la capacidad de las células NK de ejercer funciones efectoras preferentemente contra células MICA⁺ en presencia de Ac anti-MICA. Con los ensayos *in vivo* logramos poner en evidencia el rol fundamental de la CCDA en la inmunidad contra tumores MICA⁺. La CCDA que observamos cuando las células tumorales MICA⁺ fueron preincubadas con los Ac anti-MICA es de tal magnitud que los tumores son eliminados por completo. Esto haría de BLS-MICA un candidato estratégico para terapias combinadas entre los agentes utilizados actualmente en clínica con una inmunoterapia capaz de atacar al tumor por varios flancos.

Como se mencionó anteriormente, los tumores poseen numerosas estrategias de evasión de la respuesta inmune. Dado el auge de las terapias anti-CTLA-4, anti-PD-1 y anti-PD-L1, los mecanismos más estudiados son los involucrados en los ejes CTLA-4/CD80/86 y PD-1/PD-L1. Entre estos mecanismos de evasión se encuentran la expansión de células regulatorias, el control de proteínas involucradas en el procesamiento y presentación antigénica [165], de proteínas necesarias para la entrada de los péptidos al retículo endoplásmico e incluso, la propia disminución en la expresión de las moléculas de clase I del CMH [166-168]. En particular, este mecanismo evita el reconocimiento por parte de los LT CD8⁺ pero si la célula tumoral cuenta con ligandos de receptores activadores de células NK, hace a las células susceptibles de ser eliminadas por éstas. Sin embargo, los tumores también poseen mecanismos de evasión de la respuesta mediada por células NK relacionados con el sistema NKG2D-NKG2DLs [169] tales como la retención de NKG2DLs en el retículo endoplásmico evitando su expresión en superficie [170, 171], el desprendimiento de NKG2DLs en exosomas [172-174], la secreción de formas solubles de los NKG2DLs [175, 176] y el clivaje del ectodominio de NKG2DLs por acción de metaloproteasas [177]. El clivaje y la secreción no sólo generan variantes tumorales con menor expresión de NKG2DLs, afectando su reconocimiento por las células citotóxicas, sino que esas formas solubles actúan como antagonistas del receptor NKG2D inhibiendo la funcionalidad de las células NK y de los LT CD8⁺ [178, 179]. Salvo en algunos casos particulares como los hepatocarcinomas [333] y carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello [334], está relativamente aceptado que el 90% de las muertes asociadas a cáncer se deben a la aparición de metástasis [335]. En este sentido la terapia con BLS-MICA podría ser de gran utilidad no sólo para tumores primarios sino también para el tratamiento de pacientes con tumores MICA⁺ extraídos por resección quirúrgica con elevado riesgo de metástasis, incluso antes de que esta sea detectable. Esta posibilidad cobra particular importancia dado que el eje NKG2D-NKG2DLs juega un rol fundamental, puesto que como se mencionó anteriormente, se ha detectado que en varios tumores las células tumorales pueden expresar NKG2D y algunos NKG2DLs al mismo tiempo y que esto activa vías de transducción de señales que favorecen la transición epitelio-mesenquimal y la metástasis [244-246]. A su vez, esta expresión de NKG2DLs por parte de las células tumorales las vuelve susceptibles al ataque por parte de células NK y LT CD8⁺ convirtiendo a estos ligandos en interesantes puntos de control inmunológico [336]. Interesantemente, varios de los agentes quimioterapéuticos más utilizados en la actualidad como el 5-fluorouracilo, el Cisplatino, el Bortezomib y la Gemcitabina inducen un aumento de la expresión de NKG2DLs, en particular de MICA en las células tumorales, lo que las volvería

susceptibles al ataque por células NK y LT CD8⁺ en el contexto de una terapia basada en el eje NKG2D-NKG2DLs [337-341].

Otro campo que ha cobrado una renovada importancia es el de las CSC. Muchas de las estrategias terapéuticas actuales destinadas a eliminar las células tumorales implican la resección quirúrgica y el tratamiento con una de las quimioterapias antiproliferativas estándar mencionadas más arriba, que a menudo tienen beneficios limitados. Se cree que la población residual de células tumorales incapaces de ser removidas por completo por cirugía y que son resistentes a la quimioterapia y capaces de regenerar la enfermedad, está enriquecida en CSC puesto que poseen una mayor capacidad de eliminar drogas por las bombas de eflujo de fármacos, una capacidad superior de reparación del ADN, una mayor protección contra ROS, mayor plasticidad celular y, en particular, la capacidad de las CSC para adoptar un estado de reposo [342, 343] sumado a su baja expresión de moléculas de clase I del CMH [344]. Sin embargo, se ha reportado recientemente que las CSC son susceptibles al ataque por células NK en, por ejemplo, modelos de cáncer colorrectal [345]. Se ha visto incluso que en cáncer de mama las CSC son más sensibles al ataque por células NK que el resto del tumor, que esto depende de NKG2D y que el efecto se debería al reconocimiento principalmente de MICA -entre otros NKG2DLs- en la superficie de las CSC [346].

Aunque nuestros experimentos con cirugías no fueron concluyentes por problemas técnicos propios de las intervenciones, encontramos una reducción significativa de la reaparición de tumores en los ratones portadores de tumores MICA tratados con Ac anti-MICA. Sabiendo que las líneas que utilizamos tienen potencialidad de CSC por la expresión de los marcadores CD24 y CD44 (*resultados no mostrados*), en futuros experimentos trataremos de dilucidar si la eliminación de los tumores depende de la eliminación de CSC por parte de las células NK mediada por los Ac anti-MICA.

CONCLUSIONES

Los tumores MICA⁺, a pesar de expresar un ligando de NKG2D, son capaces de evadir la respuesta inmune a través de numerosos mecanismos. En nuestro trabajo demostramos que MICA es un posible blanco terapéutico en inmuno-oncología abordable a través de la inducción de Ac anti-MICA. En particular, en este trabajo, utilizando una combinación de estrategias experimentales *in vivo* e *in vitro* alcanzamos los siguientes objetivos:

- Transducir establemente 2 alelos distintos de MICA en diversas líneas murinas y humanas MICA⁻ utilizando vectores retrovirales.
- Producir la proteína quimérica BLS-MICA y emplearla con el objeto de producir Ac policlonales anti-MICA en ratones mediante un esquema de inmunización que no requirió el uso de adyuvantes adicionales. Los Ac generados fueron capaces de reconocer MICA expresado naturalmente en la superficie de células humanas MICA⁺ y en las células murinas transducidas.
- Desarrollar un sistema de detección por CF capaz de detectar sMICA en los sueros de ratones portadores de tumor. El diseño de este sistema permitió detectar al mismo tiempo MICA y MICB.
- Demostrar el efecto anti-tumoral de la proteína quimérica empleada en un esquema de inmunización profiláctico.
- Observar una correlación positiva significativa entre tamaño tumoral y cantidad de sMICA en los sueros de los ratones.
- Demostrar que el efecto anti-tumoral de la proteína quimérica se debe a los Ac anti-MICA inducidos.
- Demostrar que ese efecto anti-tumoral de los Ac anti-MICA generados con la proteína quimérica se debió a la inducción de un infiltrado tumoral proinflamatorio en los ratones tratados con Ac anti-MICA.
- Demostrar que esos Ac anti-MICA ejercen su efecto terapéutico, al menos parcialmente, a través de la inducción de la CCDA contra tumores MICA⁺.

En resumen, hemos logrado identificar a MICA como una molécula capaz de ser abordada mediante la generación de Ac anti-MICA con el doble propósito de favorecer la CCDA (eliminación tumoral) y al mismo tiempo contrarrestar los efectos negativos de sMICA sobre las células efectoras de la inmunidad antitumoral (escape tumoral). Esto constituye un aporte en la búsqueda de nuevos blancos en inmuno-oncología, y

el producto desarrollado podría ser de utilidad para abordar una de las principales dificultades de la actualidad: la reincidencia de tumores extraídos por resección quirúrgica o de tumores tratados con agentes quimioterapéuticos convencionales. Estos tumores crecerían nuevamente en el mismo sitio o en sitios distantes a partir de unas pocas células (CSC) con alta capacidad proliferativa y resistencia a agentes farmacológicos. Sin embargo, de expresar MICA, se convierten en blancos de terapias dirigidas a esta molécula. Estos avances abren el camino hacia la búsqueda de otros NKG2DLs como blancos inmuno-oncológicos y al desarrollo de nuevas proteínas quiméricas para vencer la tolerancia inmunológica frente a estos ligandos.

BIBLIOGRAFIA

1. Lanier, L.L., *Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 495-502.
2. Moretta, L., et al., *Surface NK receptors and their ligands on tumor cells*. Semin Immunol, 2006. **18**(3): p. 151-158.
3. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 503-10.
4. Walker, J.A., J.L. Barlow, and A.N. McKenzie, *Innate lymphoid cells—how did we miss them?* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 75-87.
5. Mocikat, R., et al., *Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses*. Immunity, 2003. **19**(4): p. 561-9.
6. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol, 2004. **5**(12): p. 1260-5.
7. Saito, H., et al., *Adoptive Transfer of CD8+ T Cells Generated from Induced Pluripotent Stem Cells Triggers Regressions of Large Tumors Along with Immunological Memory*. Cancer Res, 2016. **76**(12): p. 3473-83.
8. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
9. Huang, H., D.D. Patel, and K.G. Manton, *The immune system in aging: roles of cytokines, T cells and NK cells*. Front Biosci, 2005. **10**: p. 192-215.
10. Waggoner, S.N. and V. Kumar, *Evolving role of 2B4/CD244 in T and NK cell responses during virus infection*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 377.
11. Wehner, R., et al., *The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and natural killer cells*. J Innate Immun, 2011. **3**(3): p. 258-63.
12. Spallanzani, R.G., et al., *Regulatory Dendritic Cells Restrain NK Cell IFN-gamma Production through Mechanisms Involving NKp46, IL-10, and MHC Class I-Specific Inhibitory Receptors*. J Immunol, 2015. **195**(5): p. 2141-8.
13. Bellora, F., et al., *The interaction of human natural killer cells with either unpolarized or polarized macrophages results in different functional outcomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(50): p. 21659-64.
14. Nunez, S.Y., et al., *Human M2 Macrophages Limit NK Cell Effector Functions through Secretion of TGF-beta and Engagement of CD85j*. J Immunol, 2018. **200**(3): p. 1008-1015.
15. Iraolagoitia, X.L., et al., *NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells*. J Immunol, 2016. **197**(3): p. 953-61.
16. Shanker, A., M. Buferne, and A.M. Schmitt-Verhulst, *Cooperative action of CD8 T lymphocytes and natural killer cells controls tumour growth under conditions of restricted T-cell receptor diversity*. Immunology, 2010. **129**(1): p. 41-54.
17. Schleinitz, N., et al., *[NK cells: new insights on physiology and clinical implication in diseases]*. Rev Med Interne, 2006. **27**(6): p. 465-72.
18. Ferlazzo, G., et al., *Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(47): p. 16606-11.
19. Narni-Mancinelli, E., E. Vivier, and Y.M. Kerdiles, *The 'T-cell-ness' of NK cells: unexpected similarities between NK cells and T cells*. Int Immunol, 2011. **23**(7): p. 427-31.

20. Sun, J.C. and L.L. Lanier, *NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(10): p. 645-57.
21. Karo, J.M., D.G. Schatz, and J.C. Sun, *The RAG recombinase dictates functional heterogeneity and cellular fitness in natural killer cells*. Cell, 2014. **159**(1): p. 94-107.
22. Di Santo, J.P., *Natural killer cell developmental pathways: a question of balance*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 257-86.
23. Shibuya, A., et al., *Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3538-46.
24. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol, 2001. **22**(11): p. 633-40.
25. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
26. Hayakawa, Y., et al., *Functional subsets of mouse natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 47-55.
27. Kim, S., et al., *In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation*. Nat Immunol, 2002. **3**(6): p. 523-8.
28. Chiossone, L., et al., *Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5488-5496.
29. Terme, M., et al., *Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells*. Cancer Res, 2012. **72**(11): p. 2757-67.
30. Desbois, M., et al., *Natural killer cells in non-hematopoietic malignancies*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 395.
31. Bryceson, Y.T., et al., *Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 73-91.
32. Carlyle, J.R., et al., *Evolution of the Ly49 and Nkrp1 recognition systems*. Semin Immunol, 2008. **20**(6): p. 321-30.
33. Parham, P., *MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(3): p. 201-14.
34. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition*. Immunol Today, 1990. **11**(7): p. 237-44.
35. Karlhofer, F.M., R.K. Ribaudo, and W.M. Yokoyama, *MHC Class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells*. Nature 358: 66-70, 1992. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5761-5.
36. Karre, K., *How to recognize a foreign submarine*. Immunol Rev, 1997. **155**: p. 5-9.
37. Schenkel, A.R., L.C. Kingry, and R.A. Slayden, *The ly49 gene family. A brief guide to the nomenclature, genetics, and role in intracellular infection*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 90.
38. Olcese, L., et al., *Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTPIC and PTPID protein tyrosine phosphatases*. J Immunol, 1996. **156**(12): p. 4531-4.
39. Kumar, V. and M.E. McNerney, *A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 363-74.
40. He, Y., et al., *Contribution of inhibitory receptor TIGIT to NK cell education*. J Autoimmun, 2017. **81**: p. 1-12.

41. Fernandez, N.C., et al., *A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4416-23.
42. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 709-13.
43. Gasser, S. and D.H. Raulet, *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. Immunol Rev, 2006. **214**: p. 130-42.
44. Patel, R., et al., *Effect of Ly49 haplotype variance on NK cell function and education*. J Immunol, 2010. **185**(8): p. 4783-92.
45. Walzer, T., *NK-cell education: KIR-S come into play*. Blood, 2010. **115**(6): p. 1110-1.
46. He, Y. and Z. Tian, *NK cell education via nonclassical MHC and non-MHC ligands*. Cell Mol Immunol, 2017. **14**(4): p. 321-330.
47. Brodin, P., K. Karre, and P. Hoglund, *NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat*. Trends Immunol, 2009. **30**(4): p. 143-9.
48. Tu, M.M., A.B. Mahmoud, and A.P. Makrigrannis, *Licensed and Unlicensed NK Cells: Differential Roles in Cancer and Viral Control*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 166.
49. Diefenbach, A., et al., *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages*. Nat Immunol, 2000. **1**(2): p. 119-26.
50. Cerwenka, A., et al., *Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice*. Immunity, 2000. **12**(6): p. 721-7.
51. Carayannopoulos, L.N., et al., *Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 597-605.
52. Prajapati, K., et al., *Functions of NKG2D in CD8(+) T cells: an opportunity for immunotherapy*. Cell Mol Immunol, 2018.
53. Guerra, N., et al., *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. Immunity, 2008. **28**(4): p. 571-80.
54. Unni, A.M., T. Bondar, and R. Medzhitov, *Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(5): p. 1686-91.
55. Wolan, D.W., et al., *Crystal structure of the murine NK cell-activating receptor NKG2D at 1.95 Å*. Nat Immunol, 2001. **2**(3): p. 248-54.
56. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1186-90.
57. Campos, C., et al., *Expression of NKp30, NKp46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age*. Biogerontology, 2015. **16**(5): p. 671-83.
58. Horton, N.C. and P.A. Mathew, *NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 31.
59. Gutierrez-Franco, J., et al., *Characterization of B7H6, an endogenous ligand for the NK cell activating receptor NKp30, reveals the identity of two different soluble isoforms during normal human pregnancy*. Immunobiology, 2018. **223**(1): p. 57-63.
60. Li, Y., Q. Wang, and R.A. Mariuzza, *Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6*. J Exp Med, 2011. **208**(4): p. 703-14.
61. Bowen, K.E., et al., *A novel ligand on astrocytes interacts with natural cytotoxicity receptor NKp44 regulating immune response mediated by NK cells*. PLoS One, 2018. **13**(2): p. e0193008.

62. Bernal, M., et al., *Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: implications for tumor evasion of T and NK cells.* Hum Immunol, 2009. **70**(10): p. 854-7.
63. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 239-52.
64. Guilleirey, C., N.D. Huntington, and M.J. Smyth, *Targeting natural killer cells in cancer immunotherapy.* Nat Immunol, 2016. **17**(9): p. 1025-36.
65. Cartron, G., et al., *Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene.* Blood, 2002. **99**(3): p. 754-8.
66. Veeramani, S., et al., *Rituximab infusion induces NK activation in lymphoma patients with the high-affinity CD16 polymorphism.* Blood, 2011. **118**(12): p. 3347-9.
67. Veugelers, K., et al., *Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate.* Mol Biol Cell, 2006. **17**(2): p. 623-33.
68. Barry, M. and R.C. Bleackley, *Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(6): p. 401-9.
69. Liu, Q., et al., *Blockade of Fas signaling in breast cancer cells suppresses tumor growth and metastasis via disruption of Fas signaling-initiated cancer-related inflammation.* J Biol Chem, 2014. **289**(16): p. 11522-35.
70. Hayakawa, Y., et al., *NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy.* J Immunol, 2004. **172**(1): p. 123-9.
71. Bansal, K., et al., *The transcriptional regulator Aire binds to and activates super-enhancers.* Nat Immunol, 2017. **18**(3): p. 263-273.
72. Anderson, M.S., et al., *Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein.* Science, 2002. **298**(5597): p. 1395-401.
73. Qi, Q., et al., *Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(36): p. 13139-44.
74. Takamura, K., et al., *Regulatory role of lymphoid chemokine CCL19 and CCL21 in the control of allergic rhinitis.* J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5897-906.
75. Smith-Garvin, J.E., G.A. Koretzky, and M.S. Jordan, *T cell activation.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 591-619.
76. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire.* Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
77. Farber, D.L., N.A. Yudanin, and N.P. Restifo, *Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis.* Nat Rev Immunol, 2014. **14**(1): p. 24-35.
78. Kurachi, M., et al., *Chemokine receptor CXCR3 facilitates CD8(+) T cell differentiation into short-lived effector cells leading to memory degeneration.* J Exp Med, 2011. **208**(8): p. 1605-20.
79. Zhang, N. and M.J. Bevan, *CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system.* Immunity, 2011. **35**(2): p. 161-8.
80. Baaten, B.J., et al., *Regulation of Antigen-Experienced T Cells: Lessons from the Quintessential Memory Marker CD44.* Front Immunol, 2012. **3**: p. 23.
81. Ferreira, C.P., et al., *LFA-1 Mediates Cytotoxicity and Tissue Migration of Specific CD8(+) T Cells after Heterologous Prime-Boost Vaccination against Trypanosoma cruzi Infection.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1291.

82. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
83. Ossina, N.K., et al., *Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression*. J Biol Chem, 1997. **272**(26): p. 16351-7.
84. Dighe, A.S., et al., *Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors*. Immunity, 1994. **1**(6): p. 447-56.
85. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty, *Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection*. Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 619-26.
86. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
87. Ma, Y., et al., *Dendritic cells in the cancer microenvironment*. J Cancer, 2013. **4**(1): p. 36-44.
88. Stewart, C.R., et al., *CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer*. Nat Immunol, 2010. **11**(2): p. 155-61.
89. Nierkens, S., et al., *Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants?* Trends Immunol, 2013. **34**(8): p. 361-70.
90. Miyaji, E.N., et al., *Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants*. Braz J Med Biol Res, 2011. **44**(6): p. 500-13.
91. Belz, G.T., *Getting together: dendritic cells, T cells, collaboration and fates*. Immunol Cell Biol, 2008. **86**(4): p. 310-1.
92. Savina, A. and S. Amigorena, *Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells*. Immunol Rev, 2007. **219**: p. 143-56.
93. Xu, M.M., et al., *Dendritic Cells but Not Macrophages Sense Tumor Mitochondrial DNA for Cross-priming through Signal Regulatory Protein alpha Signaling*. Immunity, 2017. **47**(2): p. 363-373.e5.
94. Woo, S.R., et al., *STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 830-42.
95. Pinzon-Charry, A., T. Maxwell, and J.A. Lopez, *Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(5): p. 451-61.
96. Park, S.J., et al., *Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2014. **95**(4): p. 621-9.
97. Chaux, P., et al., *Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation*. Lab Invest, 1996. **74**(5): p. 975-83.
98. Lee, B.N., et al., *Deficiencies in myeloid antigen-presenting cells in women with cervical squamous intraepithelial lesions*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 999-1007.
99. Perrot, I., et al., *Dendritic cells infiltrating human non-small cell lung cancer are blocked at immature stage*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 2763-9.
100. Ormandy, L.A., et al., *Direct ex vivo analysis of dendritic cells in patients with hepatocellular carcinoma*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(20): p. 3275-82.
101. Pinzon-Charry, A., et al., *Numerical and functional defects of blood dendritic cells in early- and late-stage breast cancer*. Br J Cancer, 2007. **97**(9): p. 1251-9.
102. Gabrilovich, D.I., et al., *Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer*. Clin Cancer Res, 1997. **3**(3): p. 483-90.

103. Gardner, A. and B. Ruffell, *Dendritic Cells and Cancer Immunity*. Trends Immunol, 2016. **37**(12): p. 855-865.
104. Morandi, B., et al., *Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39170.
105. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
106. Erwig, L.P. and P.M. Henson, *Immunological consequences of apoptotic cell phagocytosis*. Am J Pathol, 2007. **171**(1): p. 2-8.
107. Han, C.Z., et al., *Macrophages redirect phagocytosis by non-professional phagocytes and influence inflammation*. Nature, 2016. **539**(7630): p. 570-574.
108. Zhang, X. and D.M. Mosser, *Macrophage activation by endogenous danger signals*. J Pathol, 2008. **214**(2): p. 161-78.
109. Klimp, A.H., et al., *A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2002. **44**(2): p. 143-61.
110. Lin, E.Y. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(11): p. 5064-6.
111. Swann, J.B., et al., *Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(2): p. 652-6.
112. Li, J., et al., *Macrophages are needed in the progression of tuberculosis into lung cancer*. Tumour Biol, 2015. **36**(8): p. 6063-6.
113. Romieu-Mourez, R., et al., *Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF-7 in the activation of antitumor properties of human macrophages*. Cancer Res, 2006. **66**(21): p. 10576-85.
114. Pollard, J.W., *Macrophages define the invasive microenvironment in breast cancer*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 623-30.
115. Hagemann, T., et al., *"Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB*. J Exp Med, 2008. **205**(6): p. 1261-8.
116. Biswas, S.K., et al., *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2112-22.
117. Lin, E.Y., et al., *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. Cancer Res, 2006. **66**(23): p. 11238-46.
118. Rolny, C., et al., *HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF*. Cancer Cell, 2011. **19**(1): p. 31-44.
119. Yuan, A., et al., *Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14273.
120. Bronte, V. and P.J. Murray, *Understanding local macrophage phenotypes in disease: modulating macrophage function to treat cancer*. Nat Med, 2015. **21**(2): p. 117-9.
121. Ostuni, R., et al., *Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications*. Trends Immunol, 2015. **36**(4): p. 229-39.
122. Raulet, D.H., *Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(10): p. 781-90.
123. Bahram, S. and T. Spies, *The MIC gene family*. Res Immunol, 1996. **147**(5): p. 328-33.

124. Bahram, S., et al., *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(14): p. 6259-63.
125. Kasahara, M. and Y. Sutoh, *Comparative genomics of the NKG2D ligand gene family*. Immunol Rev, 2015. **267**(1): p. 72-87.
126. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor*. Immunity, 2001. **14**(2): p. 123-33.
127. Bacon, L., et al., *Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1078-84.
128. Radosavljevic, M., et al., *A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3*. Genomics, 2002. **79**(1): p. 114-23.
129. Carapito, R. and S. Bahram, *Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands*. Immunol Rev, 2015. **267**(1): p. 88-116.
130. Kondo, M., et al., *Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution*. Immunogenetics, 2010. **62**(7): p. 441-50.
131. Spear, P., et al., *NKG2D ligands as therapeutic targets*. Cancer Immun, 2013. **13**.
132. Lanier, L.L., *NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(6): p. 575-82.
133. Bahram, S., et al., *Genomic structure of the human MHC class I MICB gene*. Immunogenetics, 1996. **45**(2): p. 161-2.
134. Bahram, S., et al., *Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene*. Immunogenetics, 1996. **44**(1): p. 80-1.
135. Barclay, A.N., *Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 14672-4.
136. Mizuki, N., et al., *Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1298-303.
137. Li, P., et al., *Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand*. Immunity, 1999. **10**(5): p. 577-84.
138. Li, P., et al., *Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA*. Nat Immunol, 2001. **2**(5): p. 443-51.
139. Biasini, M., et al., *SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(Web Server issue): p. W252-8.
140. Robinson, J., et al., *The IPD-IMGT/HLA Database - New developments in reporting HLA variation*. Hum Immunol, 2016. **77**(3): p. 233-7.
141. Komatsu-Wakui, M., et al., *MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype*. Immunogenetics, 1999. **49**(7-8): p. 620-8.
142. Ota, M., et al., *On the MICA deleted-MICB null, HLA-B*4801 haplotype*. Tissue Antigens, 2000. **56**(3): p. 268-71.
143. Wang, W., et al., *MICA Gene Deletion in 3411 DNA Samples from Five Distinct Populations in Mainland China and Lack of Association with Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) in a Southern Chinese Han population*. Ann Hum Genet, 2016. **80**(6): p. 319-326.
144. Yamamoto, K., et al., *Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2)*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1526**(1): p. 10-2.

145. Yang, F., et al., *Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression and enhances susceptibility of human renal carcinoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity*. Arch Med Sci, 2013. **9**(2): p. 323-31.
146. Wei, L., et al., *HIF-1 α accumulation upregulates MICA and MICB expression on human cardiomyocytes and enhances NK cell cytotoxicity during hypoxia-reoxygenation*. Life Sci, 2010. **87**(3-4): p. 111-9.
147. Siemens, D.R., et al., *Hypoxia increases tumor cell shedding of MHC class I chain-related molecule: role of nitric oxide*. Cancer Res, 2008. **68**(12): p. 4746-53.
148. Zwirner, N.W., et al., *Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(1-2): p. 159-170.
149. Zwirner, N.W., K. Dole, and P. Stastny, *Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes*. Hum Immunol, 1999. **60**(4): p. 323-30.
150. Groh, V., et al., *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12445-50.
151. Ghadially, H., et al., *MHC class I chain-related protein A and B (MICA and MICB) are predominantly expressed intracellularly in tumour and normal tissue*. Br J Cancer, 2017. **116**(9): p. 1208-1217.
152. Mellergaard, M., et al., *N-glycosylation of asparagine 8 regulates surface expression of major histocompatibility complex class I chain-related protein A (MICA) alleles dependent on threonine 24*. J Biol Chem, 2014. **289**(29): p. 20078-91.
153. Raulet, D.H., et al., *Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 413-441.
154. Mistry, A.R. and C.A. O'Callaghan, *Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D*. Immunology, 2007. **121**(4): p. 439-47.
155. Molinero, L.L., et al., *Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(5): p. 791-7.
156. Molinero, L.L., et al., *Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin*. J Leukoc Biol, 2003. **73**(6): p. 815-22.
157. Molinero, L.L., et al., *NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5583-90.
158. Cerboni, C., et al., *Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis*. Blood, 2007. **110**(2): p. 606-15.
159. Pende, D., et al., *Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6178-86.
160. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6879-84.
161. Vetter, C.S., et al., *Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma*. J Invest Dermatol, 2002. **118**(4): p. 600-5.
162. Raulet, D.H. and N. Guerra, *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(8): p. 568-80.
163. Madjd, Z., et al., *Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma*. Cancer Immun, 2007. **7**: p. 17.

164. Rossi, L.E., et al., *Histone deacetylase inhibitors impair NK cell viability and effector functions through inhibition of activation and receptor expression*. J Leukoc Biol, 2012. **91**(2): p. 321-31.
165. Hayashi, T. and D.L. Faustman, *Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice*. Cancer Res, 2002. **62**(1): p. 24-7.
166. Khanna, R., *Tumour surveillance: missing peptides and MHC molecules*. Immunol Cell Biol, 1998. **76**(1): p. 20-6.
167. Leone, P., et al., *Dendritic cell maturation in HCV infection: altered regulation of MHC class I antigen processing-presenting machinery*. J Hepatol, 2014. **61**(2): p. 242-51.
168. Leone, P., et al., *MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells*. J Natl Cancer Inst, 2013. **105**(16): p. 1172-87.
169. El-Gazzar, A., V. Groh, and T. Spies, *Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer*. J Immunol, 2013. **191**(4): p. 1509-15.
170. Fuertes, M.B., et al., *Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 2008. **180**(7): p. 4606-14.
171. Wu, J., et al., *Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein*. J Immunol, 2003. **170**(8): p. 4196-4200.
172. Clayton, A., et al., *Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7249-58.
173. Lundholm, M., et al., *Prostate tumor-derived exosomes down-regulate NKG2D expression on natural killer cells and CD8+ T cells: mechanism of immune evasion*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108925.
174. Ashiru, O., et al., *Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 481-9.
175. Cao, W., et al., *RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity*. J Biol Chem, 2007. **282**(26): p. 18922-8.
176. Chitadze, G., et al., *Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications*. Scand J Immunol, 2013. **78**(2): p. 120-9.
177. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4098-102.
178. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation*. Nature, 2002. **419**(6908): p. 734-8.
179. Barsoum, I.B., et al., *Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide*. Cancer Res, 2011. **71**(24): p. 7433-41.
180. Global Burden of Disease Cancer, C., et al., *Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study*. JAMA Oncol, 2017. **3**(4): p. 524-548.
181. Hahn, W.C. and R.A. Weinberg, *Rules for making human tumor cells*. N Engl J Med, 2002. **347**(20): p. 1593-603.
182. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
183. Boveri, T., *Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris*. J Cell Sci, 2008. **121 Suppl 1**: p. 1-84.

184. Frank, S.A. and M.A. Nowak, *Problems of somatic mutation and cancer*. Bioessays, 2004. **26**(3): p. 291-9.
185. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Exp Cell Res, 1965. **37**: p. 614-36.
186. Soto, A.M. and C. Sonnenschein, *Emergentism as a default: cancer as a problem of tissue organization*. J Biosci, 2005. **30**(1): p. 103-18.
187. Stewart, T.A. and B. Mintz, *Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(10): p. 6314-8.
188. Bussard, K.M., et al., *Reprogramming human cancer cells in the mouse mammary gland*. Cancer Res, 2010. **70**(15): p. 6336-43.
189. Brucher, B.L. and I.S. Jamall, *Somatic Mutation Theory - Why it's Wrong for Most Cancers*. Cell Physiol Biochem, 2016. **38**(5): p. 1663-80.
190. Stoler, D.L., et al., *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(26): p. 15121-6.
191. Mintz, B. and K. Illmensee, *Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3585-9.
192. McCullough, K.D., et al., *Age-dependent induction of hepatic tumor regression by the tissue microenvironment after transplantation of neoplastically transformed rat liver epithelial cells into the liver*. Cancer Res, 1997. **57**(9): p. 1807-13.
193. Kasemeier-Kulesa, J.C., et al., *Reprogramming multipotent tumor cells with the embryonic neural crest microenvironment*. Dev Dyn, 2008. **237**(10): p. 2657-66.
194. Maffini, M.V., et al., *Stromal regulation of neoplastic development: age-dependent normalization of neoplastic mammary cells by mammary stroma*. Am J Pathol, 2005. **167**(5): p. 1405-10.
195. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
196. Pages, F., et al., *Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored*. Oncogene, 2010. **29**(8): p. 1093-102.
197. Grivennikov, S.I., F.R. Greten, and M. Karin, *Immunity, inflammation, and cancer*. Cell, 2010. **140**(6): p. 883-99.
198. Gajewski, T.F., et al., *Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment*. Curr Opin Immunol, 2013. **25**(2): p. 268-76.
199. Goel, G. and W. Sun, *Cancer immunotherapy in clinical practice – the past, present, and future*. Chin J Cancer, 2014. **33**(9): p. 445-57.
200. Nahas, M.R. and D. Avigan, *Challenges in vaccine therapy in hematological malignancies and strategies to overcome them*. Expert Opin Biol Ther, 2016. **16**(9): p. 1093-104.
201. Pavlou, M.P., E.P. Diamandis, and I.M. Blasutig, *The long journey of cancer biomarkers from the bench to the clinic*. Clin Chem, 2013. **59**(1): p. 147-57.
202. Colotta, F., et al., *Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability*. Carcinogenesis, 2009. **30**(7): p. 1073-81.
203. Multhoff, G., M. Molls, and J. Radons, *Chronic Inflammation in Cancer Development*. Front Immunol, 2011. **2**.
204. Dadashzadeh, K., M.P. Peppelenbosch, and A.I. Adamu, *Helicobacter pylori Pathogenicity Factors Related to Gastric Cancer*. Can J Gastroenterol Hepatol, 2017. **2017**: p. 7942489.

205. Coussens, L.M. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. Nature, 2002. **420**: p. 860.
206. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893*. Clin Orthop Relat Res, 1991(262): p. 3-11.
207. Coley, W.B., II. *Contribution to the Knowledge of Sarcoma*. Ann Surg, 1891. **14**(3): p. 199-220.
208. Paul, E., *Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung*. Ned Tijdschr Geneeskde, 1909. **5**: p. 273-290.
209. Lewis, T., *Discussion of cellular and humoral aspects of hypersensitive states*. 1959.
210. Leroy, V. and T. Asselah, *Universal hepatitis B vaccination: The only way to eliminate hepatocellular carcinoma?* J Hepatol, 2015. **63**(6): p. 1303-5.
211. Ringelhan, M., et al., *The direct and indirect roles of HBV in liver cancer: prospective markers for HCC screening and potential therapeutic targets*. The Journal of Pathology, 2015. **235**(2): p. 355-367.
212. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. The Lancet Oncology, 2010. **11**(8): p. 781-789.
213. Thompson, M.P. and R. Kurzrock, *Epstein-Barr Virus and Cancer*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**(3): p. 803-821.
214. Goncalves, P.H., et al., *Kaposi sarcoma herpesvirus-associated cancers and related diseases*. Current Opinion in HIV and AIDS, 2017. **12**(1): p. 47-56.
215. Matsuoka, M. and K.-T. Jeang, *Human T-cell leukaemia virus type I (HTLV-I) infectivity and cellular transformation*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**: p. 270.
216. Shankaran, V., et al., *IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
217. Engel, A.M., et al., *MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice*. Scand J Immunol, 1997. **45**(5): p. 463-70.
218. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
219. Dunn, G.P., C.M. Koebel, and R.D. Schreiber, *Interferons, immunity and cancer immunoediting*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 836-48.
220. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting*. Immunity, 2004. **21**(2): p. 137-48.
221. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 329-60.
222. Swann, J.B. and M.J. Smyth, *Immune surveillance of tumors*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1137-46.
223. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
224. Myron Kauffman, H., et al., *Transplant tumor registry: donor related malignancies*. Transplantation, 2002. **74**(3): p. 358-62.
225. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
226. Okamoto, R., et al., *Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2757-63.

227. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
228. Croci, D.O., et al., *Glycosylation-dependent lectin-receptor interactions preserve angiogenesis in anti-VEGF refractory tumors*. Cell, 2014. **156**(4): p. 744-58.
229. Morikawa, S., et al., *Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. Am J Pathol, 2002. **160**(3): p. 985-1000.
230. Modiano, J.F. and D. Bellgrau, *Fas ligand based immunotherapy: A potent and effective neoadjuvant with checkpoint inhibitor properties, or a systemically toxic promoter of tumor growth?* Discov Med, 2016. **21**(114): p. 109-16.
231. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. Cell Death Differ, 2015. **22**(5): p. 885-6.
232. Cullen, S.P. and S.J. Martin, *Fas and TRAIL 'death receptors' as initiators of inflammation: Implications for cancer*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **39**: p. 26-34.
233. O'Connell, J., et al., *Immune privilege or inflammation? Insights into the Fas ligand enigma*. Nat Med, 2001. **7**(3): p. 271-4.
234. Green, D.R. and T.A. Ferguson, *The role of Fas ligand in immune privilege*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(12): p. 917-24.
235. Ryan, A.E., et al., *Addressing the "Fas counterattack" controversy: blocking fas ligand expression suppresses tumor immune evasion of colon cancer in vivo*. Cancer Res, 2005. **65**(21): p. 9817-23.
236. Lettau, M., et al., *Storage, expression and function of Fas ligand, the key death factor of immune cells*. Curr Med Chem, 2008. **15**(17): p. 1684-96.
237. Li, J.H., et al., *Immune privilege and FasL: two ways to inactivate effector cytotoxic T lymphocytes by FasL-expressing cells*. Immunology, 2002. **105**(3): p. 267-77.
238. Micheau, O., *Trail, Fas Ligand, TNF and TLR3 in cancer*. 2017, New York, NY: Springer Science+Business Media.
239. Atefi, M., et al., *Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(13): p. 3446-57.
240. Munn, D.H., *The host protecting the tumor from the host - targeting PDL1 expressed by host cells*. J Clin Invest, 2018. **128**(2): p. 570-572.
241. Arrieta, O., et al., *Expression of PD-1/PD-L1 and PD-L2 in peripheral T-cells from non-small cell lung cancer patients*. Oncotarget, 2017. **8**(60): p. 101994-102005.
242. Krahenbuhl, L., et al., *A Longitudinal Analysis of IDO and PDL1 Expression during Immune- or Targeted Therapy in Advanced Melanoma*. Neoplasia, 2018. **20**(2): p. 218-225.
243. Blank, C., et al., *PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells*. Cancer Res, 2004. **64**(3): p. 1140-5.
244. Benitez, A.C., et al., *Expression, signaling proficiency, and stimulatory function of the NKG2D lymphocyte receptor in human cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(10): p. 4081-6.
245. Cai, X., et al., *Autonomous stimulation of cancer cell plasticity by the human NKG2D lymphocyte receptor coexpressed with its ligands on cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108942.
246. El-Gazzar, A., et al., *Effects on tumor development and metastatic dissemination by the NKG2D lymphocyte receptor expressed on cancer cells*. Oncogene, 2014. **33**(41): p. 4932-40.
247. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1353-62.

248. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 531-64.
249. Joller, N., et al., *Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses*. *Immunity*, 2014. **40**(4): p. 569-81.
250. Mempel, T.R., et al., *Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation*. *Immunity*, 2006. **25**(1): p. 129-41.
251. Jie, H.B., et al., *CTLA-4(+) Regulatory T Cells Increased in Cetuximab-Treated Head and Neck Cancer Patients Suppress NK Cell Cytotoxicity and Correlate with Poor Prognosis*. *Cancer Res*, 2015. **75**(11): p. 2200-10.
252. Ghiringhelli, F., et al., *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner*. *J Exp Med*, 2005. **202**(8): p. 1075-85.
253. Zhao, D.M., et al., *Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes*. *Blood*, 2006. **107**(10): p. 3925-32.
254. Tiemessen, M.M., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(49): p. 19446-51.
255. Onishi, Y., et al., *Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(29): p. 10113-8.
256. Zou, W., *Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(4): p. 295-307.
257. Campbell, D.J., *Control of Regulatory T Cell Migration, Function, and Homeostasis*. *J Immunol*, 2015. **195**(6): p. 2507-13.
258. Ding, Y., J. Xu, and J.S. Bromberg, *Regulatory T cell migration during an immune response*. *Trends Immunol*, 2012. **33**(4): p. 174-80.
259. Corthay, A., *How do regulatory T cells work?* *Scand J Immunol*, 2009. **70**(4): p. 326-36.
260. Chaudhry, A. and A.Y. Rudensky, *Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells*. *J Clin Invest*, 2013. **123**(3): p. 939-44.
261. Mougiakakos, D., *Regulatory T cells in colorectal cancer: from biology to prognostic relevance*. *Cancers (Basel)*, 2011. **3**(2): p. 1708-31.
262. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. *Adv Cancer Res*, 2010. **107**: p. 57-117.
263. Takeuchi, Y. and H. Nishikawa, *Roles of regulatory T cells in cancer immunity*. *Int Immunol*, 2016. **28**(8): p. 401-9.
264. Ward-Hartstonge, K.A. and R.A. Kemp, *Regulatory T-cell heterogeneity and the cancer immune response*. *Clin Transl Immunology*, 2017. **6**(9): p. e154.
265. Chaudhary, B. and E. Elkord, *Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment and Cancer Progression: Role and Therapeutic Targeting*. *Vaccines (Basel)*, 2016. **4**(3).
266. van Elsas, A., A.A. Hurwitz, and J.P. Allison, *Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation*. *J Exp Med*, 1999. **190**(3): p. 355-66.
267. Parra, K., et al., *Impact of CTLA-4 blockade in conjunction with metronomic chemotherapy on preclinical breast cancer growth*. *Br J Cancer*, 2017. **116**(3): p. 324-334.
268. Li, X., et al., *Lessons learned from the blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. *J Hematol Oncol*, 2018. **11**(1): p. 31.

269. Lipson, E.J. and C.G. Drake, *Ipilimumab: an anti-CTLA-4 antibody for metastatic melanoma*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(22): p. 6958-62.
270. Reck, M., et al., *Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial*. Ann Oncol, 2013. **24**(1): p. 75-83.
271. Jinushi, M., F.S. Hodi, and G. Dranoff, *Therapy-induced antibodies to MHC class I chain-related protein A antagonize immune suppression and stimulate antitumor cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9190-5.
272. Dranoff, G., *Targets of protective tumor immunity*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 74-80.
273. Spallanzani, R.G., et al., *Expansion of CD11b(+)Ly6G(+)Ly6C(int) cells driven by medroxyprogesterone acetate in mice bearing breast tumors restrains NK cell effector functions*. Cancer Immunol Immunother, 2013. **62**(12): p. 1781-95.
274. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
275. Srivastava, M.K., et al., *Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine*. Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 68-77.
276. Goedegebuure, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer*. Curr Cancer Drug Targets, 2011. **11**(6): p. 734-51.
277. Umansky, V., et al., *The Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC) in Cancer Progression*. Vaccines (Basel), 2016. **4**(4).
278. Chen, D.S. and I. Mellman, *Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle*. Immunity, 2013. **39**(1): p. 1-10.
279. Milas, L., et al., *CpG oligodeoxynucleotide enhances tumor response to radiation*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5074-7.
280. Lorenzi, S., et al., *Type I IFNs control antigen retention and survival of CD8alpha(+) dendritic cells after uptake of tumor apoptotic cells leading to cross-priming*. J Immunol, 2011. **186**(9): p. 5142-50.
281. Yamazaki, N., et al., *Phase I study of pegylated interferon-alpha-2b as an adjuvant therapy in Japanese patients with malignant melanoma*. J Dermatol, 2016. **43**(10): p. 1146-1153.
282. Eggermont, A.M., et al., *Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial*. Lancet, 2008. **372**(9633): p. 117-26.
283. Fyfe, G., et al., *Results of treatment of 255 patients with metastatic renal cell carcinoma who received high-dose recombinant interleukin-2 therapy*. J Clin Oncol, 1995. **13**(3): p. 688-96.
284. Hong, M., et al., *Chemotherapy induces intratumoral expression of chemokines in cutaneous melanoma, favoring T-cell infiltration and tumor control*. Cancer Res, 2011. **71**(22): p. 6997-7009.
285. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
286. Voskens, C.J., et al., *The price of tumor control: an analysis of rare side effects of anti-CTLA-4 therapy in metastatic melanoma from the ipilimumab network*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53745.
287. Topalian, S.L., et al., *Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab*. J Clin Oncol, 2014. **32**(10): p. 1020-30.
288. Maio, M., et al., *Five-year survival rates for treatment-naïve patients with advanced melanoma who received ipilimumab plus dacarbazine in a phase III trial*. J Clin Oncol, 2015. **33**(10): p. 1191-6.

289. Emens, L.A. and G. Middleton, *The interplay of immunotherapy and chemotherapy: harnessing potential synergies*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(5): p. 436-43.
290. McCarthy, E.F., *The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas*. *Iowa Orthop J*, 2006. **26**: p. 154-8.
291. Janeway, C.A., Jr., *The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self*. *Immunol Today*, 1992. **13**(1): p. 11-6.
292. Hailemichael, Y., et al., *Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8(+) T cell sequestration, dysfunction and deletion*. *Nat Med*, 2013. **19**(4): p. 465-72.
293. Guo, C., et al., *Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future*. *Adv Cancer Res*, 2013. **119**: p. 421-75.
294. Finn, O.J., *Cancer vaccines: between the idea and the reality*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(8): p. 630-41.
295. Sun, J.B., J. Holmgren, and C. Czerkinsky, *Cholera toxin B subunit: an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(23): p. 10795-9.
296. Zylberman, V., et al., *High order quaternary arrangement confers increased structural stability to Brucella sp. lumazine synthase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(9): p. 8093-101.
297. Rose, A.S., et al., *Web-based molecular graphics for large complexes*, in *Proceedings of the 21st International Conference on Web3D Technology*. 2016, ACM: Anaheim, California. p. 185-186.
298. Braden, B.C., et al., *Divergence in macromolecular assembly: X-ray crystallographic structure analysis of lumazine synthase from Brucella abortus*. *J Mol Biol*, 2000. **297**(5): p. 1031-6.
299. Mejias, M.P., et al., *Protection of mice against Shiga toxin 2 (Stx2)-associated damage by maternal immunization with a Brucella lumazine synthase-Stx2 B subunit chimera*. *Infect Immun*, 2014. **82**(4): p. 1491-9.
300. Mejias, M.P., et al., *Immunization with a chimera consisting of the B subunit of Shiga toxin type 2 and brucella lumazine synthase confers total protection against Shiga toxins in mice*. *J Immunol*, 2013. **191**(5): p. 2403-11.
301. Velikovskiy, C.A., et al., *A DNA vaccine encoding lumazine synthase from Brucella abortus induces protective immunity in BALB/c mice*. *Infect Immun*, 2002. **70**(5): p. 2507-11.
302. Berguer, P.M., et al., *A polymeric bacterial protein activates dendritic cells via TLR4*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2366-72.
303. Baldridge, J.R., et al., *Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents*. *Expert Opin Biol Ther*, 2004. **4**(7): p. 1129-38.
304. West, M.A., et al., *Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling*. *Science*, 2004. **305**(5687): p. 1153-7.
305. Wang, Y., et al., *I-TASSER-MR: automated molecular replacement for distant-homology proteins using iterative fragment assembly and progressive sequence truncation*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(W1): p. W429-W434.
306. Wilkins, M.R., et al., *Protein identification and analysis tools in the ExPASy server*. *Methods Mol Biol*, 1999. **112**: p. 531-52.
307. Yang, J. and Y. Zhang, *I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(W1): p. W174-81.
308. Pucci, F., J.M. Kwasigroch, and M. Rومان, *SCoP: an accurate and fast predictor of protein stability curves as a function of temperature*. *Bioinformatics*, 2017. **33**(21): p. 3415-3422.

309. Ikai, A., *Thermostability and aliphatic index of globular proteins*. J Biochem, 1980. **88**(6): p. 1895-8.
310. Zou, Y., et al., *MICA is a target for complement-dependent cytotoxicity with mouse monoclonal antibodies and human alloantibodies*. Hum Immunol, 2002. **63**(1): p. 30-9.
311. Zwirner, N.W., et al., *Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients*. Hum Immunol, 2000. **61**(9): p. 917-24.
312. Zwirner, N.W., M.A. Fernandez-Vina, and P. Stastny, *MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes*. Immunogenetics, 1998. **47**(2): p. 139-48.
313. Zou, Y., et al., *Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection*. N Engl J Med, 2007. **357**(13): p. 1293-300.
314. Lu, J., et al., *The effect of MICA antigens on transplant outcomes: a systematic review*. J Evid Based Med, 2011. **4**(2): p. 106-21.
315. Baid-Agrawal, S. and U.A. Frei, *Kidney-transplant rejection and anti-MICA antibodies*. N Engl J Med, 2008. **358**(2): p. 196; author reply 196.
316. Kauke, T., et al., *Anti-MICA antibodies are related to adverse outcome in heart transplant recipients*. J Heart Lung Transplant, 2009. **28**(4): p. 305-11.
317. May, K.F., et al., *Isolation of human anti-MICA antibody from cancer patients responding to immunotherapies*. Journal of Clinical Oncology, 2012. **30**(15_suppl): p. 2502-2502.
318. Kringelum, J.V., et al., *Reliable B cell epitope predictions: impacts of method development and improved benchmarking*. PLoS Comput Biol, 2012. **8**(12): p. e1002829.
319. Haste Andersen, P., M. Nielsen, and O. Lund, *Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures*. Protein Sci, 2006. **15**(11): p. 2558-67.
320. Jespersen, M.C., et al., *BepiPred-2.0: improving sequence-based B-cell epitope prediction using conformational epitopes*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W24-W29.
321. Poletti, V. and F. Mavilio, *Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2018. **8**: p. 31-41.
322. Rossi, A.H., et al., *Brucella spp. Lumazine Synthase Induces a TLR4-Mediated Protective Response against B16 Melanoma in Mice*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0126827.
323. White-Gilbertson, S., et al., *Sex differences in the MB49 syngeneic, murine model of bladder cancer*. Bladder (San Franc), 2016. **3**(1).
324. Temizoz, B., E. Kuroda, and K.J. Ishii, *Vaccine adjuvants as potential cancer immunotherapeutics*. Int Immunol, 2016. **28**(7): p. 329-38.
325. Knudsen, N.P., et al., *Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19570.
326. Khong, H. and W.W. Overwijk, *Adjuvants for peptide-based cancer vaccines*. J Immunother Cancer, 2016. **4**: p. 56.
327. Makkouk, A. and G.J. Weiner, *Cancer immunotherapy and breaking immune tolerance: new approaches to an old challenge*. Cancer Res, 2015. **75**(1): p. 5-10.
328. Ullrich, E., et al., *New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology*. Oncoimmunology, 2013. **2**(10): p. e26097.
329. Zingoni, A., et al., *MICA-I29 Dimorphism and Soluble MICA Are Associated With the Progression of Multiple Myeloma*. Front Immunol, 2018. **9**: p. 926.

330. Eyquem, J., et al., *Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection*. Nature, 2017. **543**(7643): p. 113-117.
331. Rodrigues, J.G., et al., *Glycosylation in cancer: Selected roles in tumour progression, immune modulation and metastasis*. Cell Immunol, 2018.
332. Nahta, R., M.C. Hung, and F.J. Esteva, *The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(7): p. 2343-6.
333. Couto, O.F., I. Dvorchik, and B.I. Carr, *Causes of death in patients with unresectable hepatocellular carcinoma*. Dig Dis Sci, 2007. **52**(11): p. 3285-9.
334. Sanderson, R.J. and J.A. Ironside, *Squamous cell carcinomas of the head and neck*. BMJ, 2002. **325**(7368): p. 822-7.
335. Mehlen, P. and A. Puisieux, *Metastasis: a question of life or death*. Nat Rev Cancer, 2006. **6**(6): p. 449-58.
336. Lopez-Soto, A., et al., *Regulation of NKG2D signaling during the epithelial-to-mesenchymal transition*. Oncoimmunology, 2013. **2**(9): p. e25820.
337. Soriani, A., et al., *Chemotherapy-elicited upregulation of NKG2D and DNAM-1 ligands as a therapeutic target in multiple myeloma*. Oncoimmunology, 2013. **2**(12): p. e26663.
338. Okita, R., et al., *MHC class I chain-related molecule A and B expression is upregulated by cisplatin and associated with good prognosis in patients with non-small cell lung cancer*. Cancer Immunol Immunother, 2016. **65**(5): p. 499-509.
339. Xu, X., et al., *Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 194.
340. Morisaki, T., et al., *Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activated killer cells in hepatocellular carcinoma via the NKG2D-MICA/B system*. Anticancer Res, 2011. **31**(7): p. 2505-10.
341. Niu, C., et al., *Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and gammadelta T cell-mediated lysis in multiple myeloma*. Oncotarget, 2017. **8**(4): p. 5954-5964.
342. Batlle, E. and H. Clevers, *Cancer stem cells revisited*. Nat Med, 2017. **23**(10): p. 1124-1134.
343. Kreso, A., et al., *Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer*. Science, 2013. **339**(6119): p. 543-8.
344. Codony-Servat, J. and R. Rosell, *Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions*. Transl Lung Cancer Res, 2015. **4**(6): p. 689-703.
345. Tallerico, R., C. Garofalo, and E. Carbone, *A New Biological Feature of Natural Killer Cells: The Recognition of Solid Tumor-Derived Cancer Stem Cells*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 179.
346. Yin, T., et al., *Human cancer cells with stem cell-like phenotype exhibit enhanced sensitivity to the cytotoxicity of IL-2 and IL-15 activated natural killer cells*. Cell Immunol, 2016. **300**: p. 41-5.