



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

**“Regulación del fenotipo y funciones efectoras de las células  
*Natural Killer* por macrófagos M2. Relevancia en la  
inmunidad antitumoral”**

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

**Lic. Sol Yanel Nuñez**

Director de tesis: Dr. Norberto Walter Zwirner

Consejera de estudios: Dra. Verónica Edith García

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiopatología de la Inmunidad Innata, Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, 2019

## Resumen

---

### **“Regulación del fenotipo y funciones efectoras de las células *Natural Killer* por macrófagos M2. Relevancia en la inmunidad antitumoral.”**

Las células NK son relevantes en la inmunovigilancia contra tumores debido a su capacidad citotóxica y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Por otro lado, los macrófagos son células mieloides con gran plasticidad que luego de su activación pueden convertirse en macrófagos proinflamatorios (M1) o antiinflamatorios (M2). Dado que se conocen las consecuencias de la interacción entre células NK y los M1 pero su interacción con los M2 persiste poco caracterizada, el objetivo de esta Tesis de Doctorado fue investigar el resultado y los mecanismos subyacentes de dicha interacción. Utilizando un sistema de cocultivo *in vitro* observamos que los M2 inhibieron la producción de IFN- $\gamma$  de células NK humanas estimuladas con citoquinas a través de la secreción de TGF- $\beta$  y la citotoxicidad contra las células blanco K562 a través de la inducción de la expresión del receptor inhibitorio CD85j (ILT-2) en células NK y su interacción con el ligando HLA-G expresado en los M2. Asimismo, con el objeto de investigar la interacción entre macrófagos antiinflamatorios y células NK humanas en un contexto patológico, aislamos macrófagos asociados a tumor (TAM) de nefrectomías de carcinomas de células renales (CCR) en los cuales los TAM constituyen la población leucocitaria mayoritaria del infiltrado tumoral y su abundancia correlaciona con el mal pronóstico de la enfermedad. Observamos que estos TAM regularon negativamente la producción de IFN- $\gamma$  por células NK y que, al igual que los M2 diferenciados *in vitro*, pudieron ser repolarizados hacia un estado proinflamatorio que promovió las funciones tumoricidas de las células NK. Finalmente, validamos los datos empleando un modelo murino de CCR (Renca), en el que la depleción de TAM condujo a menor tamaño tumoral, menor frecuencia de células NK con fenotipo exhausto y mayor frecuencia de células NK productoras de IFN- $\gamma$ . En conjunto, estos resultados indican que los M2 y los TAM de CCR muestran funciones inmunosupresoras sobre las células NK que contribuyen a la progresión tumoral y abren la posibilidad de considerar la depleción o repolarización de los TAM como alternativas terapéuticas para atenuar la progresión del CCR.

**Palabras claves:** células NK, IFN- $\gamma$ , citotoxicidad, macrófagos M2, TAM, cáncer renal.

# Abstract

---

## **“Regulation of Natural Killer cell phenotype and effector functions by M2 macrophages. Relevance in antitumor immunity.”**

NK cells are relevant during immunosurveillance against tumors due to their cytotoxic capacity and the secretion of proinflammatory cytokines. On the other hand, macrophages are myeloid cells with great plasticity that upon activation can become proinflammatory (M1) or antiinflammatory (M2) macrophages. As the consequences of the interaction between NK cells and M1 are known but their interaction with M2 remains poorly characterized, the objective of this Doctoral Thesis was to investigate the outcome and the underlying mechanisms of this interaction. Using an *in vitro* coculture system, we observed that M2 inhibited IFN- $\gamma$  production by human NK cells stimulated with cytokines through the secretion of TGF- $\beta$  and cytotoxicity against K562 target cells through the induction of the expression of the inhibitory receptor CD85j (ILT-2) on NK cells and its interaction with its cognate ligand HLA-G expressed on M2. Likewise, in order to investigate the crosstalk between antiinflammatory macrophages and NK cells in a human pathology context, we isolated tumor-associated macrophages (TAM) from renal cell carcinoma (RCC) nephrectomies in which TAM constitute the most abundant leukocyte population of the tumor immune infiltrate and its abundance correlates with the poor prognosis of the disease. We noted that these TAM negatively regulated NK cell IFN- $\gamma$  production and, as observed with *in vitro* differentiated M2 macrophages, they could be repolarized into a proinflammatory state that promoted NK cell tumoricidal functions. Finally, we validated the data using a murine model of RCC (Renca cells), where TAM depletion induced a smaller tumor size, lower frequency of NK cells with exhausted phenotype and higher frequency of NK cells producing IFN- $\gamma$ . Altogether, these results indicate that M2 and RCC-derived TAM show immunosuppressive functions on NK cells that contribute to tumor progression and open the possibility of considering TAM depletion or repolarization as therapeutic alternatives to attenuate RCC progression.

**Keywords:** NK cells, IFN- $\gamma$ , cell cytotoxicity, M2 macrophages, TAM, renal cell carcinoma.

# Agradecimientos

---

En primer lugar agradezco a mi Director de Tesis Norberto Zwirner por haberme permitido integrar su grupo de investigación y brindarme todo lo necesario para realizar este trabajo. Gracias Norber por tanta confianza y libertad a la hora de pensar, diseñar y discutir cada experimento y gracias por darme tantas herramientas y comodidad para aprender. Aprovecho a manifestar que es admirable tu vocación y pasión por la ciencia y notorio como se mantienen intactos tus compromisos e inquietudes. Gracias por transmitirme con ello esa motivación tan necesaria en el día a día y sobre todo, gracias por impulsar siempre el trabajo en equipo. Fue muy valioso sentirse parte de un grupo, un grupo de verdad, donde todo se charla y se comparte, se piensa en el otro y se construyen amistades.

Quiero agradecer también a mis compañeros de laboratorio por toda su ayuda en este trabajo. En este tiempo aprendí, crecí y me divertí mucho. Gracias Mer y Caro por el primer mate calentito de cada mañana antes de empezar el día, por estar cada vez que necesité una mano o un consejo y ser siempre pilares de contención. Gracias Andre, por darme el primer “empujón” y enseñarme a pensar mis primeros experimentos. Gracias Adri, por traer energías renovadas y saber contagiarlas. Y finalmente, gracias Flor, Jessy y Vicky por hacer divertidos los tiempos de incubación en las largas noches de pipeteo, siempre con música, baile y buen humor y por haber formado del laboratorio un espacio tan querido. Gracias Flor y Jessy por la amistad que formamos y que trasciende el ámbito laboral, por ser oídos en los tiempos difíciles y compañía en los más divertidos, por esos viajes tan intensos como efímeros y por estar en los mejores momentos de todo esto. Gracias Flor por tanto apoyo puertas afuera del laboratorio también. A todo el grupo entero, GRACIAS, me llevo grandes aprendizajes y enormes recuerdos, son un equipo hermoso.

Gracias a Nico Sarbia y Rami, por todas sus visitas y mates en las tardes de trabajo.

A CONICET por otorgarme la beca para realizar esta Tesis y a la UBA por formarme en todo sentido. Sin una Universidad pública, gratuita y de calidad como la UBA, para mí y muchos “otros” hubiera sido imposible transitar este camino. Gracias entonces a quienes conforman esta institución, instrumento de igualdad social insuperable del cual me

enorgullezco todos los días. A todos esos “otros”, que de alguna manera, sin contribuir directamente en esta Tesis me dieron una mano, también gracias.

A mi pueblo verde y pulmón de cada semana, Francisco Álvarez, por centrarme en mi esencia y a mi Tuli por su eterno buen humor y compañía en extensos amaneceres de estudio.

A mis camaradas de militancia del Barrio Mugica de la Villa 31, por compartir un mismo sueño y conciencia popular. Gracias por integrarme desde el primer día y acercarme a los niños, por enseñarme a valorar la política y mantenerme en la lucha.

A Joaquín, por ser la persona más compañera y dulce que conocí. Gracias por estar conmigo en la totalidad de este proyecto y por todos esos años hermosos de coincidencia.

A mis amigos, personas que enriquecen y le dan color a mi vida.

Empezando por la banda de CasaBA. Gracias Ivar por estar al lado, en momentos en de pura risa y en los de crisis existenciales también. Gracias a todos por las incontables salidas, por los desayunos y parrilladas en la terraza, por las siestas en Plaza Armenia, por las noches de series hasta cualquier hora de la madrugada o de debates políticos y filosóficos. Gracias por tanta sencillez, por tanta distracción, por cada plan nuevo que surgió en esa casa que me sacó de la cotidianeidad y disfruté muchísimo.

A mis amigas de barrio y de toda la vida, Cami e Ivi. Gracias por conservar intacta nuestra amistad. A pesar de haber crecido por caminos tan distintos y haber perdido la frecuencia de nuestras visitas, nuestros reencuentros siguen siendo tan cómodos como cuando éramos niñas. Gracias por ser fieles compañeras y estar siempre.

Al grupito de la secundaria, Dani, Nacho, Nahuel y Maldi, gracias a todos por tantos momentos de charlas y diversión.

A mis amigos de la facultad, gracias Ro y Mile por ese año que nos encontró a las tres juntas en Colegiales, viviendo cosas nuevas, conociéndonos y aprendiendo tanto. Gracias por los infinitos mates y los intermitentes ciclos REM de sueño que nos unieron trasnochando y preparando finales, su compañía que fue lo mejor de esos momentos. Gracias a ustedes y a todo el resto del grupo, Facu, Bruno, Lu Sala, Marian, Lu Ceballos, Sabri, Sanjua, Caro, Flor y

Lucas, por las múltiples juntadas en la biblio parlante, las siestas entre clase y clase al costado del río, los mates salvadores en las teóricas de botánica y física, los vinos que nos tomamos por las noches en lo del Sanjua. Gracias por todas esas vivencias que me hicieron disfrutar tanto de “Exactas”.

A mi familia, toda esa “manada” de tíos y primos que me aglomera los domingos. Gracias por la cantidad de domingos envidiables que me hicieron vivir, por las multitudinarias vacaciones en el mar, por cada año nuevo que recibimos juntos, gracias.

A mi hermoso primo Lauti. A él, que siendo tan pequeño y habiéndose ido tan pronto, de un golpe fuerte como ninguno me puso en pausa, me ordenó, me enseñó tanto de la vida. Quién sabe dónde andará repartiendo su dulzura en estos días, a dónde habrá ido esa sonrisa. Gracias por tanto Pupi, en mí sos eterno y te abrazaré siempre en el recuerdo.

A mis abuelos, Derlis y Pituca. Que difícil resumir todas las cosas por las que les diría “gracias” a ustedes dos que me enseñaron lo que es el amor gigante, lo que es una familia y cómo mantenerla unida, que me mostraron día a día lo que es tener ganas de vivir. Gracias abuela por cada vianda y abuelo por cada cuento optimista. Gracias por existir y formar parte de mi vida, son grandes ejemplos de todo lo que piense y enormes personas.

A Ailén. Aunque poco se superponen nuestros mundos hoy, sé que contamos la una para la otra en cualquier momento de la vida, gracias hermana por estar.

A mi mamá y mi papá, Silvia y Omar. Gracias por darme fuerzas y toda la libertad de elegir este camino que hoy sin dudas volvería a elegir. Gracias por creer en mí y por apostar a la educación pública siempre, por enseñarme a valorarla y hacerme sentir el orgullo que hoy siento de haber sabido aprovechar cada oportunidad. Gracias mami por ser tan dulce, por tus manos compañeras que sostuvieron mi confianza cuando estuvo a punto de caer, por cada tecito contenedor. Gracias papi, por ser tan creativo e incitarme a divagar en aquellas charlas científicas de sobremesa, gracias por cada apunte. Todo este trabajo es para ustedes dos, que con lo justo supieron darme todo y con el ejemplo enseñarme a priorizar valores, a luchar en contra de cada injusticia y sentir empatía por cada ser humano. Gracias a los dos por demostrarme lo rico que sabe la sencillez y hacerme ver todos los días que *todas las hojas son del viento*. Los amo.

**A mi mamá y mi papá**

## Trabajos publicados

---

Parte de los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado forman parte de la siguiente publicación:

***“Human M2 Macrophages Limit NK Cell Effector Functions through Secretion of TGF- $\beta$  and Engagement of CD85j”.***

Sol Y. Nuñez, Andrea Ziblat, Florencia Secchiari, Nicolás I. Torres, Jessica M. Sierra, Ximena L. Raffolraolagoitia, Romina E. Araya, Carolina I. Domaica, Mercedes B. Fuertes, Norberto W. Zwirner.

**The Journal of Immunology (2018) 200(3):1008-1015.** DOI: 10.4049/jimmunol.1700737.

Asimismo, parte de los resultados presentados en esta Tesis de Doctorado formarán parte de la siguiente publicación:

***“Tumor associated macrophages impair NK cell effector functions and contribute to tumor progression in renal cell carcinoma”***

Sol Y. Nuñez, María V. Regge, Florencia Secchiari, Jessica M. Sierra, Adrián Friedrich, Agustín Rovegno, Fernando Secín, Nicolás Richards, Carlos Ameri, Hernando Ríos Pita, Luis Rico, Mauro Mieggi, Carolina I. Domaica, Mercedes B. Fuertes and Norberto W. Zwirner.

**Manuscrito en preparación.**



# Índice

---

<b>Abreviaturas</b> .....	12
<b>Introducción</b> .....	15
1. Células citotóxicas naturales ( <i>Natural Killer</i> , NK). .....	15
1.1. Generalidades.....	15
1.2. Receptores y funciones efectoras.....	21
2. Macrófagos .....	29
2.1. Generalidades.....	29
2.2. Plasticidad .....	32
2.3. Diálogo recíproco con células NK.....	39
3. Inmunología antitumoral .....	40
3.1. Teoría de la inmunoedición o de las tres “E” .....	40
3.2. Escape tumoral mediado por TAM .....	44
3.3. CCR: Generalidades y modelos experimentales para su estudio .....	49
<b>Objetivos</b> .....	53
<b>Materiales y métodos</b> .....	54
1. Anticuerpos.....	54
1.1. Ac monoclonales contra moléculas humanas.....	54
1.2. Ac monoclonales contra moléculas de ratón.....	55
2. Reactivos.....	55
3. Líneas celulares y condiciones de cultivo .....	56
4. Muestras de sangre periférica y nefrectomías de tumores renales humanos.....	56
4.1. Procesamiento de muestras humanas.....	57
5. Ratones .....	57

---

5.1.	Experimentos <i>in vivo</i> .....	58
5.1.1.1.	Desafío con línea celular tumoral Renca .....	58
5.1.1.2.	Depleción de TAM.....	58
5.1.1.3.	Procesamiento de órganos .....	59
5.2.	Experimentos <i>ex vivo</i> .....	59
5.2.1.1.	Ensayo de producción de IFN- $\gamma$ <i>ex vivo</i> .....	59
5.2.1.2.	Ensayo de degranulación <i>ex vivo</i> .....	60
6.	Aislamiento de poblaciones celulares .....	60
6.1.	Aislamiento de células NK.....	60
6.2.	Aislamiento de monocitos .....	61
6.3.	Aislamiento de TAM a partir de muestras de biopsias de pacientes con CCR .....	61
7.	Diferenciación de macrófagos humanos <i>in vitro</i> .....	62
8.	Obtención de medios condicionados (MC) de macrófagos humanos diferenciados <i>in vitro</i> .....	62
9.	Experimentos de cocultivo de macrófagos y células NK <i>in vitro</i> .....	62
9.1.	Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ por células NK.....	63
9.2.	Determinación de marcadores de activación en células NK .....	64
9.3.	Ensayo de degranulación de células NK.....	64
9.4.	Ensayo de citotoxicidad .....	65
9.5.	Determinación de viabilidad .....	66
9.6.	Formación de conjugados.....	66
10.	Marcación de poblaciones celulares con trazadores fluorescentes.....	66
11.	ELISAS (ensayos inmunoenzimáticos de adsorción) .....	67
12.	Citometría de Flujo.....	68
12.1.	Inmunomarcación de superficie .....	69

---

12.2.	Inmunomarcación intracitoplasmática .....	69
12.3.	Medición de la producción de NO .....	70
13.	Análisis bioinformático .....	70
14.	Análisis estadístico .....	70
<b>Resultados</b>	.....	<b>72</b>
1.	Efectos de los macrófagos M2 diferenciados <i>in vitro</i> sobre el fenotipo y funciones efectoras de células NK humanas.....	72
1.1.	Caracterización de macrófagos M1 y M2 humanos diferenciados <i>in vitro</i> ...	72
1.2.	Efecto de los macrófagos M2 sobre la activación de células NK.....	74
1.3.	Efecto de los macrófagos M2 sobre la producción de IFN- $\gamma$ por células NK..	77
1.4.	Efecto de los macrófagos M2 sobre la citotoxicidad de células NK contra las células blanco K562 .....	83
1.5.	Repolarización de los macrófagos M2 hacia un fenotipo M1 .....	91
2.	Validación de los resultados mediante el estudio del efecto de los TAM de CCR sobre el fenotipo y funciones efectoras de células NK humanas y murinas .....	94
2.1.	TAM de CCR humanos .....	94
2.1.1.1.	Caracterización de los TAM de CCR humanos .....	94
2.1.1.2.	Efecto de los TAM de CCR humanos sobre las funciones efectoras de células NK .....	97
2.2.	TAM de CCR murinos.....	99
2.2.1.1.	Efecto de los TAM de CCR murinos sobre el crecimiento tumoral, fenotipo y funcionalidad de las células NK intratumorales .....	99
<b>Discusión</b>	.....	<b>104</b>
<b>Conclusiones</b>	.....	<b>118</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	.....	<b>121</b>

# Abreviaturas

---

Ac: Anticuerpo(s)	FasL: Ligando de Fas
ACK: Buffer Amonio-Cloruro-Potasio	Flt3-L: Ligando de Flt3
AcMo: Anticuerpo(s) monoclonal(es)	FMO: fluorescencia menos uno o <i>fluorescence minus one</i>
ANOVA: Análisis de la varianza o <i>analysis of variance</i>	GL: Ganglio(s) linfático(s)
Arg1: Arginasa-1	GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
ARNdc: ARN doble cadena	HLA: Antígeno leucocitario humano o <i>Human leukocyte antigen</i>
CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	ICB: puntos de control inmunológico o <i>immune checkpoint blockers</i>
CCR: Carcinoma de células renales	IFN: Interferón
CD: Célula(s) dendrítica(s)	IL: Interleuquina
CF: Citometría de flujo	IL-15R $\alpha$ : Receptor de IL-15 de alta afinidad
CFSE: Éster de succinimidil-carboxifluoresceína	ILC: Célula(s) linfoide(s) innata(s) o <i>Innate lymphoid cell(s)</i>
CI: Control de isotipo	ILT-2: <i>Immunoglobulin-like transcript 2</i>
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad	iNOS: Óxido nítrico sintasa inducible o <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
CMV: Citomegalovirus	ITAM: <i>Immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>
CPA: Célula(s) presentadora(s) de antígeno	ITIM: <i>Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
DHE: Dihidroetidio	KIR: <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
E:B: Célula efectora:célula blanco	KIRC: Carcinoma renal de células claras
EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico o <i>Epidermal growth factor receptor</i>	
ELISA: Ensayo inmunoenzimático de adsorción	

LAMP: <i>Lysosome-associated membrane protein</i>	NLR: Receptor(es) tipo NOD o <i>NOD-like receptor(s)</i>
LB: Linfocito B	NO: Óxido nítrico
LPS: Lipopolisacárido	PAF: Factor de activación de plaquetas o <i>Platelet-activating factor</i>
LT: Linfocito T	PBMC: Células mononucleares de sangre periférica o <i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
LTi: Célula(s) inductora(s) de tejido linfoide o <i>Lymphoid tissue inducer cell (s)</i>	PBS: Buffer fosfato salino
MC: Medio condicionado	PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas o <i>Platelet derived growth factor</i>
MCMV: Citomegalovirus murino	PFA: Para-formaldehído
M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos o <i>Macrophage colony-stimulating factor</i>	Pfp: Perforina
M-CSFR: Receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos o <i>Macrophage colony-stimulating factor receptor</i>	PGE2: Prostaglandina E2
MDSC: Célula(s) mieloide(s) supresora(s) o <i>Myeloid-derived suppressor cell(s)</i>	PMAD: Patrón(es) molecular(es) asociado(s) a daño
MFI: Intensidad de fluorescencia media o <i>Mean Fluorescence Intensity</i>	PMAP: Patrón(es) molecular(es) asociado(s) a patógenos
MICA/B: <i>MHC class I chain-related protein A/B</i>	Poly I:C: Ácido poliinosínico-policitidínico
MMP: metaloproteinasas de la matriz o <i>matrix metalloproteinases</i>	RAE-1: <i>Retinoic acid early-induced protein 1</i>
MULT-1: <i>Murine ULBP-like transcript</i>	RLR: <i>Retinoic acid-inducible gene (RIG)-1-like receptors</i>
NCR: Receptor(es) de citotoxicidad natural o <i>Human natural cytotoxicity receptor(s)</i>	ROS: Intermediarios reactivos de oxígeno
NFκB: Factor nuclear κB	RRP: Receptor(es) de reconocimiento de patrón(es)
NK: <i>Natural Killer</i>	SCF: <i>Stem cell factor</i>
NKIT: célula(s) NK infiltrante(s) de tumor(es)	SEM: Error estándar de la media o <i>Standard error of the mean</i>
	SF: Solución fisiológica

SFB: Suero fetal bovino

SHP-1: *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1*

TAM: Macrófago(s) asociado(s) a tumor(es) o *Tumor-associated macrophage(s)*

TCR: Receptor de célula T o *T cell receptor*

TGF- $\beta$ : Factor de crecimiento transformante  $\beta$  o *Transforming growth factor  $\beta$*

Th: T helper

TLR: Receptores tipo Toll o *Toll like receptors*

TNF: Factor de necrosis tumoral o *Tumor necrosis factor*

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

ULBP: *UL16 binding proteins*

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular o *Vascular endothelial growth factor*

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular o *Vascular endothelial growth factor receptor*

# Introducción

---

## 1. Células citotóxicas naturales (*Natural Killer, NK*).

### 1.1. Generalidades

Las células NK son actores fundamentales de la inmunovigilancia contra tumores y células infectadas con virus, así como también son capaces de eliminar células estresadas o que han sufrido shock térmico, respondiendo espontáneamente frente a las células blanco sin necesidad de la previa exposición al antígeno [1]. Esta citotoxicidad "espontánea" o "natural" fue la que determinó el descubrimiento de las células NK en la década de 1970, cuando investigadores intentaban explicar la presencia de actividad citotóxica de los linfocitos contra las células tumorales en ratones experimentales no inmunizados [2–4].

La relevancia de las células NK en la inmunidad frente a infecciones virales ha sido demostrada mayormente mediante infecciones experimentales en ratones. Bukowski y colegas demostraron que la transferencia adoptiva de médula ósea de cepas resistentes a virus a ratones irradiados letalmente les confirió resistencia a las infecciones virales, mientras que el tratamiento con anticuerpos (Ac) antiasialo GM1 que depletan de células NK, anuló dicha resistencia [5]. Además, el tratamiento de depleción de células NK aumentó la gravedad de la hepatitis murina [6] y la neumonía por influenza en ratones y hámsteres [7]. En humanos, ha sido más difícil demostrar la importancia de las células NK en la inmunidad contra infecciones virales debido a que la deficiencia aislada de células NK es muy poco frecuente. Sin embargo, Biron y colaboradores han descrito un caso de deficiencia de células NK en una adolescente que experimentó infecciones virales recurrentes, incluyendo varicela diseminada primaria, neumonía primaria por citomegalovirus (CMV) e infección primaria severa por herpes simple cutáneo. Las pruebas *in vitro* revelaron funcionalidad normal de neutrófilos, linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) y mediante terapia antiviral la paciente pudo recuperarse de cada infección, presentando respuesta específica de células T y aumento de títulos de Ac específicos durante la convalecencia de la infección por varicela.

Este caso proporciona la mejor evidencia directa de que las células NK juegan un papel crucial en la inmunidad humana contra infecciones por herpesvirus [8]. Posiblemente, las respuestas efectoras de las células NK dificulten la difusión del virus y limiten la carga total de patógenos durante las primeras fases de la infección, mientras que durante las más tardías las respuestas inmunitarias humorales y los LT específicos de antígeno medien el control final del virus.

Por otro lado, en lo que respecta a la importancia de la actividad de las células NK en la eliminación de células neoplásicas, se ha demostrado una correlación directa entre el nivel de actividad de las células NK murinas y la resistencia frente al trasplante de un tumor singeneico [9]. A su vez, ratas depletadas de células NK fueron más susceptibles a la inyección de células del adenocarcinoma mamario MADB106 y tuvieron una mayor incidencia de metástasis pulmonares experimentales. En estos animales, la transferencia adoptiva de linfocitos altamente enriquecidos en células NK restauró parcial o totalmente la capacidad de inhibir el desarrollo de metástasis, mientras que la transferencia del mismo número de LT maduros de sangre periférica no tuvo ningún efecto sobre el desarrollo tumoral bajo idénticas condiciones [10]. Evidencias similares fueron reportadas por Hanna y colegas, quienes demostraron que la transferencia adoptiva de esplenocitos singeneicos a ratones tratados con dosis inmunosupresoras de ciclofosfamida les confirió resistencia a metástasis experimentales, mientras que la transferencia de los esplenocitos depletados selectivamente de células NK no exhibió dicha actividad protectora [11]. En humanos, la evidencia que demuestra que las células NK están involucradas en la inmunovigilancia contra tumores proviene de estudios de pacientes con células NK funcionalmente deficientes, como es el caso de la linfocitosis hemofagocítica, patología donde la actividad citotóxica de las células NK se encuentra marcadamente reducida. Estos pacientes tienen una mayor predisposición al desarrollo de diversos tipos de cáncer, como melanoma y linfoma, en comparación con individuos sanos [12]. Además, se demostró que las células NK de pacientes con tumores epiteliales malignos presentan actividad citotóxica deficiente comparada con la actividad de las células NK de donadores sanos y que dicha actividad citotóxica se encuentra mayormente reducida en pacientes con enfermedad avanzada respecto a pacientes con tumores localizados [13]. Más aún, un estudio de seguimiento durante once años de una cohorte de 3625 individuos reveló que individuos con una baja



actividad citotóxica en linfocitos de sangre periférica presentaron un riesgo significativamente mayor de padecer cáncer en comparación con aquellos individuos con actividad citotóxica mediana o alta [14].

Recientemente se ha reclasificado a las células NK como uno de los cinco subgrupos de las células linfoides innatas o *Innate Lymphoid Cells* (ILC), junto con las ILC de tipo 1, 2 y 3 (ILC1, ILC2, ILC3) y las células inductoras de tejidos linfoides (LTi o *lymphoid tissue inducer cells*). Esta clasificación se fundamenta en un paralelismo funcional y fenotípico que existe con las diferentes subpoblaciones de LT. Las células NK constituyen el único subgrupo de ILC con capacidad citotóxica, por lo que son consideradas la contraparte innata de los LT CD8 citotóxicos, mientras que las ILC1, ILC2, ILC3 reflejan funcionalmente a los linfocitos CD4 T helper (Th)1, Th2 y Th17, respectivamente. Sin embargo, a diferencia de los LT, las ILC no expresan receptores de antígenos propios de la inmunidad adaptativa ni experimentan expansión clonal al ser estimuladas, sino que actúan tempranamente en la respuesta inmune respondiendo a señales o citoquinas inductoras expresadas por las células residentes en el tejido. Con excepción del subgrupo de células NK que mayormente recircula en sangre periférica, el resto de las ILC se encuentra en mucosas y en piel, siendo escasas en tejidos linfoides [15].

Mediante experimentos de transferencia adoptiva se infirió que la vida media de las células NK maduras en la periferia es de alrededor de 7 a 10 días y que permanecen relativamente quiescentes, aunque pueden experimentar proliferación homeostática cuando son transferidas a un ambiente linfopénico [16–18]. En esos casos, su supervivencia depende de la expresión del receptor de IL-15 de alta afinidad (IL-15R $\alpha$ ) en células accesorias, dado que células NK deficientes en IL-15R $\alpha$  sobreviven al ser transferidas a ratones normales pero no a ratones deficientes en IL-15R $\alpha$  [19].

En el ser humano, las células NK maduras constituyen del 5 al 15 % de las células linfoides de sangre periférica. Se definen como células que expresan el marcador de superficie CD56 y carecen de la expresión de CD3 (CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). Se clasifican en dos grupos en función a los niveles de expresión de CD56 y CD16 (receptor para la porción Fc de inmunoglobulina G de tipo IIIA, Fc $\gamma$ IIIA): las células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> y las células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>. Por otra parte, dado que los modelos murinos son una herramienta muy

utilizada en el campo de la inmunología, resulta importante mencionar que las células NK de ratón carecen de la expresión de CD56, por lo que en consecuencia se definen fenotípicamente como células CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> o CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>, dependiendo de la cepa [20]. Todavía no se sabe si existen subconjuntos de células NK análogos a las células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> humanas, aunque mediante análisis transcriptómicos recientemente se han revelado similitudes entre las células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> de sangre humana y las células linfoides innatas CD127<sup>+</sup> de ratón [21].

El desarrollo del linaje de células NK es similar en ratones y humanos, y se produce principalmente en la médula ósea. Al igual que otras células sanguíneas, las células NK humanas derivan de células madre hematopoyéticas CD34<sup>+</sup>. Su desarrollo es dependiente de factores de crecimiento y citoquinas secretados por las células estromales del microambiente de la médula ósea, tales como interleuquina (IL)-7, SCF (*Stem cell factor*, ligando de c-kit) y Flt3-L (ligando de Flt3) [22, 23]. Además, tanto en humanos como en ratones, la IL-15 juega un rol crítico promoviendo la diferenciación de células NK, su maduración funcional y sobrevivencia [24]. Más recientemente, se ha identificado que las últimas etapas de maduración también pueden ocurrir en órganos periféricos, dado que se han encontrado progenitores linfoides tempranos con potencial linaje NK en ganglios linfáticos (GL) [25], timo [26] e hígado [27], lo que sugiere que algunos subconjuntos de células NK humanas se desarrollan en compartimentos extramedulares.

En ambas especies las células NK maduras están ampliamente distribuidas en el organismo, estando presentes tanto en órganos linfoides como no linfoides. La mayoría de las células NK humanas se encuentra circulando en sangre periférica, pero también se han encontrado en médula ósea, hígado, útero, bazo, hueso y pulmón, y en una menor cantidad en órganos linfáticos secundarios y timo [28, 29]. Mientras que el 90% de las células NK en sangre periférica son CD56<sup>dim</sup>, aproximadamente más del 90% de las células NK en GL son CD56<sup>bright</sup> [20, 30]. Por otro lado, las células NK de ratón presentan una distribución similar, con la excepción de que en condiciones homeostáticas se encuentran en bajas cantidades en los órganos linfáticos secundarios, siendo reclutadas a estos sitios sólo como consecuencia de estímulos proinflamatorios en tejidos periféricos cercanos [31].

Las células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> poseen características fenotípicas y funcionales diferentes. La primera subpoblación expresa altos niveles de los mediadores de citotoxicidad perforina (Pfp) y granzimas, lo que les confiere una alta capacidad citotóxica. Por lo tanto, más allá de que estas células producen citoquinas luego del reconocimiento de las células blanco, se considera que su función efectora principal es la citotoxicidad natural y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (CCDA) [32]. Por otro lado, las células NK CD56<sup>bright</sup> expresan bajos niveles de los mediadores líticos Pfp y granzimas y poseen escasa capacidad citotóxica, pero pueden adquirir esta función luego de su activación [33, 34]. Además, expresan de manera constitutiva el receptor de alta afinidad para IL-2, compuesto por las cadenas IL-2R $\alpha$  (CD25), IL-2R $\beta$  (CD122) e IL-2R $\gamma_c$  (CD132), lo que les confiere una alta tasa de proliferación *in vitro* e *in vivo* en respuesta a dosis bajas (picomolares) de IL-2. En cambio, las células NK CD56<sup>dim</sup> en reposo expresan sólo el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, por lo que proliferan *in vitro* débilmente en respuesta a dosis altas de IL-2 (1 a 10 nM) [34, 35], aunque puede inducirse la expresión de CD25 luego de un estímulo de activación [36]. Además, en contraposición con las células NK CD56<sup>dim</sup>, secretan grandes cantidades de citoquinas como interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF o *tumor necrosis factor*)- $\alpha$  y factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF o *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) cuando son estimuladas con citoquinas proinflamatorias [37].

En los últimos años se han publicado varios trabajos que respaldan la hipótesis de que las células NK CD56<sup>bright</sup> son precursoras de las células NK CD56<sup>dim</sup> y que esta diferenciación puede tener lugar en los GL durante la activación inmune. Por un lado, se ha observado que en estado fisiológico los GL contienen casi exclusivamente células NK CD56<sup>bright</sup>, mientras que una fracción importante de células CD56<sup>dim</sup> está presente en GL altamente inflamados y en la linfa eferente. Estos resultados sugieren que en estado estacionario o muy temprano durante una respuesta inmune, las células NK CD56<sup>bright</sup> pueden reclutarse a los GL, mientras que posteriormente las células NK maduras abandonan los GL y circulan por sangre periférica para llegar a los tejidos inflamados [31, 38]. A su vez, Jacobs y colaboradores demostraron que luego de un trasplante alogénico o autólogo de médula ósea las células NK CD56<sup>bright</sup> fueron las primeras células linfoides en repoblar la sangre periférica, constituyendo el 70% de las células NK circulantes y declinando posteriormente a niveles normales luego de

cuatro meses del trasplante [39]. Además, se ha demostrado que las células CD56<sup>bright</sup> poseen telómeros más largos que las CD56<sup>dim</sup> y que mediante la inducción con citoquinas, en particular IL-2 e IL-15, pueden adquirir el fenotipo de las células CD56<sup>dim</sup>, mientras que éstas últimas mantienen sustancialmente sus características de células terminalmente diferenciadas [33, 40]. Más aún, varios estudios identificaron células NK con propiedades fenotípicas y funcionales propias de ambas subpoblaciones de células NK, sugiriendo la existencia de etapas intermedias en la diferenciación desde células NK CD56<sup>bright</sup> hacia células CD56<sup>dim</sup> [41–43].

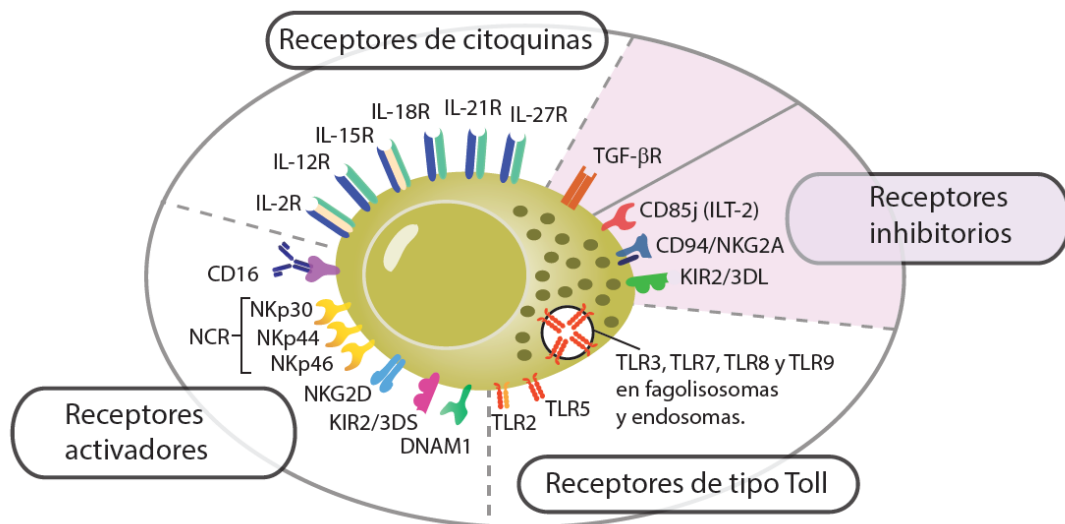
En ratones, el programa de maduración de las células NK se encuentra descrito en mayor medida y puede ser dividido en cuatro etapas que se diferencian según los niveles de expresión de CD11b y CD27. A medida que las células maduran aumentan secuencialmente la expresión de CD11b y disminuyen la expresión de CD27, por lo que las células NK más inmaduras son CD27<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup> y las más maduras CD27<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>. En su estadio inicial, las células NK presentan gran potencial proliferativo y mínimas funciones efectoras que comienzan a adquirir a medida que maduran, mientras que paralelamente disminuyen la capacidad de proliferar. En su estadio terminal, las células NK tienen características de células exhaustas, con funciones efectoras disminuidas y alta susceptibilidad a la apoptosis espontánea [44, 45].

Durante la última década se ha reportado la capacidad intrínseca de células NK murinas y humanas de “recordar” eventos de activación anteriores en el contexto de la infección por CMV o MCMV (citomegalovirus murino), respectivamente [46, 47]. Otros estudios han identificado células NK de vida media larga o de “memoria” tras el tratamiento con citoquinas proinflamatorias (IL-12, IL-15 e IL-18), capaces de producir mayores niveles de IFN- $\gamma$  frente a un nuevo estímulo que las células NK que no recibieron un estímulo previo [48, 49]. A su vez, se ha observado que células NK murinas de memoria transferidas a ratones singéneos o inmunodeficientes persistieron en el receptor durante tres meses y dieron como resultado una mayor capacidad para controlar linfomas y tumores sólidos *in vivo* [50]. Por su parte, células NK humanas de memoria transferidas de forma adoptiva a pacientes con leucemia mieloide aguda proliferaron y se expandieron, observando respuestas clínicas en cinco de los nueve pacientes evaluados, incluidas cuatro remisiones completas [51]. Estos

hallazgos podrían resultar beneficiosos para el uso terapéutico de células NK en enfermedades infecciosas y oncológicas [52].

## 1.2. Receptores y funciones efectoras

Las células NK expresan un amplio repertorio de receptores en su membrana celular capaces de sensar diferentes señales extracelulares que pueden ser factores solubles o moléculas expresadas por otras células. Estas señales desencadenarán la actividad de quinasas y fosfatasa, dependiendo de si las señales son activadoras o inhibitorias, y de cuyo balance dependerá la respuesta funcional de la célula NK. Entre las moléculas que expresan estas células se hallan los receptores de citoquinas, receptores de quemoquinas, receptores de reconocimiento de patrones (RRP) y receptores activadores e inhibitorios que les permiten reconocer potenciales blancos celulares (**Figura 1**) [53].



**Figura 1. Principales receptores expresados en las células NK e involucrados en la regulación de sus funciones efectoras.** Se describen los principales receptores activadores e inhibitorios de las células NK. La integración del conjunto de señales que la célula NK reciba a través de estos receptores es la que determinará su respuesta funcional. La figura fue levemente modificada de [53].

En condiciones fisiológicas la actividad de las células NK se encuentra normalmente restringida debido al reconocimiento, a través de receptores inhibitorios, de ligandos específicos presentes en la superficie de las células sanas. Esto provoca que secuencias localizadas en los dominios citosólicos de dichos receptores inhibitorios, denominadas ITIM (*Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*), recluten y activen las fosfatasa SHP-1 (*Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1*) y SHP-2, lo que inicia señalizaciones intracelulares inhibitorias que previenen su activación [54, 55]. Dentro de este grupo de receptores se destacan los miembros de la familia KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*) y los receptores ILT (*Immunoglobulin-like transcript*)-2 e ILT-4 en humanos, la familia Ly49 en ratones, y el heterodímero CD94/NKG2A en ambas especies. Los principales ligandos de los receptores inhibitorios son las moléculas clásicas y no clásicas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I) que en humanos se denominan Antígenos leucocitarios humanos (HLA) y en ratones se denominan complejo H-2 [56].

Los receptores KIR y la correspondiente familia funcional equivalente en ratones Ly49, son una familia altamente polimórfica de receptores que reconocen las moléculas de clase I clásicas del HLA: HLA-A, -B y -C en humanos o las moléculas H-2K, H-2D y H-2L en ratón. De este modo, existe una diversidad genética muy alta en las familias de receptores KIR y Ly49 y cada célula NK expresa su propio repertorio de receptores. Por otro lado, el heterodímero CD94-NKG2A, relacionado con lectinas de tipo C, se encuentra expresado en ambas especies y reconoce a la molécula no clásica HLA-E en humanos [57] y a su equivalente Qa-1 en ratón [58], las que se caracterizan por un polimorfismo limitado. Asimismo, los receptores inhibitorios ILT-2 (también denominados CD85j) pueden reconocer moléculas de clase I clásicas del HLA, pero se unen con mayor afinidad a la molécula no clásica HLA-G [59], generando una señal negativa que inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y la actividad citotóxica de las células NK [60]. En condiciones fisiológicas, la molécula HLA-G se encuentra expresada en las células trofoblásticas que invaden la decidua materna durante el embarazo humano, por lo que en ese contexto HLA-G contribuye a la tolerancia del feto inhibiendo las respuestas inmunes maternas [61]. Por otra parte, la molécula equivalente a HLA-G en ratón se denomina Qa-2 y al día de hoy no se conoce su receptor [62]. Un candidato potencial equivalente al receptor humano ILT-2/CD85j es el receptor inhibitorio

PIR-B, que se ha demostrado que interactúa con las moléculas CMH de clase I [63] y HLA-G [64]. Sin embargo, todavía no existe evidencia de una interacción funcional entre PIR-B y Qa-2 y además, la expresión de dicho receptor se encuentra restringida a células B y de linaje mieloide, incluyendo mastocitos, macrófagos, granulocitos, CD y osteoclastos, pero no se expresa en LT ni en células NK [63].

Las células NK pueden activarse rápidamente en respuesta a citoquinas inflamatorias o frente al contacto con células blanco que hayan perdido la expresión de moléculas de clase I del CMH o que presenten aumento en la expresión de ligandos reconocidos por sus receptores activadores. En estos casos, los dominios citosólicos de estos receptores activadores, que poseen motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosin-based activating motif*), reclutan quinasas que transducirán señales de activación. Se ha reportado que la expresión de las moléculas de clase I del CMH disminuye o se pierde en células infectadas o neotransformadas, por lo que comienzan a ser reconocidas por las células NK como potenciales blancos, fenómeno conocido como “reconocimiento por pérdida de lo propio” (o *missing self*) [65]. En otros casos, células que experimentan transformación tumoral o están sometidas a estímulos que inducen estrés, pueden aumentar la expresión de moléculas propias que se encuentran expresadas en bajos niveles en condiciones basales y que constituyen ligandos de receptores activadores, lo cual también genera una señal de activación para las células NK. Entre los receptores activadores se destacan la molécula CD16, el receptor NKG2D (CD314), el receptor DNAM-1 (CD226) y los receptores de citotoxicidad natural (NCR, *natural cytotoxicity receptors*) integrados por las moléculas NKp46 (CD335), NKp44 (CD336) y NKp30 (CD337) [66].

El receptor CD16 media la CCDA a través del reconocimiento de la región Fc de los Ac unidos a células blanco. Un número creciente de evidencias indica que la CCDA por parte de células NK contribuye a la respuesta clínica beneficiosa en pacientes oncológicos tratados con anticuerpos monoclonales (AcMo). Un ejemplo es el caso del tratamiento con Rituximab (AcMo anti-CD20) en pacientes con linfoma no Hodgkin, donde se observaron mejores resultados clínicos en aquellos pacientes que presentaron mayor expresión de CD16 y en consecuencia mayor CCDA [67]. Por otra parte, el receptor NKG2D, uno de los más estudiados, reconoce proteínas que no se expresan en células normales sino que son

inducidas por estrés, infecciones o transformación, como MICA, MICB (*MHC class I chain-related protein A y B*, respectivamente) y miembros de la familia de ULBP (*UL16 binding proteins*) en humanos y RAE-1 (*Retinoic acid early-induced protein 1*), H60 y MULT-1 (*Murine ULBP-like transcript*) en ratones. A su vez, DNAM-1 reconoce al receptor del virus de la polio (PVR o CD155) y nectina-2 (CD112) [68]. Se ha demostrado la relevancia de NKG2D y DNAM-1 en la inmunidad antitumoral mediante el empleo de modelos murinos, dado que ratones genéticamente deficientes en NKG2D o en DNAM-1 muestran un aumento en la frecuencia de aparición de tumores y una capacidad reducida para limitar la formación de tumores inducidos por carcinógenos *in vivo* [69–71]. En cuanto a la familia de NCR, NKp30 y NKp46 se expresan tanto en células NK en reposo como activadas, mientras que NKp44 únicamente se expresa en células NK activadas. Se ha demostrado que los niveles de expresión de NCR en células NK se asocian directamente con la magnitud de su actividad citotóxica [72]. Los ligandos de esta familia permanecen menos conocidos, se han identificado ligandos de origen tanto celular como viral y bacteriano [73]. Respecto a los ligandos celulares, se ha demostrado la existencia de ligandos para NKp30, NKp44 y NKp46 en diferentes tumores. Algunos de los ligandos celulares conocidos son B7-H6 y BAT3 para NKp30, PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) y NKp44L para NKp44 y vimentina para NKp46 [74].

Como se mencionó previamente las células NK expresan adicionalmente RRP tales como algunos receptores de tipo Toll (TLR o *Toll like receptors*) en particular TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 y algunos miembros de la familia de receptores de tipo NOD (NLR o *NOD-like receptors*) y RLR (*Retinoic acid-inducible gene (RIG)-1-like receptors*), a través de los cuales reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP) [75]. Los TLR son el grupo más estudiado de los RRP, y se expresan en células NK independientemente de su estado de activación. La mayoría de los estudios indican que las células NK requieren de la presencia simultánea de citoquinas proinflamatorias para responder a los agonistas de TLR. Por ejemplo, el ARN doble cadena (ARNdc) viral que es reconocido por el TLR3 expresado en células NK y CD, induce la liberación de IL-12 por las CD activadas, que a su vez promueve la respuesta de las células NK frente al ARNdc aumentando su capacidad de secreción de citoquinas proinflamatorias y la citotoxicidad contra células blanco y CD inmaduras [76, 77]. Además del receptor de IL-12, las células NK expresan receptores para diversas citoquinas tales como IL-1, IL-10, IL-15, IL-18, IL-21, IFN- $\alpha/\beta$  y factor de crecimiento transformante  $\beta$



(TGF- $\beta$  o *transforming growth factor  $\beta$* ) que juegan un rol crucial en la regulación de sus funciones efectoras. Los IFN de tipo I, IL-12, IL-15 e IL-18 son las principales citoquinas activadoras de las funciones efectoras de las células NK y son primordialmente producidas por los macrófagos y CD, lo que destaca la importancia de la interacción entre células presentadoras de antígenos (CPA) y células NK [53]. Por el contrario, la citoquina inmunosupresora TGF- $\beta$ , antagoniza los efectos estimulatorios de IL-12 e IL-2 en células NK, amortiguando la producción de IFN- $\gamma$  [78]. Particularmente, Ghiringhelli y colaboradores demostraron que los LT regulatorios humanos inhiben las funciones efectoras de las células NK y reducen la expresión del receptor NKG2D acelerando el crecimiento de tumores que normalmente están controlados por células NK a través de la expresión de TGF- $\beta$  unido a membrana [79].

La expresión de los receptores inhibitorios y activadores es diferente según la población de células NK en estudio. Como se mencionó previamente, la población de células NK CD56<sup>dim</sup> se caracteriza por la expresión de altas cantidades de Pfp y granzima, de CD16, de los NCR NKp30 y NKp46 y de receptores KIR. En contraste, las células NK CD56<sup>bright</sup> expresan poca Pfp y granzima, presentan bajos niveles de CD16 y no expresan NCR (excepto bajos niveles de NKp46) ni KIR. Sin embargo, se ha demostrado que tras la estimulación con IL-2, las células NK CD56<sup>bright</sup> de GL y amígdalas regulan positivamente la expresión de NCR, KIR, CD16 y Pfp y adquieren actividad citotóxica por lo que muestran un fenotipo similar a las células NK de sangre periférica CD56<sup>dim</sup>. Estos resultados aportan evidencias en favor de la hipótesis mencionada anteriormente de que los órganos linfoides secundarios constituyen un posible sitio de maduración de las células NK [33]. En cuanto a los receptores de quemoquinas, las células NK CD56<sup>bright</sup> expresan constitutivamente CCR7 (receptor de CCL19 y CCL21), lo que explica su presencia selectiva en órganos linfáticos secundarios y CCR5 (receptor de CCL3, CCL4 y CCL5). Por otra parte, las células NK CD56<sup>dim</sup> presentan niveles elevados de expresión de los receptores CXCR1 y CX3CR1, receptores que permiten su migración a tejidos inflamados en respuesta a CXCL8 o IL-8 y fraktalquina, respectivamente [80]. Asimismo, las células NK CD56<sup>bright</sup> y bajo ciertas condiciones las células NK CD56<sup>dim</sup> expresan CD62L, lo que les confiere capacidad de unirse a las vénulas del endotelio alto de los órganos linfáticos secundarios [81].

La relevancia de las células NK en la inmunidad antitumoral y antiinfecciosa se debe a la secreción de citoquinas proinflamatorias tales como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , el desarrollo de actividad citotóxica contra las células blanco sensibles y la capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa a través de la interacción con otras células del sistema inmune, especialmente macrófagos y células dendríticas (CD). En este sentido, la secreción de IFN- $\gamma$  juega un rol crítico en el perfilado de la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th1 y CD8 citotóxico [82, 83].

La citotoxicidad contra células blanco puede ser llevada a cabo a través de dos mecanismos diferentes: la vía secretoria y la vía de receptores de muerte celular. En la vía secretoria, las células NK establecen una sinapsis inmunológica con la célula blanco y movilizan gránulos citotóxicos preformados hacia el sitio de contacto entre ambas células. Estos gránulos contienen complejos proteicos formados por granzima B (una serinproteasa capaz de activar caspasas), Pfp (una proteína desestabilizante de membranas) y serglycina que actúa como proteína transportadora (o *carrier*). Tras la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos al espacio intercelular (proceso conocido como “degranulación”), estos complejos son endocitados por la célula blanco formándose una vacuola de pH ácido. Allí se induce un cambio conformacional en las Pfp que permite su inserción en la membrana del endosoma y la generación de poros en su membrana. De esta manera la granzima B es conducida al citosol de la célula blanco provocando la activación de una cascada de caspasas que inducirán la degradación del ADN y la muerte por apoptosis [84]. Es importante destacar que los gránulos citotóxicos contienen las proteínas LAMP-1 (*Lysosome-associated membrane protein* o CD107a) y LAMP-2 (CD107b) que se utilizan usualmente como marcadores de degranulación de las células NK. Esto es posible debido a que, aunque en estado de reposo ambas proteínas se hallan recubriendo la superficie interior de los gránulos líticos y no se expresan en la superficie celular, tras la activación contra células blanco, la fusión de los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática y la liberación de su contenido al exterior celular, se induce su movilización hacia la superficie celular de manera transitoria, permitiendo su detección por citometría de flujo (CF) con Ac específicos [85, 86]. La relevancia de esta vía citotóxica ha quedado evidenciada mediante la utilización de ratones deficientes en Pfp, en los cuales se observó una menor actividad citotóxica mediada por células NK y un consecuente aumento en el crecimiento tumoral y número de metástasis

[87]. En el segundo mecanismo de citotoxicidad, la vía de receptores de muerte celular, participan miembros de la familia de TNF, tales como ligandos de Fas (FasL o CD178) y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). Las células NK en reposo almacenan FasL en sus endosomas, pero una vez activadas comienzan a expresarlo en su superficie celular como resultado del proceso de degranulación, lo que les permite unirse a diversas células que expresan su receptor Fas (o CD95). Esta interacción 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 [88]. Además, de forma similar a lo descrito para FasL, las células NK pueden inducir apoptosis a través de TRAIL. La expresión de TRAIL en las células NK es inducible por IFN- $\gamma$ , y mediante experimentos *in vivo* se demostró que su inducción contribuye a la prevención del crecimiento de tumores primarios y la diseminación de metástasis experimentales [89].

Cada vez más pruebas experimentales demuestran que las células cancerosas pueden evadir la inmunidad antitumoral de las células NK a través de la alteración de la expresión de los receptores de membrana en las células NK y sus ligandos. Estas alteraciones pueden ser inducidas por citoquinas, factores de crecimiento, enzimas y metabolitos del microambiente tumoral, así como por la interacción crónica de los receptores de células NK con ligandos expresados por el tumor, favoreciendo que a menudo disminuya la expresión de receptores activadores y prevalezca la de receptores inhibitorios en las células NK infiltrantes de tumores malignos [90]. Una estrategia de evasión que permite el escape del reconocimiento y la muerte mediada por células NK en diferentes neoplasias malignas es el clivaje, por parte de proteasas del tumor, de MICA y MICB de la superficie de las células tumorales. De esta manera, no solo se reduce localmente la inmunogenicidad de las células tumorales al disminuir las densidades de estos ligandos en la superficie celular, sino que también se ha visto afectada la función del receptor NKG2D de las células efectoras citotóxicas. Se ha demostrado que los ligandos solubles, detectables en el suero de los pacientes, se unen al receptor NKG2D provocando su internalización lo que disminuye su expresión en la membrana de las células NK y consecuentemente sus funciones efectoras [91, 92]. Sin embargo, Changchun y colaboradores este año han puesto en discusión este mecanismo, dado que usando un nuevo anticuerpo específico contra NKG2D, demostraron que aunque MICA soluble disminuye la actividad citotóxica de células NK, la expresión de NKG2D por

estas células no se ve afectada y sugieren que la supresión mediada por este ligando soluble sería principalmente debida a su unión a NKG2D y un consiguiente impedimento estérico del reconocimiento de MICA expresado en la superficie de las células tumorales [93]. En este trabajo también demostraron que la expresión de NKG2D disminuyó en respuesta a TGF- $\beta$ , citoquina que anteriormente Castriconi y colegas demostraron que también regula negativamente la expresión del receptor activador NKp30 [94]. Asimismo, se ha observado una expresión disminuida de NKG2D y de NKp30 en pacientes con cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de cuello uterino, entre otros, lo que se asoció con células NK funcionalmente deficientes, especialmente con actividad citotóxica disminuida [95–97]. Los mecanismos de inmunoevasión no sólo se limitan a la alteración de la expresión de los receptores activadores; la regulación positiva de receptores inhibitorios en las células NK también constituye otro mecanismo de evasión tumoral. Se ha reportado que las células NK de carcinoma hepatocelular presentan sobreexpresión de NKG2A, muestran características de agotamiento funcional y se asocian con un mal pronóstico de la enfermedad [98]. A su vez, el bloqueo de la expresión de NKG2A restaura la citotoxicidad de las células NK contra tumores HLA-E<sup>+</sup> *in vivo* [99]. Por lo tanto, las alteraciones en la expresión de los receptores de células NK en pacientes con cáncer podrían representar biomarcadores de la enfermedad que contribuyan a desarrollar y seleccionar opciones terapéuticas novedosas. Una posible forma de combatir la inmunosupresión del tumor es mediante la regulación positiva de receptores activadores o el bloqueo de receptores inhibitorios que potencien la actividad de las células NK en pacientes con cáncer [100]. Por ejemplo, el Lirilumab (IPH2102/BMS-986015), AcMo anti KIR2D, actualmente se encuentra en ensayo clínico, sólo o en combinación con otras drogas, para el tratamiento de varios tipos de tumores sólidos y neoplasias hematológicas [101, 102].

Finalmente, el hecho de que las células NK expresen diversos receptores en su membrana les permite responder a múltiples ligandos, en contraste con los LT que expresan un único tipo de receptor antigénico (TCR o receptor de célula T -*T cell receptor*-) que les otorga la capacidad de responder a un solo antígeno. En consecuencia, un número sustancial de células NK puede responder frente a una cierta amenaza específica. Otra diferencia importante con la respuesta mediada por los LT es que, como se mencionó previamente, las células NK son independientes de la presentación del antígeno por lo que su respuesta es

más rápida. Además, la expresión constitutiva de receptores de citoquinas permite que muchas células NK sean estimuladas por citoquinas proinflamatorias producidas durante la etapa temprana del curso de una respuesta inmune. En conjunto, la intensidad y calidad de la respuesta citotóxica y de secreción de citoquinas por parte de las células NK dependerá del microambiente de citoquinas presentes durante su activación y del contacto con otras células del sistema inmune, tales como células T, CD, macrófagos y células del estroma tisular.

## 2. Macrófagos

### 2.1. Generalidades

Los macrófagos son un grupo de células inmunes de linaje mieloide sumamente diverso que se encuentra ampliamente distribuido en todos los tejidos del cuerpo mostrando una gran diversidad funcional. Estas células tienen vida media larga y actúan como centinelas inmunes contribuyendo al desarrollo de procesos inflamatorios, así como a la homeostasis y la reparación de los tejidos. Son componentes integrales de los tejidos donde se especializan en respuesta a las señales ambientales locales. Dicha especialización tisular se refleja en perfiles discretos de expresión génica, firmas epigenéticas y capacidades funcionales propias de cada tejido [103]. De esta manera, los macrófagos contribuyen al desarrollo y función específica del tejido huésped y son capaces de adquirir nuevos estados “metaestables” en respuesta a cambios en la fisiología del tejido o a nuevos desafíos ambientales [104].

Tradicionalmente se pensaba que los macrófagos se originaban exclusivamente de la diferenciación de monocitos derivados de médula ósea luego de su reclutamiento a los tejidos. Sin embargo, más recientemente mediante experimentos de rastreo del linaje se ha descrito que la mayoría de los macrófagos residentes de tejidos se establecen tempranamente durante el desarrollo embrionario a partir de precursores derivados del saco vitelino o del hígado fetal (primer y segundo sitio de hematopoyesis en mamíferos,

respectivamente) sin la necesidad de un intermediario monocítico. Este es el caso de los macrófagos de cerebro, epidermis y pulmón [105, 106], cuyo mantenimiento durante la edad adulta depende de la auto-renovación en respuesta a factores que estimulan su proliferación local y que dependen de cada tejido en particular. No obstante, en ciertos tejidos como el intestino [107] y el riñón [108], aunque los macrófagos se establecen a partir de precursores embrionarios, su mantenimiento durante la edad adulta depende exclusivamente de la migración de monocitos circulantes provenientes de médula ósea (fuente de hematopoyesis definitiva que se establece más tarde durante el desarrollo) [109, 110]. Estos datos indican que hay al menos tres linajes de macrófagos que surgen en diferentes etapas de desarrollo y persisten hasta la edad adulta: los macrófagos del saco vitelino, los macrófagos del hígado fetal y los macrófagos de médula ósea [111].

Independientemente de su origen, estudios genéticos y de cultivo celular indican que el principal regulador de la supervivencia y proliferación de casi todos los macrófagos es el receptor M-CSFR (*macrophage colony-stimulating factor receptor* o receptor del factor estimulante de colonias de macrófagos, también conocido como CSF1R o CD115), dado que ratones genéticamente deficientes en dicho receptor exhiben una depleción grave de macrófagos en varios tejidos, como médula ósea, hígado, riñón, cavidades pleural y peritoneal, timo, dermis, testículos y ovarios. Sin embargo, la depleción de macrófagos es en general menos severa en ratones deficientes en su ligando M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor* o factor estimulante de colonias de macrófagos, también conocido como CSF1), ya que la IL-34 constituye un ligando alternativo para el M-CSFR [112, 113].

Los macrófagos están involucrados en la eliminación inmunológicamente silenciosa de células apoptóticas y desechos celulares que se generan durante la remodelación del tejido huésped. Este proceso es dependiente del reconocimiento de ligandos presentes en la superficie de las células apoptóticas a través de una amplia gama de receptores expresados en los macrófagos, como el receptor de fosfatidilserina [114], receptores de tipo *scavenger* (por ejemplo, CD36) [115], integrinas (por ejemplo,  $\alpha_v\beta_3$ ) [116], receptores para el complemento (por ejemplo, CD91/calreticulina) [117] y para componentes microbianos (por ejemplo, CD14) [118], entre otros. El microambiente del tejido durante la remodelación es el que asegura el mantenimiento de la homeostasis programando a los macrófagos residentes

para la eliminación de células apoptóticas sin iniciar un proceso inflamatorio en tejidos sanos. Se ha descrito que los factores de transcripción KLF2 y KLF4 controlan la expresión coordinada de los receptores de reconocimiento de células apoptóticas en conjunto con genes que limitan las respuestas a través de TLR [119]. A su vez, otros trabajos demostraron que la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos (en contraste con las células apoptóticas opsonizadas con inmunoglobulina G) desencadena activamente señales antiinflamatorias como la secreción de TGF- $\beta$ , prostaglandina E2 (PGE2) y factor de activación de plaquetas (PAF o *Platelet-activating factor*) [120]. En contraste, la eliminación de células necróticas producidas durante una infección, estrés u otros medios, altera notablemente la fisiología de los macrófagos. Durante este proceso se liberan señales de peligro endógenas (también conocidas como patrones moleculares asociados a daño o PMAD), como proteínas de choque térmico (HSP90) [121], proteínas nucleares (HMGB1) [122], ADN genómico [123] y nucleótidos [124], entre otras, que son reconocidos por los TLR produciendo citoquinas y mediadores proinflamatorios [125].

Por otro lado, los macrófagos son contribuyentes clave en la eliminación de microorganismos invasores, incluyendo bacterias, virus, hongos y parásitos cuyo reconocimiento es mediado por diferentes familias de RRP, como algunos TLR y de receptores de opsoninas (como CD16 y receptores para componentes del complemento) [126]. El reconocimiento del patógeno conduce a su fagocitosis e internalización dentro de un fagosoma que contiene cientos de proteínas que proporcionan la maquinaria molecular que promoverá la muerte del microorganismo internalizado. Sin embargo, es necesaria la maduración del fagosoma través de una serie de eventos que involucran su acidificación progresiva, la fusión con endosomas y lisosomas y el ensamblaje (activación) de la NADPH-oxidasa con la producción concomitante de intermediarios reactivos de oxígeno (ROS) [127, 128]. Estudios recientes han sugerido que la activación de los macrófagos a través de ciertos TLR (TLR1, TLR2 y TLR4) resulta en el reclutamiento de mitocondrias a los fagosomas, por lo que en estos casos los ROS mitocondriales también contribuyen a la actividad bactericida de los macrófagos [129].

La activación del macrófago también tiene como consecuencia la secreción de una gran cantidad de quemoquinas y citoquinas, entre las cuales se pueden destacar TNF- $\alpha$ , IL-1,

IL-6, IL-8 e IL-12 que en conjunto pueden inducir un aumento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de otras células al sitio de la inflamación. Además de los efectos locales, estos mediadores también producen efectos sistémicos como la fiebre y la producción de proteínas de fase inflamatoria aguda en el hígado, que potencian el proceso inflamatorio contribuyendo a la erradicación del patógeno. Como resultado, los macrófagos pueden crear y modular la respuesta inmunitaria adaptativa. La secreción de los diferentes factores depende del tipo de estímulo y del estado de activación inicial del macrófago, condicionado previamente por su localización [130, 131].

## 2.2. Plasticidad

Los macrófagos son células con notable plasticidad que pueden cambiar de un fenotipo a otro en respuesta a la integración de múltiples señales ambientales. El estado de polarización de los macrófagos se refiere al estado de activación en determinado tiempo y espacio que determina su fenotipo y función. Inicialmente se ha propuesto una clasificación binaria de polarización que surgió como reflejo de las categorías de respuestas inmunes adaptativas de células Th1 y Th2, acuñando los términos macrófagos M1 como macrófagos activados por “la vía clásica” y macrófagos M2 como macrófagos activados por “la vía alternativa”. Sin embargo, sabemos actualmente que estas células (M1 y M2) representan los extremos opuestos de un continuo de estados de activación [132].

Los macrófagos M1 constituyen la población con mayor capacidad microbicida y tumoricida, capaz de montar respuestas proinflamatorias. Pueden inducirse *in vitro* en respuesta a IFN- $\gamma$  que al unirse a su receptor desencadena la fosforilación de STAT1, promoviendo la transcripción de genes asociados a la inflamación, como IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6 [133]. *In vivo*, las células NK son una fuente temprana importante de IFN- $\gamma$  en respuesta al estrés y a infecciones lo que polariza a los macrófagos hacia el estado proinflamatorio. La producción de esta citoquina por las células NK es generalmente transitoria pero la posterior producción sostenida por las células Th1 y T CD8 mantiene los macrófagos activados. Esta respuesta se asocia con una mayor capacidad de los macrófagos para eliminar patógenos intracelulares y el desarrollo de inmunidad celular de larga duración [134]. A su vez, el



lipopolisacárido (LPS), componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, es detectado por el receptor TLR4 expresado en la superficie de los macrófagos, lo que promueve su activación hacia el perfil M1. Se ha reportado que el pretratamiento de los macrófagos humanos o murinos con IFN- $\gamma$  mejora su velocidad y capacidad de respuesta al LPS, por lo que la combinación de ambos estímulos sería la más eficiente para obtener macrófagos M1 *in vitro* [135]. En términos moleculares simplificados, el LPS estimula una cascada de eventos de señalización intracelular mediada por el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) que promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  y de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS o *Inducible nitric oxide synthase*) [136, 137]. Esta enzima es responsable de catalizar la conversión de L-arginina a citrulina y óxido nítrico (NO), que es un importante agente citotóxico proinflamatorio capaz de proteger al huésped de varios patógenos, inactivando y destruyendo agentes infecciosos [138]. Por ejemplo, la inducción de la producción de NO en macrófagos murinos activados con IFN- $\gamma$  y LPS conduce a la muerte e inhibición del crecimiento de *M. tuberculosis* [139].

Además, los macrófagos M1 secretan citoquinas que perfilan respuestas de tipo Th1 y Th17, como IL-12, IL-23 e IL-27 y quemoquinas que reclutan células NK y Th1 al foco de la inflamación, como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 [140]. Otros biomarcadores característicos de macrófagos M1 incluyen la alta expresión de moléculas de CMH-II en conjunto con las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, por lo que representan el perfil de macrófagos más eficiente en promover la inmunidad adaptativa mediante la presentación de antígenos a los LT [141].

Para contrarrestar el potencial dañino de una inflamación exacerbada, los macrófagos se someten a apoptosis o se desencadenan mecanismos reguladores impulsados por la función antiinflamatoria de los macrófagos M2. Es importante destacar, que muchas veces se usa genéricamente el término “M2” para agrupar a todas las poblaciones de macrófagos activados por otra vía que no sea la “clásica” o “M1” y en base a propiedades funcionales generales. Todos son capaces de amortiguar la respuesta proinflamatoria debido a que producen cantidades mínimas de citoquinas proinflamatorias (como IL-12) y de radicales tóxicos del oxígeno y nitrógeno, son menos eficientes que los M1 para presentar antígenos a los LT y para eliminar patógenos intracelulares, mientras que participan en respuestas de

tipo II y secretan citoquinas antiinflamatorias. A su vez, estos macrófagos M2 liberan quemoquinas atrayentes de basófilos y eosinófilos, como CCL17, CCL18, CCL22 y CCL24 [142]. Sin embargo, dado que existen grandes diferencias en la bioquímica y fisiología de cada población de macrófagos M2 dependiendo de su estímulo activador, con el objetivo de ahondar en su estudio se ha propuesto la subdivisión en diferentes subconjuntos tales como M2a, M2b y M2c [140].

El subconjunto de macrófagos M2a puede inducirse *in vitro* en respuesta a IL-4 o IL-13 que señalizan a través de una cadena común del receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) activando al factor de transcripción STAT6 [143]. *In vivo*, tanto en ratones como en humanos, los basófilos [144, 145] y mastocitos [146, 147] son fuentes tempranas importantes de IL-4 durante infecciones parasitarias y procesos alérgicos, respectivamente. Se ha demostrado que ratones con macrófagos deficientes específicamente en IL-4R $\alpha$  fueron extremadamente susceptibles a la infección por el parásito *Schistosoma mansoni* y presentaron un aumento de las citoquinas Th1 y de la actividad de iNOS, lo que provocó un 100% de mortalidad durante la infección aguda [148]. Asimismo, de forma análoga a lo descrito para la activación clásica, se ha demostrado que las células Th2 son necesarias para el mantenimiento de la activación de los macrófagos M2a y el desarrollo de la respuesta de larga duración frente a parásitos metazoos [44].

Los macrófagos M2a están involucrados en la reparación de tejidos y la cicatrización de heridas. Tienen una potente capacidad de fagocitosis de desechos y células apoptóticas [149], poseen propiedades proangiogénicas [150] y secretan componentes de la matriz extracelular, procesos claves en la reacción fibrótica [151]. Se ha reportado que la actividad de la enzima Arginasa-1 (Arg1) en los macrófagos, promovida por las citoquinas de tipo Th2 IL-4 e IL-13, está relacionada con el crecimiento celular y la producción de tejido conectivo. Esto se debe a que la Arg1 hidroliza la L-arginina en Ornitina, metabolito necesario para la producción de poliaminas y prolina, que controlan la proliferación celular y la producción de colágeno, respectivamente [152]. Dado que esta enzima compite por el sustrato con la iNOS, la producción de NO en macrófagos M2 se ve reducida y por lo tanto, los intermediarios del metabolismo de la L-Arginina suelen utilizarse como biomarcadores de macrófagos M1/M2. A su vez, existe evidencia experimental en modelos *in vivo* que demuestran que en ratones

con isquemia cerebral, la IL-4 contribuyó a la reparación del tejido cerebral y mejoró los resultados neurológicos a largo plazo mediante la inducción del fenotipo M2 de la microglía [153].

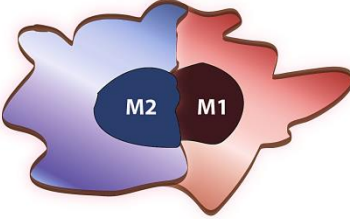
El receptor de manosa (MR, Mrc1 o CD206), un importante receptor fagocítico que media la unión e ingestión de microorganismos y glicoproteínas solubles que contienen residuos de manosa en su superficie, constituye un buen biomarcador de macrófagos M2a. Se ha demostrado que la IL-4 potencia la expresión de dicho receptor en la superficie de los macrófagos [154], mientras que inhibe la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias como IL-12 y TNF- $\alpha$  [155]. Asimismo, se ha observado una mayor expresión de MARCO (receptor de macrófagos con estructura de colágeno), perteneciente a la familia de receptores de tipo *scavenger*, en macrófagos murinos derivados de médula ósea y polarizados *in vitro* en presencia de IL-4 e IL-13, IL-10 o TGF- $\beta$  [156].

La segunda subpoblación de macrófagos, los macrófagos M2b, ha sido identificada después de la estimulación *in vitro* con un agonista de TLR en presencia de complejos inmunes que contienen IgG, aunque también pueden inducirse en presencia de ligandos del receptor de IL-1, como IL-1 $\beta$  [157]. Estudios realizados con células murinas y humanas han demostrado que a diferencia de las células M2a, los macrófagos M2b no inducen la actividad de la enzima Arg1 y se caracterizan por una alta producción de citoquinas proinflamatorias (como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) en conjunto con grandes cantidades de IL-10. A pesar de su producción de citoquinas inflamatorias y moléculas tóxicas, se ha demostrado que las células M2b protegen a los ratones contra respuestas inflamatorias agudas generadas por el LPS, promueven la diferenciación de células Th2 y la producción de Ac [158–160].

Finalmente, el subconjunto M2c es inducido por IL-10, que activa la vía de STAT3 e inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12 y disminuye la presentación de antígenos mediante regulación negativa de la expresión de las moléculas de CMH-II y moléculas co-estimuladoras [161]. *In vivo*, la IL-10 es producida por macrófagos, células T, CD mieloides, células B y mastocitos como parte de la respuesta homeostática a la infección y la inflamación, jugando un papel crítico en limitar la duración e intensidad de reacciones inflamatorias. [162–164]. Esta población de macrófagos exhibe una fuerte actividad antiinflamatoria mediante la liberación de altas cantidades de IL-10 [165] y expresa

el receptor de la tirosina quinasa Mer (MERTK), esencial para promover su función fagocítica de células apoptóticas [166].

Consecuentemente, a la hora de caracterizar el perfil de los macrófagos, la dicotomía M1-M2 constituye una simplificación operativamente útil que proporciona información sobre los mecanismos fisiológicos y patológicos de los dos estados extremos y opuestos de polarización. Sin embargo, sigue siendo un desafío caracterizar a los macrófagos en un sistema *in vivo*, donde los macrófagos están expuestos a un microambiente mucho más diverso de estímulos siendo capaces de desarrollar un número infinito de potenciales fenotipos y funciones. La mayor dificultad actual es que no existe un único marcador bioquímico que defina un sublinaje o estado de activación de los macrófagos, sino que los mismos son capaces de conservar su plasticidad reconfigurando dinámicamente el estado de la cromatina y los programas transcripcionales en respuesta a cambios de las señales ambientales [167]. En este sentido, se propone que la mejor caracterización de los macrófagos incluye el análisis simultáneo de un conjunto de biomarcadores, que pueden incluir marcadores de superficie, cascadas de señalización, vías metabólicas, factores de transcripción, así como el análisis de la actividad funcional y la secreción de quemoquinas y citoquinas con el fin de lograr un acercamiento a la forma más confiable para definir cada subpoblación. Los marcadores característicos propuestos en la actualidad para definir a cada población se resumen en la **Figura 2** [168, 169].



		M(IL-4)	M(IC)	M(IL-10)	M(LPS)	M(LPS+IFN- $\gamma$ )
Factores de transcripción	Humano				pSTAT1	pSTAT1
	Ratón	pSTAT6	pSTAT3		pSTAT1	pSTAT1
Receptores de membrana	Humano	CD206, CD163		MARCO	CD40, CD274, CD80, CD86, MHCII	
	Ratón	MARCO, CD206		MARCO	CD274, MHCII	
Citoquinas	Humano	TGF- $\beta$		TNF- $\alpha$ , IL-6, TGF- $\beta$	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27
	Ratón	IL-10		IL-10	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-27	TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27
Quemoquinas	Humano	CCL4, CCL13, CCL17, CCL18			CXCL10, IL-8	
	Ratón	CCL17, CCL22, CCL24	CCL1, CCL20		CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL-8	
Metabolismo de aminoácidos	Humano				IDO1	
	Ratón	Arg1	NOS2		NOS2	NOS2

**Figura 2. Principales marcadores que definen los perfiles de macrófagos activados.** Se describen los principales sistemas de marcadores utilizados para definir macrófagos humanos y murinos según el estímulo de activación. Los datos de marcadores se obtuvieron de una amplia gama de datos publicados y representan un consenso inicial [140, 168, 169].

Asimismo, aunque funcionalmente son muy similares, es necesario tener en cuenta que los marcadores fenotípicos de las poblaciones de macrófagos en ratones y en humanos no son los mismos en todos los casos. Mientras que la sobreexpresión de CD206 y la alta actividad endocítica es una característica conservada en los diferentes tipos de macrófagos M2 tanto murinos como humanos [154, 170], algunos genes que son marcadores característicos de macrófagos de ratón tratados con IL-4 como las quitinasas Ym1 e Ym2 y la molécula  $\alpha$  similar a resistina (Relm $\alpha$ , también conocida como Fizz1) carecen de homólogos en humanos [171, 172]. Otro punto a tener en cuenta a la hora de realizar la caracterización de los macrófagos M2, es que la producción de citoquinas y quemoquinas dependerá fuertemente del estímulo de polarización inicial [173]. Discrepancias similares se observaron al analizar la expresión de MARCO, dado que mientras que macrófagos M0 murinos

aumentaron su expresión, en conjunto con la de otros marcadores de M2, en respuesta a IL-4 e IL-13 o en respuesta a IL-10 o TGF- $\beta$  [156]; en cambio, en células humanas MARCO se reguló positivamente en respuesta a glucocorticoides como único estímulo y su expresión fue suprimida por IL-4. Sin embargo, en este trabajo también se demostró que la expresión de CD206 y CD163 fue regulada sinérgicamente por ambos agentes [174].

En resumen, tanto las señales innatas como las adaptativas pueden influir en la fisiología de los macrófagos, y estas alteraciones permiten que los macrófagos participen en procesos homeostáticos, como la remodelación de tejidos y la cicatrización de heridas, así como en la defensa del huésped. Sin embargo, un desequilibrio de los fenotipos de macrófagos M1/M2 puede tener consecuencias potencialmente peligrosas. Por ejemplo, aunque los macrófagos M1 son componentes vitales en la defensa del huésped, su activación debe controlarse estrictamente dado que las citoquinas y los mediadores que producen pueden provocar daño tisular y respuesta inflamatoria crónica. Por ejemplo, las citoquinas IL-1, IL-6 e IL-23 secretadas por macrófagos M1 se han asociado con el desarrollo y la expansión de las células Th17 que producen IL-17 [175, 176]. A su vez, se ha demostrado que esta citoquina promueve el reclutamiento de altos niveles de monocitos y neutrófilos en el tejido, contribuyendo al desarrollo de patologías inflamatorias autoinmunes, como la artritis reumatoide [177]. Además, los macrófagos M1 se consideran la principal fuente de citoquinas proinflamatorias en el tejido adiposo y se cree que esta inflamación es un factor causal para el desarrollo de la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo 2 [178]. Se ha demostrado que las citoquinas proinflamatorias derivadas de los macrófagos M1 inhiben la acción de la insulina a través de la activación I $\kappa$ B (IKK) y JNK, quinasas que forman parte del mecanismo de control de retroalimentación negativa que en condiciones fisiológicas es inducido por la insulina y que termina su acción en los adipocitos [179]. Concordantemente, ratones depletados de macrófagos en el tejido adiposo [180] o con macrófagos deficientes en JNK [181] no mostraron resistencia a la insulina inducida por obesidad. En este último trabajo se mostró además que este efecto se asoció a una infiltración reducida de macrófagos en los islotes pancreáticos y un bloqueo de su polarización hacia el fenotipo M1. Por otro lado, de manera similar a la actividad desregulada de los macrófagos activados clásicamente en la autoinmunidad, los macrófagos que curan heridas (o macrófagos M2a) también pueden ser perjudiciales para el huésped cuando su actividad potenciadora de la

matriz está desregulada. Este es el caso de la fibrosis tisular que ocurre durante la esquistosomiasis crónica, donde la actividad de la Arg1 de los macrófagos favorece la acumulación de macrófagos que curan heridas y la fibrosis, mientras que ratones con macrófagos deficientes en el receptor de IL-4 (IL-4R) no logran inducir la patología [152]. Además, se ha reportado que esta población de macrófagos también es capaz de exacerbar las respuestas alérgicas [182], ser explotados por patógenos para la supervivencia intracelular [183] y contribuir a la progresión de la neoplasia (detallado en sección "Escape tumoral mediado por TAM").

Finalmente, la exposición de los macrófagos M2 a las señales proinflamatorias inductoras de M1 o viceversa, pueden inducir la "repolarización" o la "reprogramación" de los macrófagos diferenciados, lo cual constituye una evidencia directa de su alta plasticidad funcional y de que el eje M1/M2 puede manipularse según el objetivo terapéutico [184].

### 2.3. Diálogo recíproco con células NK

Durante la fisiología de la respuesta inmune normal se establece una interacción entre monocitos/macrófagos con células NK, la cual resulta de gran trascendencia para la inmunidad contra patógenos [185]. Aunque las células NK responden espontáneamente contra células blanco, se ha demostrado que, tanto en modelos humanos como murinos, su capacidad efectora está regulada fuertemente por los macrófagos.

Un cocultivo simple de macrófagos humanos activados con LPS y células NK autólogas estimula la proliferación, la secreción de IFN- $\gamma$  y la citotoxicidad de las células NK contra las células blanco K562. En este contexto, el reconocimiento de CD48 expresado en los macrófagos por parte del receptor 2B4 expresado en las células NK es crítico para desencadenar la proliferación y la secreción de IFN- $\gamma$ , demostrando que los macrófagos pueden activar las células NK *in vitro* de manera dependiente del contacto celular. A su vez, la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK puede conducir a la activación clásica M1 conformando un circuito de activación recíproco [186–189]. Por otro lado, la infección de macrófagos humanos autólogos con *Salmonella* (patógeno intracelular) conduce a la secreción de IFN- $\gamma$  y la degranulación de células NK, a través de un mecanismo dependiente del contacto entre

ambas células, y esa activación recíprocamente conduce a una reducción dramática en el número de bacterias vivas en los macrófagos [190]. Asimismo, la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK en respuesta a los eritrocitos infectados con *Plasmodium falciparum*, agente causante de la malaria humana, depende del contacto con macrófagos, siendo la producción de IL-18 por parte de los macrófagos y la expresión de su receptor (IL-18R) en células NK componentes esenciales de esta vía [191]. Más aún, se observó que macrófagos infectados con el virus de la influenza A o el virus Sendai indujeron la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK a través de un mecanismo dependiente del contacto celular y aumentaron la síntesis de ARNm de IL-12, IL-18 y T-bet en respuesta a IFN- $\alpha$  [192]. Además, se ha demostrado una diferencia importante entre la capacidad de estimular la producción de IFN- $\gamma$  de macrófagos M1 y M2 infectados con CMV, dado que solo los macrófagos M1 infectados produjeron IL-12 que activa efectivamente la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK, y dicho efecto fue inhibido parcialmente por un AcMo anti-IL-12 [193].

En este sentido, aunque las células NK y los macrófagos son pilares de la inmunidad innata, hay poca información disponible sobre su interacción. Se conocen las consecuencias y los mecanismos celulares involucrados en la interacción entre macrófagos activados en respuesta a la infección con bacterias, virus o parásitos y células NK, mientras que la interacción con macrófagos M2 y TAM permanece menos estudiada. Consecuentemente, el presente trabajo de Tesis de Doctorado fue diseñado con el fin de investigar los efectos de ambas poblaciones mieloides sobre las células NK y las vías moleculares involucradas, dado que constituyen poblaciones celulares que juegan un papel crítico en la homeostasis de la respuesta inmune y como se detallará más adelante, en el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis (ver sección “Escape tumoral mediado por TAM”).

### **3. Inmunología antitumoral**

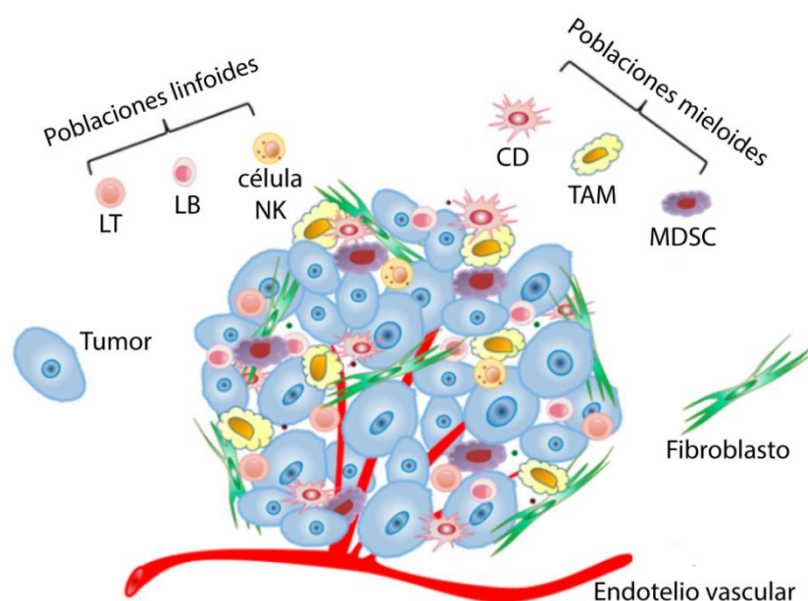
#### **3.1. Teoría de la inmunoección o de las tres “E”**

Según la Organización Mundial de la Salud, el cáncer es la segunda causa principal de muerte a nivel mundial y se estima que 9,6 millones de muertes en 2018 se debieron al



cáncer (<https://www.who.int/>). Cáncer es un término genérico para un conjunto de más de 200 tipos de tumores diferentes que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. A su vez, cada uno de ellos posee gran heterogeneidad de acuerdo al origen, estadio de diagnóstico, tratamiento, etc. Sin embargo, la característica común a todos es que se generan en respuesta a algún tipo de desregulación del ciclo celular que favorece el crecimiento descontrolado de células anormales [194]. Estas células luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo extendiéndose a otros órganos, proceso conocido como metástasis y es la causa más importante de muerte por cáncer [195].

En la última década se ha dado particular importancia a que el potencial maligno de un tumor sólido no es solo el resultado de la transformación celular, sino también el resultado de la interacción compleja de las células cancerosas con el estroma circundante, compuesto por fibroblastos, células endoteliales y células inmunes, dado que estas células pueden adquirir características diferentes a las que están presentes en el estroma normal contribuyendo a la progresión de la enfermedad (**Figura 3**) [196, 197].



**Figura 3. Principales células que conforman el microambiente tumoral.** Además de células tumorales, los tumores están conformados por el compartimento de células inmunes, tales como LT, LB, células NK, CD, TAM y células mieloides supresoras (o MDSC) y el compartimento del estroma no leucocitario, formado por fibroblastos asociados al cáncer y células endoteliales de la vasculatura linfática y sanguínea. La figura fue levemente modificada de [197].

Durante la tumorigénesis, las células neotransformadas y del estroma circundante pueden producir señales inflamatorias y expresar moléculas que inducen el reclutamiento y activación de diversas células inmunes, como macrófagos, CD, células NK y LT. En esta etapa los macrófagos poseen gran capacidad fagocítica y pueden contribuir a la eliminación del incipiente tumor por mecanismos que involucran especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno [198, 199]. Por otro lado, las células NK reconocen distintas moléculas expresadas por las células neotransformadas y producen diversos mediadores solubles, entre los que se destaca el IFN- $\gamma$ , que induce la producción de quemoquinas como CXCL9, CXCL10 y CXCL11 por parte de las células mieloides y estromales locales, las que promueven el reclutamiento de más células del sistema inmune [200]. Asimismo, los restos generados a partir de la muerte de células tumorales pueden ser fagocitados por las CD residentes que así reciben señales de activación en el microambiente tumoral, inician su maduración y migran al GL donde presentarán los antígenos derivados de los tumores a LT *naive*, dando comienzo a la respuesta inmune adaptativa antitumoral [201]. Aquellos LT que reconozcan esos antígenos se activarán y, según la presencia de distintos factores solubles en el entorno, los LT CD4 se polarizarán dando origen a distintos tipos de perfiles efectores de la respuesta inmune adaptativa. Así, la interleuquina IL-12 secretada por las CD maduras contribuye a la polarización de los LT CD4 hacia un perfil Th1, que secretarán IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que a su vez facilitarán la activación de los LT CD8 [202, 203]. Estos LT CD8 migrarán al foco tumoral donde destruirán a las células tumorales que expresan el antígeno tumoral reconocido por su TCR y secretarán IFN- $\gamma$  (junto con las células NK y los LT CD4 de perfil Th1), lo que contribuye a la eliminación de las células tumorales [204, 205]. Este proceso en el cual las células tumorales son susceptibles al reconocimiento y eliminación por el sistema inmune, es conocido como inmunovigilancia.

Sin embargo, el crecimiento de tumores en pacientes inmunocompetentes demuestra que muchas veces este proceso no es tan efectivo *in vivo* y evidencia la existencia de mecanismos tumorales de evasión de la respuesta inmune. Esto se debe a que el sistema inmune desempeña un doble papel en el cáncer: mientras que durante el proceso de inmunovigilancia suprime el crecimiento tumoral al destruir las células cancerosas e inhibe su crecimiento, también genera una presión evolutiva sobre las células tumorales que termina seleccionando aquellas células que presentan ventajas adaptativas para sobrevivir

en el huésped inmunocompetente. En base a la acción protectora del sistema inmune sobre el hospedador pero al mismo tiempo a su acción modeladora sobre el tumor, R. Schreiber postuló la teoría de la inmunoedición del cáncer. De acuerdo con esta teoría, el proceso de inmunoedición del cáncer consta de tres etapas: eliminación, equilibrio y escape, que se han denominado las "tres E de la inmunoedición del cáncer" [206].

La fase de eliminación corresponde al concepto original y previamente descrito de inmunovigilancia del cáncer, por el cual las células cancerosas son reconocidas y eliminadas existosamente por el sistema inmune, previniendo el desarrollo del tumor maligno y la progresión a las fases siguientes. A pesar de que este proceso nunca ha sido visualizado *in vivo*, existen numerosas evidencias clínicas que indican que la formación de tumores está restringida por la acción conjunta de componentes tanto celulares como humorales de la respuesta inmune innata y adaptativa. Por ejemplo, se observó un aumento en la incidencia de tumores en pacientes trasplantados inmunosuprimidos [207] y en pacientes con inmunodeficiencias primarias [208]. Asimismo, pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana presentan alta incidencia de sarcoma de Kaposi, linfoma no Hodgkin y cáncer cervical [209].

Sin embargo, si el sistema inmune eventualmente no puede eliminar la totalidad de las células tumorales, éstas pueden perdurar en estado latente durante períodos prolongados de tiempo, iniciándose la fase de "equilibrio". Durante esta etapa, la proliferación sostenida de las células tumorales se mantiene en equilibrio dinámico con la actividad citotóxica del sistema inmune. Evidencias robustas de la existencia de esta fase provienen de experimentos que muestran que mientras que ratones inmunocompetentes tratados con un carcinógeno en dosis bajas albergaron células cancerosas ocultas durante un período de tiempo prolongado, la depleción de las células T mediante la administración de AcMo indujo la rápida aparición de los tumores en el sitio de inyección original del carcinógeno. De esta manera quedó establecido el papel crítico de la inmunidad adaptativa en el mantenimiento en estado de latencia del tumor [210]. Un estudio posterior realizado en un modelo murino similar demostró que la latencia tumoral mediada por el sistema inmune depende del equilibrio entre las citoquinas IL-12 e IL-23 [211]. La interacción constante del sistema inmune con los tumores y el consecuente proceso de inmunoedición

resulta en la selección de tumores que han sido moldeados hacia un estado menos inmunogénico, proceso que quedó evidenciado cuando Schreiber y colaboradores demostraron que los tumores derivados de ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicos que los tumores similares derivados de ratones inmunocompetentes [212]. De esta manera, los tumores que terminan siendo menos susceptibles al ataque inmunitario progresan hacia la tercera fase denominada "escape".

En la fase de "escape", el sistema inmune es finalmente "dominado" por el tumor dado que los clones tumorales seleccionados evaden la respuesta del sistema inmune y pueden proliferar sin las restricciones de las primeras etapas, comenzando los signos clínicos de la enfermedad. El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de varios mecanismos que incluyen un reconocimiento inmunitario reducido (a través de la regulación negativa o la pérdida de antígenos tumorales o de moléculas co-estimuladoras), el aumento de la expresión de genes de factores de crecimiento o de supervivencia (por ejemplo, Bcl-2), o incluso la colaboración por parte de células inmunes, que aunque en las etapas previas promovían la erradicación de las células tumorales, en esta etapa pueden adquirir propiedades regulatorias que crean un microambiente inmunosupresor y favorecen la progresión tumoral a través de la producción de citoquinas como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF o *vascular endothelial growth factor*) y TGF- $\beta$ ; la inducción y/o el reclutamiento de LT regulatorios y MDSC y la inducción de moléculas inmunorreguladoras como PD-1/PD-L1, CTLA-4, Tim-3 y otras [213–216]. Dado que la mayoría de los tumores que se detectan en la clínica se encuentran fuertemente inmunoeditados y en la fase de escape, en la actualidad hay grandes esfuerzos orientados a profundizar el estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune antitumoral con el objetivo de desarrollar nuevas inmunoterapias y encontrar nuevos biomarcadores con utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

### **3.2. Escape tumoral mediado por TAM**

Recientemente, el estudio de los TAM ha ganado un gran interés en el campo de la terapia contra el cáncer, dado que estas células constituyen la población más abundante de

los leucocitos infiltrantes en tumores sólidos y se ha reportado que un elevado número de TAM con fenotipo similar a M2 en el infiltrado tumoral de ciertos tumores, tales como linfoma de Hodking clásico pediátrico [217] y adulto [218], glioma [219], cáncer de mama [220], melanoma [221], cáncer renal de células claras [222], cáncer de útero [223], entre otros, correlaciona directamente con un peor pronóstico de la enfermedad.

El papel de los macrófagos en la respuesta antitumoral ha sido controvertido, existen evidencias que demuestran que los mecanismos de vigilancia de los macrófagos son esenciales para prevenir el crecimiento de células transformadas, dado que macrófagos activados clásicamente son citotóxicos para las células tumorales *in vitro* pero no para las células normales [224, 225]. Sin embargo, también existen numerosos trabajos en los cuales se demuestra que la depleción de los macrófagos resulta beneficiosa para el huésped [226–229], demostrando que en estos casos los TAM son impulsores cruciales de la progresión del tumor. Por lo tanto, los macrófagos exhiben una gran heterogeneidad fenotípica y funcional, cumpliendo roles contrastantes en la progresión tumoral de acuerdo a la influencia del microambiente local del tumor [230]. Aunque existe controversia sobre el papel de los macrófagos en las primeras etapas del cáncer, parece haber un acuerdo general de que a medida que los tumores crecen, el microambiente tumoral influye notablemente en la fisiología y fenotipo de los TAM promoviendo la adquisición de propiedades similares a los macrófagos M2 [231]. Algunos de los agentes derivados de tumores que inducen el desarrollo de estos macrófagos incluyen IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 1, PGE2 y M-CSF que pueden funcionar sinérgicamente dentro del microambiente tumoral [232–235].

Independientemente del estímulo que promueva la polarización hacia el estado antiinflamatorio, estos TAM pueden regular directa- o indirectamente varios aspectos de la inmunidad tumoral. Por ejemplo, la propagación y el crecimiento de las células tumorales depende de la formación de nuevos vasos sanguíneos y, por lo tanto, de la angiogénesis. Los TAM pueden promover este proceso mediante la liberación de factores de crecimiento, entre los que se encuentran TGF- $\beta$ , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF o *Platelet derived growth factor*), VEGF y TNF- $\alpha$  [236, 237]. Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la magnitud de la vascularización tumoral y la cantidad de TAM en tumores de mama humanos [220]. A su vez, se ha observado que los TAM estimularon

directamente la angiogénesis en un modelo murino de tumor mamario, condición necesaria para la transición al estado maligno [238] y que el bloqueo del receptor de angiopoyetina TIE2 expresado en los TAM inhibió la angiogénesis tumoral, indujo la regresión vascular y limitó el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis en múltiples modelos tumorales [239]. Por otro lado, mediante un sistema de cocultivo *in vitro* se demostró que la producción de IL-8 y VEGF a partir de células de melanoma es regulada por TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  secretados por los TAM, por lo que los macrófagos también pueden inducir indirectamente la liberación de factores angiogénicos por las propias células tumorales [240]. Estos macrófagos angiogénicos pueden ser reclutados hacia el foco del tumor en respuesta a la hipoxia o a factores de crecimiento como CSF1 y VEGF [237, 241].

A su vez, los TAM son capaces de modular las funciones efectoras de las células T, por ejemplo, a través de la producción de citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  que inducen la generación de LT regulatorios [242, 243] o Th2 [244] e inhiben la citotoxicidad de células CD8 a través de la represión de la expresión de Pfp, granzima A y B, FasL e IFN- $\gamma$  [245]. Además, los TAM producen una alta variedad de quemoquinas capaces de atraer células regulatorias al foco del tumor. Por ejemplo, se ha demostrado que los TAM producen CCL20 y CCL22 que reclutan LT regulatorios promoviendo la formación de microambientes inmunosupresores en tumores colorrectales [246] y de ovario, respectivamente [247]. Asimismo, recientemente se ha descrito que los TAM son un determinante importante en la exclusión de células T CD8 de carcinomas de células escamosas de pulmón humanos y murinos. Utilizando un modelo de tumor murino este grupo demostró que la depleción de los TAM a través del empleo de un inhibidor de CSF1R restauró la migración e infiltración de células T CD8 a los islotes tumorales y mejoró la eficacia de la inmunoterapia con antiPD-1 [248].

Más aún, los TAM estimulan la migración de células tumorales y facilitan su diseminación mediante la secreción de metaloproteinasas de la matriz (MMP o *matrix metalloproteinases*), serinproteasas y catepsinas que modifican las uniones célula-célula y alteran la membrana basal, facilitando el escape de las células tumorales al sistema circulatorio o linfático [249–251]. Por ejemplo, la actividad de las proteasas catepsinas B derivadas de los TAM promueve la invasión celular del cáncer de mama y la metástasis

pulmonar [252]. A su vez, es crítica para promover el crecimiento del tumor pancreático, la angiogénesis y mejora notablemente la invasividad de estas células cancerosas en cultivo [253]. Consistentemente, ratones portadores de tumores mamarios y depletados de macrófagos mostraron escaso desarrollo de malignidad y metástasis en pulmón [254].

Recientemente, además de las terapias convencionales, la inmunoterapia se ha convertido en una estrategia eficaz para el tratamiento del cáncer. Como se mencionó anteriormente, existen evidencias clínicas y experimentales que demuestran que los tejidos cancerosos con alta infiltración de TAM se asocian con un mal pronóstico del paciente y la resistencia a las terapias, por lo que las inmunoterapias dirigidas a los TAM representan un enfoque terapéutico prometedor contra el cáncer. Muchas de estas estrategias inmunoterapéuticas ya han entrado en fase clínica e incluyen la interferencia con la supervivencia de TAM, la inhibición de su reclutamiento y la repolarización de los TAM similares a M2 hacia fenotipos efectores antitumorales [255].

Por un lado, inducir la apoptosis de TAM parece ser una estrategia inmunoterapéutica efectiva en algunos tumores. Estudios recientes han aportado evidencia preclínica para el uso de alemtuzumab (AcMo anti-CD52) como terapia antiangiogénica en el cáncer de ovario, dado que la mayoría de los leucocitos infiltrantes en estos tumores corresponden a células monocíticas TIE2<sup>+</sup>CD52<sup>+</sup> con características proangiogénicas. Alemtuzumab indujo la lisis mediada por el complemento de estas células *in vitro* y restringió la angiogénesis y el crecimiento tumoral en un modelo murino *in vivo* de cáncer de ovario [256]. Por otro lado, la trabectedina (ET-743), agente quimioterapéutico recientemente aprobado para el tratamiento del sarcoma de tejido blando [257] y el cáncer de ovario [258], indujo una rápida apoptosis exclusivamente en fagocitos mononucleares de varios modelos de tumores murinos y una reducción asociada de la angiogénesis [259]. En ese mismo trabajo observaron el mismo efecto en las muestras de tumores de pacientes tratados con esta droga, por lo que el empleo de trabectedina en el cáncer aparece como una nueva herramienta para limitar la supresión inmune mediada por células mielomonocíticas.

Por otro lado, varias estrategias farmacológicas terapéuticas destinadas a impedir el reclutamiento de los TAM al foco tumoral han ingresado a ensayos clínicos. Un ejemplo es el empleo de Pexidartinib (PLX3397), inhibidor de CSF1R [260]. Pexidartinib ha mostrado

efectos antitumorales limitados en pacientes al utilizarse como agente terapéutico único, lo que sugiere la necesidad de combinar este inhibidor con otras terapias. Tal es el caso del tratamiento del melanoma avanzado, donde se está investigando el efecto de Pexidartinib en conjunto con un Ac anti-PD-1 [261]. Asimismo, dado que los macrófagos también utilizan el eje CCL2/CCR2 para infiltrar tumores, se están desarrollando estrategias anti-CCR2 de manera de reducir el número de macrófagos inmunosupresores en los tumores sólidos [262].

Sin embargo, cada vez hay más pruebas de que una activación adecuada de los macrófagos, en lugar de su depleción, potenciaría drásticamente una respuesta inmune anti-tumoral. El método más directo para inducir la repolarización hacia perfiles M1 es a través de la estimulación con ligandos de TLR. La estimulación a través de TLR4 por la hemaglutinina sensible a la manosa derivada de *Pseudomonas aeruginosa* (PA-MSHA) está actualmente en uso clínico para el tratamiento del derrame pleural maligno en pacientes con cáncer de pulmón avanzado, donde un alto infiltrado de macrófagos CD163<sup>+</sup> se asocia con un mal pronóstico del paciente [263]. Por otra parte, Vidyarthi y colegas demostraron que el ligando de TLR3 ácido poliinosínico-policitídico (Poly I:C) reprograma a los macrófagos de un modelo de ratón de cáncer de colon hacia un perfil proinflamatorio caracterizado por la producción de IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e iNOS. Además, mostraron que el Poly I:C puede impedir el efecto de IL-4 e IL-13, evitando efectivamente la polarización de M2, e inhibir potentemente el crecimiento tumoral *in vivo* [264]. Otro ejemplo es el Motolimod, molécula pequeña con actividad de agonista selectivo de TLR8 que también muestra una potente activación de la respuesta inmunológica incluso en pacientes con cáncer en etapa tardía y se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de múltiples tipos de cáncer [265]. Se ha demostrado que la combinación de Motolimod con Cetuximab, inhibidor del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR o *Epidermal growth factor receptor*) repolarizó potentemente a los TAM en pacientes con carcinoma de células escamosas aumentando la secreción de citoquinas proinflamatorias [266]. Por otra parte, Beatty y colegas probaron la combinación de un AcMo agonista de CD40 (CP-870,893) con quimioterapia en una pequeña cohorte de pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal irresecable quirúrgicamente y observaron regresiones tumorales en algunos pacientes. El empleo de un modelo murino permitió demostrar que la regresión tumoral



requería exclusivamente de los macrófagos, que luego de la activación a través de CD40 se convirtieron en tumoricidas [267]. Actualmente, este AcMo se encuentra en ensayos clínicos y con respuestas parciales en pacientes con melanoma metastásico [268] y pacientes con adenocarcinoma pancreático ductal avanzado [269]. Es necesario destacar, que aunque las estrategias de inmunoterapia dirigida a los TAM son prometedoras, la mayoría de los estudios clínicos anteriormente mencionados todavía están en etapa temprana, por lo que son necesarios más estudios destinados a validar su potencial en aplicaciones clínicas. Asimismo, aunque estas terapias pueden por sí mismas dar beneficios terapéuticos; probablemente los mejores resultados se obtengan cuando se las utiliza de manera complementaria a las terapias citorreductoras convencionales, los inhibidores de la angiogénesis y/o a otras inmunoterapias.

### **3.3. CCR: Generalidades y modelos experimentales para su estudio**

El cáncer de riñón se encuentra entre los 10 tipos de cáncer con mayor incidencia en hombres y entre los 15 tipos de cáncer con mayor incidencia en mujeres (<https://gco.iarc.fr/>), y en general, el riesgo de desarrollar cáncer de riñón es mayor en los hombres que en mujeres. Las causas son poco conocidas, algunos de los factores de riesgo incluyen el tabaquismo, la obesidad y la hipertensión. Dentro de todas las neoplasias renales, el 90-95% representan carcinomas de células renales (CCR) que en la mayoría de los casos, ocurre sin un patrón hereditario reconocible. Tener un familiar de primer grado con un diagnóstico de CCR aumenta el riesgo cuatro veces, pero solo una pequeña fracción de los pacientes tiene un familiar afectado [270].

Actualmente, se definen 5 tipos de CCR teniendo en cuenta las propiedades morfológicas, citogenéticas y moleculares del tumor. Los tumores más frecuentes son el CCR de células claras (60–85%) y carcinoma papilar renal de tipo I y II (7–14%), ambos derivados de células epiteliales del túbulo proximal; otros subtipos menos frecuentes incluyen el carcinoma de células renales cromóforas (4–10%), el oncocitoma benigno (2-5%) y cáncer de conducto colectivo (1-2%) que surgen de las células intercaladas de los conductos colectores del riñón [271].

En aquellos pacientes con enfermedad limitada al riñón y sus GL regionales, la intervención quirúrgica es la modalidad de tratamiento primario y se lleva a cabo con intención curativa. La expectativa de vida es alta para aquellos pacientes diagnosticados en etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, desafortunadamente, la supervivencia libre de progresión y la supervivencia general para la mayoría de los pacientes con enfermedad avanzada todavía son muy inferiores a 2 años dado que un 20% de los pacientes sometidos a nefrectomía tendrán una recaída y desarrollarán CCR metastásico (CCRm) durante el seguimiento. Además, debido a la ausencia de síntomas, el diagnóstico erróneo y la falta de herramientas de detección, casi el 30% de los pacientes con CCR ya presentan metástasis al momento del diagnóstico, y en esos casos el pronóstico es extremadamente sombrío. Sin un tratamiento específico, la expectativa de vida después de la detección de metástasis no es superior a los 10 a 13 meses [272]. Estas estadísticas motorizan la necesidad de más investigación sobre la identificación y el desarrollo de tratamientos eficaces para el CCRm.

Para el tratamiento del CCRm, los elementos relacionados con la angiogénesis y sus mecanismos reguladores son probablemente los blancos terapéuticos más ampliamente empleados [273]. Las estrategias terapéuticas incluyen la inhibición del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR o *Vascular endothelial growth factor receptor*) y el bloqueo de su ligando (VEGF) mediante AcMo o el empleo de varios inhibidores de tirosina quinasa (sunitinib, axitinib, sorafenib y pazopanib). Estos desarrollos se basaron en la comprensión de la biología del CCR de células claras, donde la pérdida funcional del gen Von Hippel-Lindau (VHL) conduce a la regulación positiva de varios genes protumorigénicos, particularmente VEGF [274]. Por otro lado, el hallazgo de que la desregulación de la activación de la vía PI3K-Akt-mTOR a diferentes niveles de la cascada de señalización impulsa la progresión del CCR, ha llevado al desarrollo de otras alternativas terapéuticas, tales como everolimus y temsirolimus. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en detener el ciclo celular de las células tumorales mediante la inhibición de la proteína mTOR, enlenteciendo de esta forma la progresión de la enfermedad y el crecimiento del tumor. Sin embargo, estos tratamientos no benefician a todos los pacientes dado que muchas veces las respuestas no son duraderas o surgen resistencias a las terapias, incluso luego de un beneficio inicial [275, 276]. En este contexto, en la última década se han implementado las

inmunoterapias dirigidas al bloqueo de los puntos de control inmunológico (ICB o *immune checkpoint blockers*) que son consideradas uno de los mecanismos de escape inmune en pacientes tratados en primera línea con los agentes previamente mencionados, con el objetivo de reactivar la respuesta inmunitaria específica contra las células tumorales. La inmunoterapia combinada de Nivolumab con Ipilimumab, que bloquean la interacción PD-1 con PD-L1 y/o PD-L2 y CTLA-4 con las moléculas co-estimuladoras expresadas en los LT, respectivamente, son actualmente estrategias terapéuticas que han mostrado resultados alentadores en estudios de fase temprana [277]. Sin embargo, todavía hay preguntas críticas que quedan sin respuestas, tales como la manera de realizar la mejor selección de pacientes, los marcadores predictivos que ayuden a encontrar el mejor momento de administrar el tratamiento, la secuencia óptima a seguir al momento de combinar inmunoterapias con otros agentes terapéuticos, los mecanismos de resistencia primaria, entre otras. Por ello, los esfuerzos de investigación deben dirigirse a estas necesidades de manera de obtener el máximo beneficio para el paciente [278, 279].

Existen numerosas formas de abordar el estudio de la progresión de una patología y sus posibles tratamientos, tales como líneas celulares, xenotransplantes y modelos de ratones singéneos. Las líneas celulares representan una aproximación útil para estudiar *in vitro* vías de señalización o mecanismos moleculares involucradas en la patología, pero constituyen un abordaje relativamente reduccionista dado que no brindan información sobre otros fenómenos de trascendental importancia como la interacción de las células tumorales con otras células del microambiente del tumor y que pueden incidir en el desarrollo del tumor primario y las metástasis. Por otra parte, los xenotransplantes de líneas celulares humanas o de muestras clínicas aisladas de tumores humanos en ratones permiten el estudio de células tumorales humanas en el contexto de un ambiente *in vivo*, lo cual supone una importante ventaja para el estudio de diferentes aspectos de la biología tumoral frente a los sistemas de estudio *in vitro*. Sin embargo, dado que las células injertadas corresponden a una especie diferente a la del organismo huésped no constituyen un modelo apropiado a la hora de estudiar la interacción de las células tumorales con el sistema inmune. Un sistema valioso para estudios de este tipo son los modelos de cáncer murinos singéneos. Dentro de los modelos de cáncer renal singéneos más usados se encuentra la línea celular Renca derivada de un adenocarcinoma renal espontáneo de ratones BALB/c

[280]. Este modelo singeneico será el que utilizaremos en este trabajo para evaluar nuestra hipótesis de que los TAM de CCR presentan efectos inmunosupresores sobre las células NK que contribuyen a la progresión del tumor.

# Objetivos

---

Como se describió previamente, las células NK cumplen un rol esencial durante la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, muchas veces las funciones efectoras de las células NK intratumorales se encuentran comprometidas [216, 281]. Teniendo en cuenta que la magnitud de la respuesta funcional de las células NK depende en gran medida de su interacción con otras células del sistema inmune, es posible que los TAM, población leucocitaria mayoritaria en el estroma tumoral de varios tipos de tumores, induzcan efectos inmunosupresores que afecten la inmunovigilancia de las células NK. En consecuencia, el objetivo general de este trabajo de Tesis de Doctorado fue elucidar las consecuencias funcionales y los mecanismos subyacentes a la interacción entre macrófagos M2 diferenciados *in vitro* o TAM aislados de tumores con células NK. De esta manera, nos propusimos conocer nuevos mecanismos e interacciones celulares que podrían suprimir las funciones de las células NK y contribuir a la progresión tumoral. Particularmente, nos planteamos:

1. Establecer un sistema de diferenciación de macrófagos M2 *in vitro*, de manera de investigar las consecuencias funcionales de su interacción con las células NK. Evaluar el fenotipo y las funciones efectoras de las células NK luego del contacto con macrófagos M2 y ahondar en los mecanismos celulares y moleculares involucrados.
2. Investigar la interacción de los macrófagos antiinflamatorios con células NK en un contexto de patología humana. Para esto evaluaremos el fenotipo de macrófagos asociados a tumor (TAM o *Tumor-associated macrophages*) de nefrectomías de carcinomas de células renales (CCR) en los cuales los TAM constituyen la población leucocitaria mayoritaria del infiltrado tumoral y su abundancia correlaciona con el mal pronóstico de la enfermedad. A su vez, estudiaremos las consecuencias funcionales de su interacción con células NK, de manera de evaluar si los TAM se comportan de manera similar a los M2 diferenciados *in vitro*.
3. Validar *in vivo* los fenómenos observados mediante el empleo de un modelo murino singeneico de cáncer renal (Renca).

# Materiales y métodos

## 1. Anticuerpos

### 1.1. Ac monoclonales contra moléculas humanas

Reactividad	Clon	Fluorocromo	Empresa	Uso
Anti-CD14	M5E2	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD274	29E.2A3	PE/Cy7	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD86	IT2.2	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD206	15-2	APC-Cy7	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD56	N901	APC	Beckman Coulter	Inmunomarcación
Anti-CD3	UCHT1	PE/Cy7	TONBO	Inmunomarcación
Anti-CD69	FN50	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD25	BC96	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-IFN- $\gamma$	4S.B3	PE o BV421	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD107a	H4A3	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-T-bet	4B10	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKG2D	1D11	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKp30	P30-15	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKp46	9E2	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKp80	5D12	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-Pfp	dG9	AlexaFluor488	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD178 (FasL)	NOK-1	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKG2C	134591	AlexaFluor488	R&D Systems	Inmunomarcación
Anti-CD85j (ILT-2)	292305	FITC	R&D Systems	Inmunomarcación
Anti-NKG2A	131411	PE	R&D Systems	Inmunomarcación
Anti-TIGIT	741182	PE	R&D Systems	Inmunomarcación
Anti-TRAIL	71908	AlexaFluor488	R&D Systems	Inmunomarcación
Anti-DNAM-1	DX11	FITC	BD	Inmunomarcación
Anti-KIR3DL1	DX9	FITC	BD	Inmunomarcación
Anti-granzima B	GB11	PE	eBioscience	Inmunomarcación
Anti-HLA-G	MEMG9	PE	Abcam	Inmunomarcación
Anti-TGF- $\beta$	1D11.16.8	-	BioLegend	Bloqueo/neutralización
IgG1	MOPC-21	-	BioLegend	Bloqueo/neutralización
Anti-CD85j	GHI/75	-	BioLegend	Bloqueo/neutralización
IgG2b	eBMG2b	-	eBioscience	Bloqueo/neutralización
Anti-IL-10	JES3-19F1	-	BioLegend	Bloqueo/neutralización

## 1.2. Ac monoclonales contra moléculas de ratón

Reactividad	Clon	Fluorocromo	Empresa	Uso
Anti-CD3	17A2	PE-Cy7	TONBO	Inmunomarcación
Anti-CD3	17A2	APC	TONBO	Inmunomarcación
Anti-CD45	30-F11	Pacific Blue	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD45	30-F11	PE-Cy7	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-NKp46	CX5	APC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD49b	DX5	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-Tim3	RMT3-23	BV421	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-PD-1	29F.1A12	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-T-bet	4B10	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-IFN- $\gamma$	XMG1.2	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD107a	1D4B	BV 421	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD27	LG.3A10	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-CD11b	M1/70	APC-Cy7	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-F4/80	BM8	PE	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-F4/80	BM8.1	APC	TONBO	Inmunomarcación
Anti-Ly6C	HK1.4	FITC	BioLegend	Inmunomarcación
Anti-Ly6G	1A8	PE	BioLegend	Inmunomarcación

## 2. Reactivos

Para estimular las células NK humanas se utilizaron las citoquinas recombinantes IL-12 e IL-15 de PeproTech e IL-18 de MBL International. Estas células fueron también tratadas con TGF- $\beta$ 1 de Tonbo.

Para la diferenciación de monocitos a macrófagos humanos se utilizó M-CSF de ImmunoTools, mientras que para la polarización a macrófagos M1 o M2 se utilizó LPS (*E. coli* cepa 0111:B4) de Sigma e IFN- $\gamma$  de ImmunoTools o IL-4 de R&D Systems, respectivamente.

Para marcaciones celulares se utilizó éster de succinimidil-carboxifluoresceína (CFSE) y eFluor Dye 670 ambos de eBioscience. Para evaluar viabilidad celular o citotoxicidad celular se empleó Zombie Green de BioLegend.

Para medir producción de NO por CF se utilizó DHE (Dihidroetidio) de Calbiochem.

Para los ensayos de evaluación de la producción de IFN- $\gamma$  o degranulación de las células NK se empleó Monensina y Brefeldina A (Golgi Stop y Golgi Plug, respectivamente) ambos de BioLegend.

### **3. Líneas celulares y condiciones de cultivo**

Las células K562 (leucemia mielocítica crónica, ATCC CCL-243), blanco universal de células NK humanas y las células Renca (adenocarcinoma renal murino, ATCC CRL-2947) fueron cultivadas en medio RPMI completo: RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina (ambos de Invitrogen) y 40  $\mu$ g/ml de gentamicina (Bagó).

### **4. Muestras de sangre periférica y nefrectomías de tumores renales humanos**

Las muestras de sangre periférica de individuos sanos fueron provistas por el Servicio de Hemoterapia del Hospital Carlos G. Durand, el Complejo Médico Churruca-Visca y por el Banco de Sangre de la provincia de Buenos Aires, La Plata.

Las muestras de biopsias quirúrgicas de pacientes con CCR humano se obtuvieron de pacientes sometidos a nefrectomía parcial o radical y fueron proporcionadas por el Servicio de Urología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas "Norberto Quirno" (CEMIC) y del Servicio de Urología del Hospital Alemán, ambos de la Ciudad de Buenos Aires.

Los estudios realizados con muestras de sangre de donantes sanos o biopsias de tumores renales humanos contaron con la aprobación del comité de ética pertinente (IBYME-CONICET) y se obtuvo el consentimiento informado de los sujetos participantes.



#### 4.1. Procesamiento de muestras humanas

Se realizaron gradientes de Ficoll-Paque™ PLUS (GE, Healthcare) con las muestras de sangre heparinizada de donantes voluntarios sanos diluida al medio con solución fisiológica (SF). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC o *peripheral blood mononuclear cells*) obtenidas fueron lavadas con SF y resuspendidas en medio de cultivo RPMI completo. Posteriormente, se realizó el recuento de células con azul de Tripán en cámara de Neubauer y se realizaron las correspondientes determinaciones.

Las muestras de biopsias de pacientes con CCR se conservaron a 4°C y en SF hasta el momento del procesamiento, el cual se realizó el mismo día de la cirugía, en frío y condiciones de esterilidad. El tumor y el parénquima adyacente al tumor, identificados por inspección visual, se procesaron en forma separada. Para esto, en primer lugar, cada muestra se disgregó mecánicamente en placas de Petri de 100 mm conteniendo SF hasta obtener suspensiones homogéneas que fueron filtradas a través de filtros de nylon con poros de 70 µm, trasvasadas a tubos de polipropileno de 15 ml y centrifugadas a 500 g durante 5 min. Ambas muestras se lavaron dos veces más con SF y se marcaron con los diferentes AcMo para análisis por CF.

### 5. Ratones

Se utilizaron animales de la cepa BALB/c de entre 8 y 12 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Nacional de La Plata que fueron alojados en el Bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME) de acuerdo con las pautas establecidas por el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos (NIH). Los estudios realizados con animales de laboratorio contaron con la aprobación del CICUAL pertinente (IBYME-CONICET).

## 5.1. Experimentos *in vivo*

### 5.1.1.1. Desafío con línea celular tumoral *Renca*

Grupos de 4-6 ratones fueron inyectados por vía subcutánea con  $2,5 \times 10^5$  células tumorales y a los 6 días fueron separados en dos grupos experimentales: grupo depletado de TAM y grupo control, de acuerdo con la administración subcutánea de liposomas conteniendo clodronato o liposomas control, respectivamente. Los animales fueron sacrificados 24 días luego del desafío tumoral y los tumores y bazos fueron extirpados para su posterior procesamiento y análisis. Alternativamente, cada 2-3 días se midió el tamaño del tumor con un calibre digital y se calculó el volumen utilizando la fórmula  $(d^2 \times D)/2$ , donde d y D son los diámetros menor y mayor del tumor, respectivamente.

### 5.1.1.2. Depleción de TAM

Los ratones fueron inyectados por vía intratumoral con 100  $\mu$ l de una suspensión 2,5 mg/mL de liposomas con clodronato (SKU# CLD-8909, Clodrosome<sup>®</sup>) o liposomas control (SKU# CLD-8910, Encapsome<sup>®</sup>). Las células fagocíticas de animales tratados con Clodrosome<sup>®</sup>, reconocen los liposomas como partículas extrañas y proceden a eliminarlos del tejido mediante fagocitosis. Los liposomas, una vez fagocitados, liberan el clodronato en el citosol resultando en la muerte celular, mientras que el clodronato no encapsulado en el liposoma no es capaz de atravesar la membrana celular para iniciar la muerte celular. Por otro lado, los liposomas controles Encapsome<sup>®</sup> también son reconocidos y fagocitados por el mismo mecanismo que Clodrosome<sup>®</sup>, pero dado que estos liposomas no contienen clodronato, las células fagocíticas no se destruyen. El tratamiento se comenzó a los 6 días posteriores al desafío tumoral y, luego, cada 4 días hasta el momento del sacrificio. La depleción de TAM fue confirmada en muestras de tumor por CF.

### 5.1.1.3. Procesamiento de órganos

Los tumores y los bazo fueron disgregados mecánicamente en placas de Petri de 60 mm conteniendo SF con 5% de SFB mediante el empleo de émbolos de jeringa sobre filtros de nylon con poros de 70  $\mu\text{m}$ . Las suspensiones celulares fueron trasvasadas a tubos de polipropileno de 15 ml y centrifugadas a 500 g durante 5 min. Los tumores se lavaron al menos dos veces más con SF y se filtraron nuevamente antes de ser resuspendidos en medio de cultivo RPMI completo. Posteriormente se realizó el recuento de las células con azul de Tripán en cámara de Neubauer y las células se utilizaron para marcaciones con AcMo y análisis por CF.

## 5.2. Experimentos *ex vivo*

### 5.2.1.1. Ensayo de producción de IFN- $\gamma$ *ex vivo*

A los fines de estudiar el porcentaje de células NKIT murinas productoras de IFN- $\gamma$ , en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo en “U” se sembraron  $1,5 \times 10^6$  células obtenidas a partir del homogenato de las muestras del tumor murino Renca. Las mismas se cultivaron durante 5 h en presencia de brefeldina A (Biolegend o Golgi Plug, BD) y monensina (Golgi Stop, BD) como inhibidores del transporte de proteínas y luego se determinó el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  por CF dentro de la población de células  $\text{CD45}^+\text{CD3}^-\text{CD49b}^+$  (como se detalla en la sección “Citometría de Flujo”). En la **Figura 4** se observan los gráficos de tipo *zebra plot* representativos que muestran la estrategia empleada para analizar la población celular señalada.

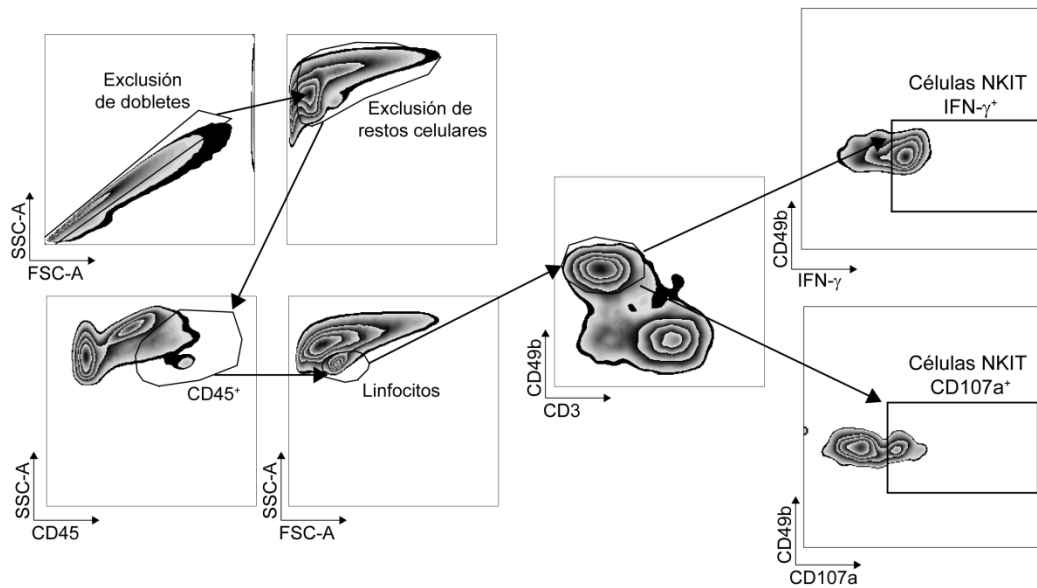


Figura 4. Estrategia empleada para analizar la funcionalidad de células NKIT.

### 5.2.1.2. Ensayo de degranulación *ex vivo*

Con la finalidad de evaluar la degranulación de las células NKIT murinas, en placas de cultivo de 96 pocillos de fondo en "U" se sembraron  $1,5 \times 10^6$  células obtenidas a partir del homogenato de las muestras del tumor murino Renca. Las mismas se cultivaron en presencia de brefeldina A, monensina y el AcMo anti-CD107a durante 5 h y luego se cosecharon para continuar con el protocolo de inmunomarcación con los AcMo anti-CD45, anti-CD3 y anti-CD49b, con el objeto de evaluar la degranulación como el porcentaje de células CD107a<sup>+</sup> dentro de la población de células CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD49b<sup>+</sup>. La estrategia empleada para analizar la población celular señalada fue la misma que la graficada previamente en la **Figura 4**.

## 6. Aislamiento de poblaciones celulares

### 6.1. Aislamiento de células NK

Con el objetivo de aislar células NK humanas a partir de muestras de sangre de individuos sanos, se empleó el kit de aislamiento por selección negativa RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canadá) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante y un gradiente de Ficoll-Paque™. Las células NK obtenidas fueron lavadas con SF y resuspendidas en RPMI completo y posteriormente se realizó el recuento con azul de Tripán en cámara de Neubauer y los ensayos funcionales correspondientes. La pureza de las células aisladas se evaluó mediante marcación con AcMo y CF (células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) siendo siempre superior al 95%

## **6.2. Aislamiento de monocitos**

Se aislaron monocitos a partir de muestras de sangre de individuos sanos, mediante selección positiva utilizando un kit comercial de separación inmunomagnético de células CD14<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany). La pureza de las células aisladas se evaluó mediante marcación con AcMo y CF siendo siempre superior al 95%.

## **6.3. Aislamiento de TAM a partir de muestras de biopsias de pacientes con CCR**

Con el objeto de aislar TAM a partir de muestras de biopsias de tumores renales humanos, la muestra se procesó como se detalló anteriormente y a la suspensión homogénea obtenida se la sembró sobre un gradiente de Ficoll-Hypaque, de manera de enriquecer la muestra en células mononucleares. A continuación, se incubó la muestra con el kit comercial de separación inmunomagnético de células CD14<sup>+</sup> (Miltenyi Biotech) y la fracción positiva, correspondiente a los TAM, fue sometida a marcación con AcMo y CF para el análisis de pureza (los TAM se definieron como células CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>) siendo siempre superior al 75%. Finalmente, los TAM obtenidos fueron cultivados en relación 1:1 con células NK aisladas de muestras de sangre periférica de donadores sanos y se realizaron las determinaciones correspondientes.

## 7. Diferenciación de macrófagos humanos *in vitro*

Con el objeto de diferenciar macrófagos humanos *in vitro*, se cultivaron monocitos aislados durante 6 días en Placas de Petri de 100 mm a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml en RPMI completo y en presencia de M-CSF (100 ng/ml). Al tercer día se renovó el 50% del medio de cultivo, manteniendo estable la concentración de M-CSF. En todos los casos, los macrófagos obtenidos (M0) se levantaron mediante el agregado de TrypLE Express (Life Technologies) durante 5 min a 37°C, se contaron y replaquearon a la concentración deseada en presencia de los estímulos de polarización. Para obtener M1 o M2, los M0 fueron incubados 24 h con LPS (100 ng/ml) e IFN- $\gamma$  (50 ng/ml) o IL-4 (200 ng/ml), respectivamente.

## 8. Obtención de medios condicionados (MC) de macrófagos humanos diferenciados *in vitro*

Con el objeto de obtener MC de macrófagos M1 y M2, se plaquearon macrófagos M0 en placas de 96 pocillos fondo en U y se polarizaron como se detalló previamente. Seguidamente, los macrófagos fueron lavados tres veces con SF, centrifugando a 400 g durante 5 min cada vez, y finalmente se repusieron 100  $\mu$ l de medio RPMI completo fresco. Luego de 24 h se recolectaron los correspondientes MC, se centrifugaron a 400 g durante 5 min y los sobrenadantes se congelaron a -70°C.

## 9. Experimentos de cocultivo de macrófagos y células NK *in vitro*

En todos los casos los macrófagos M0 diferenciados *in vitro* se levantaron mediante el agregado de TrypLE Express y se cultivaron en placas de 96 pocillos fondo en U a razón de  $1 \times 10^6$  células/ml (100  $\mu$ l/pocillo), en presencia o ausencia de los estímulos de polarización

correspondientes. Luego de finalizada la polarización, los macrófagos M1 y M2 fueron lavados tres veces con SF, centrifugando a 400 g durante 5 min cada vez, y cocultivados con células NK humanas aisladas en RPMI completo (en relación células NK:macrófagos 1:1).

Con el objeto de realizar los experimentos de cocultivos autólogos de macrófagos y células NK, se aislaron células NK y monocitos de sangre periférica del mismo dador sano, congelando las células NK hasta completar la diferenciación de los macrófagos y su respectiva polarización hacia macrófagos M1 y M2, momento en el que se descongelaron unas horas antes del cocultivo.

### 9.1. Determinación de la producción de IFN- $\gamma$ por células NK

A los fines de estudiar el porcentaje de células NK humanas productoras de IFN- $\gamma$ , las células NK aisladas fueron cultivadas 24 h a 37°C en ausencia o en presencia de IL-12 (10 ng/ml), IL-15 (1 ng/ml) e IL-18 (10 ng/ml), adicionando durante las últimas 5 h Brefeldina A y monensina. Luego, las células se cosecharon y marcaron con los AcMo anti-CD3 y anti-CD56, se lavaron y fijaron con una solución de paraformaldehído (PFA) al 1% en PBS-NaN<sub>3</sub> 0,1% y a continuación se marcaron con el AcMo anti-IFN- $\gamma$ , como se detalla en la sección “Citometría de Flujo”. Finalmente, se evaluó el porcentaje de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> dentro de la población de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup>, dado que como se mencionó en la introducción, es la mayor productora de IFN- $\gamma$ .

Este ensayo se realizó en presencia o ausencia de macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro*, de los respectivos MC (obtenidos como se detalló previamente) o de los TAM aislados a partir de las muestras de CCR humanas. Además, en algunos casos se empleó un sistema de *transwell* que permitió estimular a las células NK con citoquinas en presencia de macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro*, pero impidiendo el contacto celular macrófago-célula NK. Para esto, se utilizaron placas de 24 pocillos donde se sembraron los macrófagos M1 o M2 a razón de 1x10<sup>6</sup> células/ml (250  $\mu$ l/pocillo), sembrando esta vez las células NK sobre los dispositivos *transwell* de tamaño de poro de 0,4  $\mu$ m, a razón de 1x10<sup>6</sup> células/ml

(250 µl/dispositivo). Luego de 24 h de cultivo se recuperaron las células NK y se evaluó la frecuencia de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN-γ.

Por otro lado, en algunos casos el ensayo se realizó en presencia de MC de M1 o M2 en las condiciones previamente descritas y adicionando AcMo neutralizantes contra IL-10 o TGF-β (ambos a concentración final de 10 µg/ml) o sus respectivos controles de isotipo (CI, también a concentración final 10 µg/ml). Luego de 24 h de cultivo se recuperaron las células NK y se evaluó la frecuencia de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN-γ.

A su vez, se determinó la frecuencia de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN-γ como se detalló arriba, pero en presencia de concentraciones crecientes de TGF-β recombinante (cubriendo el rango de 0,01 a 50 ng/ml).

## **9.2. Determinación de marcadores de activación en células NK**

Con el objeto de medir la expresión de CD25 y CD69 en células NK humanas en presencia o ausencia de M1 o M2, se utilizaron células NK en reposo o estimuladas con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 en las concentraciones anteriormente descritas. Las células fueron recuperadas a las 24 h y se marcaron y analizaron por CF, evaluando el porcentaje de células CD69<sup>+</sup> o CD25<sup>+</sup> dentro de la población de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>.

## **9.3. Ensayo de degranulación de células NK**

Con la finalidad de evaluar la degranulación de células NK humanas, las células aisladas fueron cocultivadas con macrófagos M1, M2 o TAM asociados a CCR durante 24h a 37°C, adicionando durante las últimas 5 h del cultivo Brefeldina A, monensina, el AcMo antiCD107a y las células blanco K562 (en relación células NK:macrófagos:células blanco 1:1:1). Luego, las células se cosecharon y marcaron con los AcMo anti-CD3 y anti-CD56 con el objeto de evaluar la degranulación como el porcentaje de células CD107a<sup>+</sup> dentro de la



población de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>. Este ensayo también se realizó en presencia de los respectivos MC de macrófagos (obtenidos como se detalló previamente).

A su vez, en algunos casos se empleó un sistema de *transwell* que permitió estimular a las células NK con las células blanco K562 en presencia de macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro*, pero impidiendo el contacto celular con los macrófagos. Para esto, se utilizaron placas de 24 pocillos donde se sembraron macrófagos M1 o M2 a razón de 1x10<sup>6</sup> células/ml (250 µl/pocillo) y se sembraron esta vez las células NK y K562 sobre los dispositivos *transwell* de tamaño de poro de 0,4 µm, a razón de 1x10<sup>6</sup> células/ml (250 µl/dispositivo). Luego de 24 h de cultivo se recuperaron las células NK y se evaluó la frecuencia de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup>.

Por otro lado, en algunos casos el ensayo se realizó en presencia de macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro* y en las condiciones previamente descritas, pero adicionando AcMo bloqueantes contra TGF-β o CD85j (ambos a concentración final 10 µg/ml) o sus respectivos CI (también a concentración final 10 µg/ml). Luego de 24 h de cultivo se recuperaron las células NK y se evaluó la frecuencia de células NK CD3<sup>-</sup>CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup>.

#### 9.4. Ensayo de citotoxicidad

Células NK humanas se cocultivaron con macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro* durante 18 h y luego se agregaron las células blanco K562 marcadas con eFluor Dye 670 (detalles en sección “Marcación de poblaciones celulares con trazadores fluorescentes”) en diferentes relaciones célula efectora:célula blanco (E:B 1:1, 3:1, 5:1). Para favorecer el contacto intercelular las células se centrifugaron durante 30 seg a 250 g. Luego de 5 h de cocultivo, las células se cosecharon, se marcaron con Zombie Green (BioLegend, dilución 1/400, detalles en sección “Citometría de Flujo”) y se analizaron por CF. El porcentaje de células blanco muertas (citotoxicidad) se calculó como 100 x porcentaje de células eFluor Dye 670<sup>+</sup>Zombie Green<sup>alto</sup>/porcentaje de células eFluor Dye 670<sup>+</sup>. El porcentaje basal de células blanco muertas (sin contacto con células efectoras), fue siempre menor al 5 %.

### 9.5. Determinación de viabilidad

Las células NK humanas se cocultivaron con macrófagos M1 o M2 diferenciados *in vitro* durante 24 h y luego se determinó la viabilidad de células NK mediante la marcación con Zombie Green. La viabilidad fue calculada como el porcentaje de células NK totales menos el porcentaje de células NK muertas (Zombie Green<sup>alto</sup>).

### 9.6. Formación de conjugados

Con el objeto de detectar conjugados de células NK humanas-células blanco K562, las células NK se marcaron con eFluor Dye 670 y se cocultivaron con macrófagos M1 o M2 durante 18 h en presencia de células K562 marcadas con CFSE a una relación células NK:células K562:macrófagos de 1:1:1 (ver detalles de la marcación en sección “Marcación de poblaciones celulares con trazadores fluorescentes”). Luego de 5 h de incubación a 37°C, las células se analizaron por CF y el porcentaje de conjugados se calculó como  $100 \times \text{porcentaje de células CFSE}^+ \text{eFluor Dye 670}^+ / \text{porcentaje de células eFluor Dye 670}^+$ .

## 10. Marcación de poblaciones celulares con trazadores fluorescentes

Para las marcaciones con CFSE, las células K562 se lavaron y resuspendieron en PBS frío a una densidad de  $20 \times 10^6$  células/ml, se diluyeron al medio con una solución 5  $\mu\text{M}$  de CFSE, se incubaron 6 min en hielo y se lavaron tres veces con PBS-SFB 10% a 600 g durante 5 min. Finalmente, las células se resuspendieron en RPMI completo, se contaron y se utilizaron para los experimentos pertinentes. El PBS y el PBS-SFB 10% se utilizaron a una temperatura de 4°C.

Para la tinción con eFluor Dye 670 las células NK se lavaron y resuspendieron en PBS a una densidad de  $20 \times 10^6$  células/ml, se diluyeron al medio con una solución 5  $\mu$ M de eFluor Dye 670 y se incubaron en baño de agua a 37°C durante 10 min. A continuación, las células se resuspendieron en dos volúmenes de SFB, se incubaron 5 min en hielo, se agregó PBS frío hasta completar un volumen final de 10 ml y se centrifugó a 600 g 5 min. Luego de otros dos lavados con PBS-SFB 10% las células se resuspendieron en RPMI completo, se contaron y utilizaron para los experimentos pertinentes.

## **11. ELISAS (ensayos inmunoenzimáticos de adsorción)**

Se determinó la concentración de las siguientes citoquinas humanas en sobrenadantes de cultivo mediante ELISA sándwich.

Con el objeto de evaluar la concentración de IFN- $\gamma$  se incubaron las placas de ELISA (NUNC o COSTAR de alto pegado) con el AcMo de captura anti-IFN- $\gamma$  (clon 2G1, Pierce) durante 16-18 h. Luego de dos lavados con PBS-0,05% Tween 20 (Buffer de lavado, BL) las placas se bloquearon durante 1 h con PBS-BSA 1%. Se realizaron dos lavados con BL y se incubaron durante 1 h con los sobrenadantes de cultivo o el estándar de IFN- $\gamma$  recombinante (eBioscience) para trazar la curva de calibración. A continuación, se agregó a cada pocillo el AcMo anti-IFN- $\gamma$  biotinilado (clon B133.5, Pierce) durante 1 h, se lavó dos veces con BL y se incubó durante 20 min con avidina marcada con HRP (Biolegend). Finalmente, se lavó nuevamente dos veces con BL y se reveló el ELISA como se describe al final de esta sección. Las muestras analizadas consistieron en sobrenadantes provenientes del cultivo de  $1 \times 10^5$  células NK aisladas por el método inmunomagnético en presencia o ausencia del estímulo con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 y en presencia de macrófagos M1 o M2 durante 24 h en placas de cultivo de 96 pocillos en fondo en "U".

Con el fin de evaluar la concentración de IL-10 e IL-12 en MC de macrófagos M1 o M2, se empleó un kit comercial (Human IL-10 y Human IL-12 (p70) ELISA MAX™ Standard, Biolegend) siguiendo las indicaciones del fabricante pero trabajando a razón de 50  $\mu$ l/pocillo

de las soluciones de Ac, 25 µl/pocillo de las muestras y estándar e incubando durante 16-18 h.

Para evaluar la concentración de IL-18 se siguió el protocolo descrito en [282] pero utilizando en todos los casos 50 µl/pocillo. Se empleó un AcMo antiIL-18 (5 µg/ml, clon 125-2H, MBL) como Ac de captura, placas NUNC o COSTAR, un AcMo anti-IL-18 biotinilado (0,5 µg/ml, clon 159-12B, MBL) y avidina marcada con HRP (Biolegend). La curva de calibración se realizó con IL-18 recombinante (MBL).

Para evaluar la concentración de IL-23 e IL-27 se emplearon kit comerciales (Human IL-23 DuoSet y Human IL-27 DuoSet, ambos de R&D) según las indicaciones del fabricante pero incubando durante 16-18 h y utilizando 50 µl/pocillo de las soluciones de AcMo. En el caso de IL-23 se sembraron 25 µl/pocillo de las muestras y estándar, mientras que para IL-27 se sembraron 50 µl/pocillo.

Para evaluar la concentración de TGF-β se empleó un kit comercial (TGF-β1 DuoSet de R&D) según las indicaciones del fabricante, pero sembrando 50 µl/pocillo de las muestras y utilizando 50 µl/pocillo de las soluciones de AcMo.

Las muestras analizadas en los ELISAS de IL-10, IL-12, IL-18, IL-23, IL-27 y TGF-β consistieron en sobrenadantes provenientes del cultivo de  $1 \times 10^5$  macrófagos M1 o M2 durante 24 h en placas de cultivo de 96 pocillos en fondo en "U" (detalles en sección "Obtención de MC de macrófagos humanos diferenciados *in vitro*").

En todos los ELISAS el revelado se realizó con una dilución de tetra-metil bencidina (TMB) en buffer citrato fosfato (pH=5) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se detuvo luego de 7-10 min con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se realizó la lectura en un lector de ELISA (Thermo) utilizando los filtro de 450 nm y de 550 nm.

## 12. Citometría de Flujo

### 12.1. Inmunomarcación de superficie

Todas las inmunomarcaciones se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en V, utilizando  $1 \times 10^5$ - $3 \times 10^6$  células/pocillo según el experimento. Las células se lavaron con PBS y luego, con el objetivo de bloquear uniones inespecíficas de los AcMo, se las incubó durante 15 min a temperatura ambiente (TA) con 20  $\mu$ l de suero normal de ratón o con 20  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo del hibridoma 2.4G2 para muestras de origen humano o murino, respectivamente. Posteriormente, se adicionaron 20  $\mu$ l de las correspondientes diluciones de AcMo conjugados a fluorocromos y se incubó durante 30 min a 4°C y oscuridad. Finalmente, las células se lavaron con 100  $\mu$ l de PBS, se centrifugaron a 600 g durante 5 min y luego de descartar el sobrenadante, se fijaron resuspendiendo el pellet en 100  $\mu$ l de PFA 1% y se mantuvieron refrigeradas hasta ser adquiridas en el citómetro. En algunos casos, las muestras fueron resuspendidas en PBS y adquiridas directamente en el citómetro sin fijar.

Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) o MACSQuant Analyzer 10 (Miltenyi Biotec). Los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (Tree Star, versión V10) y los resultados se expresaron en algunos casos como porcentajes de células positivas y en otros casos como intensidad media de fluorescencia (MFI) o intensidad media de fluorescencia relativa (rMFI). Los rMFI fueron calculados como el cociente entre el MFI de la muestra tratada con el AcMo específico y el MFI del control fluorescencia menos uno (FMO o *fluorescence minus one*).

### 12.2. Inmunomarcación intracitoplasmática

Con el objeto de analizar la expresión de IFN- $\gamma$ , T-bet, CD68, Pfp y granzima B en muestras humanas y la expresión de IFN- $\gamma$  y T-bet en muestras de ratón, se realizaron inmunomarcaciones intracitoplasmáticas a continuación de las inmunomarcaciones de superficie. Para ello, las células se permeabilizaron en placas de 96 pocillos con fondo en V según el protocolo provisto por el fabricante del kit para marcación de Foxp3 (BioLegend)

pero utilizando los AcMo contra las moléculas antes mencionadas. Brevemente, las células se fijaron agregando 100 µl de FOXP3 Fix/Perm durante 20 min a TA y oscuridad, se lavaron con 50 µl de PBS (centrifugando a 300 g durante 5 min) y se permeabilizaron utilizando 100 µl del reactivo FOXP3 Perm Buffer durante 15 min a TA y oscuridad. Se realizó otro lavado y las células se incubaron con los AcMo correspondientes durante 30 min a TA y oscuridad. Al término de la incubación, se realizó un lavado con PBS y una nueva fijación con el fin de preservar la marcación intracitoplasmática.

### **12.3. Medición de la producción de NO**

Para determinar la producción de NO, macrófagos M1 y M2 fueron cosechados y marcados con DHE 2,5 µM (Calbiochem). La marcación se realizó durante 30 min a 37°C, seguidamente las células se lavaron con PBS y adquirieron por CF inmediatamente sin fijar.

## **13. Análisis bioinformático**

Se realizó un análisis bioinformático de datos de RNAseq disponibles públicamente mediante el empleo de la herramienta en línea GEPIA (Análisis interactivo de perfiles de expresión génica, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>). Para el análisis se usaron los datos de RNA-Seq de KIRC (carcinoma renal de células claras) del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA).

## **14. Análisis estadístico**

Para comparar tres o más grupos experimentales se utilizó el test de análisis de la varianza (ANOVA o *analysis of variance*) de una vía y la prueba post hoc de Bonferroni, para

comparar dos grupos experimentales se utilizó un *t-test*, mientras que para el caso de los experimentos funcionales y de bloqueo o neutralización se utilizó un ANOVA de dos vías con medidas pareadas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni. Los datos se analizaron usando el software GraphPad Prism 6.0.

# Resultados

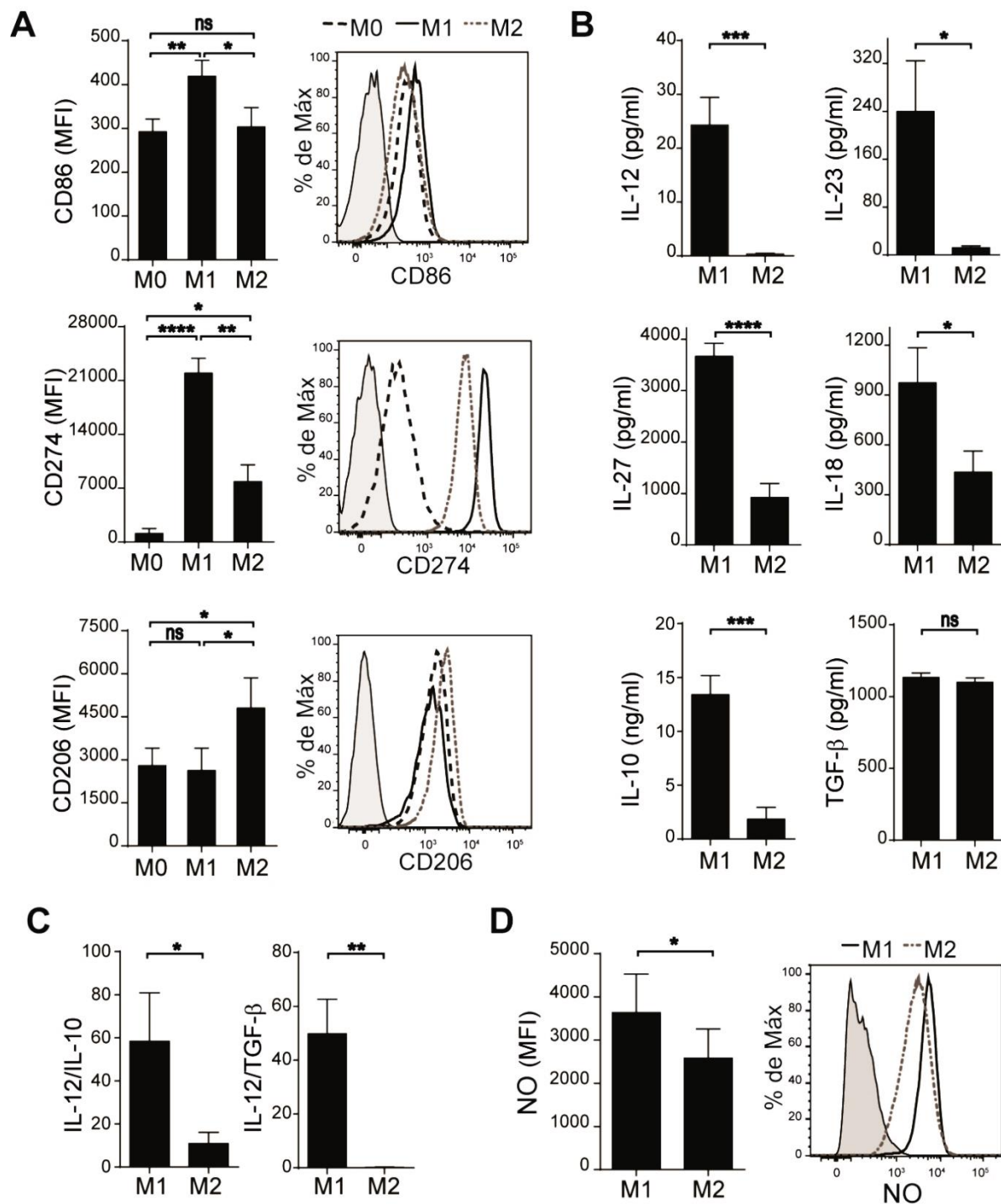
---

## 1. Efectos de los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* sobre el fenotipo y funciones efectoras de células NK humanas

### 1.1. Caracterización de macrófagos M1 y M2 humanos diferenciados *in vitro*

Con el objetivo de evaluar las consecuencias de la interacción entre los macrófagos M2 y las células NK humanas, en primer lugar, se obtuvieron macrófagos M0, M1 y M2 diferenciados *in vitro* como se detalló en Materiales y métodos. Posteriormente, se evaluó la polarización de los macrófagos mediante el análisis de la expresión de marcadores de superficie por CF y la secreción de citoquinas por ELISA. Como esperábamos, los macrófagos M1 presentaron mayor expresión de CD86 y CD274 respecto a los macrófagos M0 y M2, mientras que los macrófagos M2 exhibieron mayor expresión de CD206 (**Figura 5A**). A su vez, los macrófagos M1 secretaron cantidades mayores de las citoquinas IL-12, IL-23, IL-27, IL-18 e IL-10 y cantidades similares de TGF- $\beta$  que los M2 (**Figura 5B**). Además de evaluar las cantidades absolutas de estas citoquinas, se evaluó la proporción de citoquinas proinflamatorias respecto a las antiinflamatorias en cada condición y observamos que la relación de secreción de IL-12 respecto a IL-10 y de IL-12 respecto a TGF- $\beta$  fue significativamente mayor en los macrófagos M1 respecto a los M2 (**Figura 5C**). Finalmente, como esperábamos, la producción de NO en macrófagos M2 fue menor respecto a la de los M1 (**Figura 5D**).

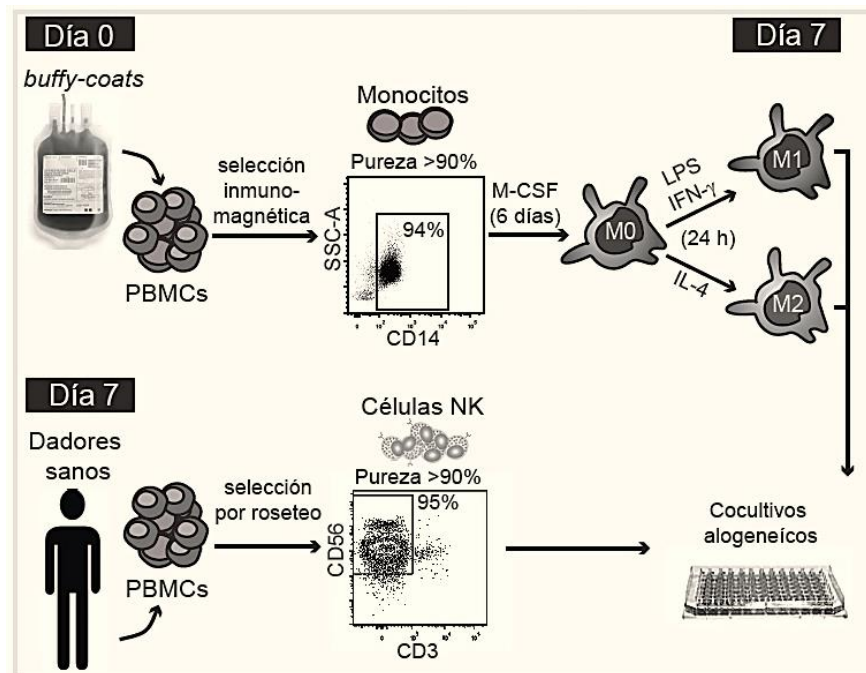




**Figura 5. Los macrófagos M1 y M2 diferenciados *in vitro* presentan diferente patrón fenotípico y de secreción de citoquinas. A)** Expresión de CD86, CD274 y CD206 (izquierda,  $n=9$ ) e histogramas representativos de macrófagos de un dador sano (derecha). **B)** Producción de IL-12, IL-23, IL-27, IL-18, IL-10 y TGF- $\beta$  por macrófagos M1 y M2.  $n=16$ ,  $n=13$ ,  $n=9$ ,  $n=7$ ,  $n=19$ ,  $n=15$ , respectivamente. **C)** Relación de secreción de IL-12 respecto a IL-10 ( $n=14$ ) e IL-12 respecto a TGF- $\beta$  ( $n=14$ ). **D)** Producción de NO por macrófagos M1 y M2 medida por CF (izquierda,  $n=7$ ) e histograma representativo de macrófagos de un dador sano (derecha). Se grafican las medias  $\pm$  Error estándar de la media (SEM o *Standard error of the mean*). Se realizó un ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni en panel A y un test *t* pareado en paneles B, C y D. ns, no significativo; \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ ; \*\*\*\*,  $p<0.0001$ .

## 1.2. Efecto de los macrófagos M2 sobre la activación de células NK

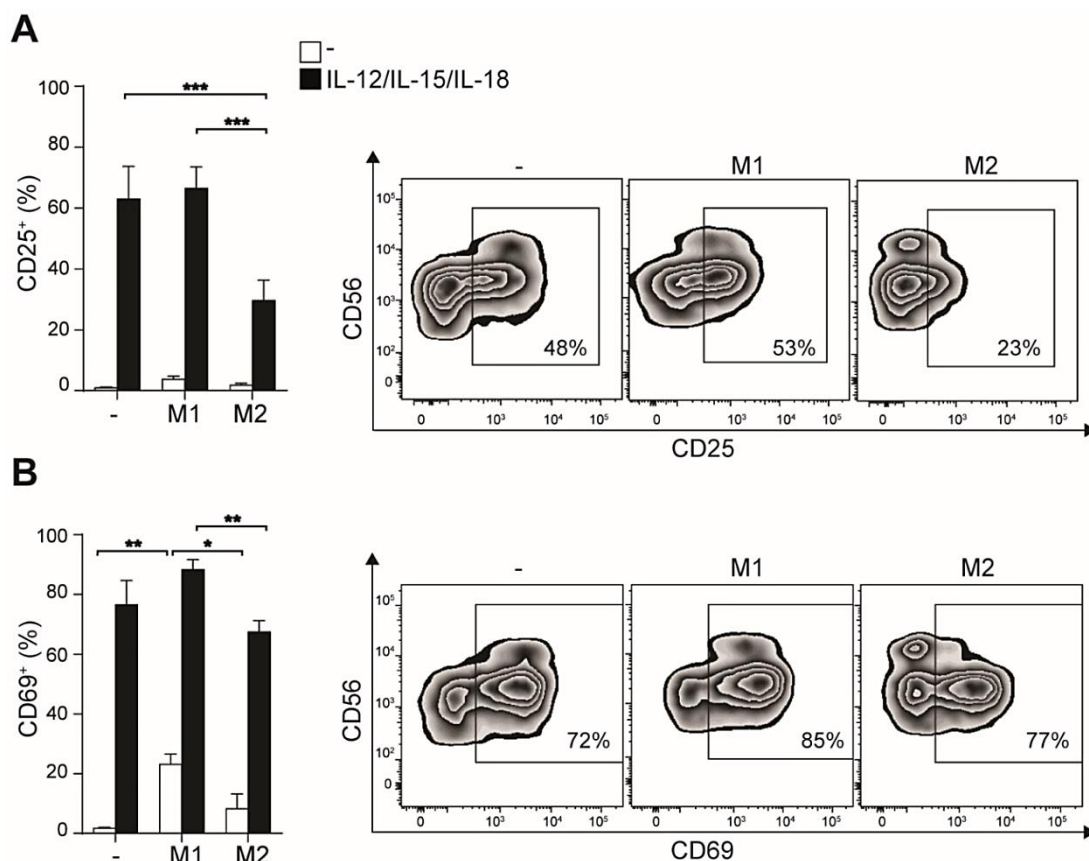
Con el objeto de investigar el efecto de los macrófagos M2 sobre la activación de las células NK, se realizaron cocultivos heterólogos entre macrófagos diferenciados *in vitro* y células NK aisladas de sangre periférica de donadores sanos, siguiendo el protocolo que se esquematiza en la **Figura 6**.



**Figura 6. Esquema del protocolo utilizado para establecer los cocultivos entre células NK y macrófagos M1 y M2.** Monocitos aislados de *buffy-coats* de donantes sanos se diferenciaron a macrófagos M0 mediante el cultivo con M-CSF durante 6 días. Luego los macrófagos M0 se expusieron por 24 h a LPS e IFN- $\gamma$  o a IL-4 para obtener macrófagos M1 y M2, respectivamente. Se lavaron exhaustivamente y se cocultivaron con células NK aisladas de sangre periférica de donadores sanos a una relación 1:1. En todos los casos la pureza de las células aisladas se evaluó por CF y fue mayor al 90%.

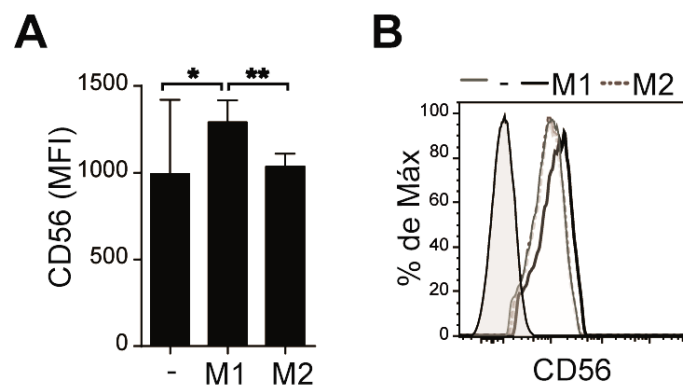
Las células NK aisladas fueron estimuladas con las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-15 e IL-18 durante 24 h, en presencia o ausencia de macrófagos M1 y M2 y posteriormente, se evaluó por CF la expresión de los marcadores CD25 y CD69, que en estas condiciones se asocian al estado de activación de las células NK (**Figura 7**). Como era de esperar, en estado de reposo (barras blancas) y ausencia de macrófagos, las células NK no expresaron CD25 ni CD69. A su vez, aunque el cocultivo de células NK en reposo con

macrófagos M1 o M2 no indujo un aumento en la expresión de CD25 (**Figura 7A**), el cocultivo con macrófagos M1 sí indujo un aumento estadísticamente significativo del porcentaje de células NK que expresaron CD69 y este incremento no se observó en las células NK en reposo cocultivadas con macrófagos M2 (**Figura 7B**). Por otro lado, al analizar las células NK estimuladas con citoquinas (barras negras), como esperábamos, en todas las condiciones el estímulo indujo un incremento significativo en el porcentaje de células NK que expresaron CD25 y CD69 respecto a las células NK sin estimular (barras blancas). Sin embargo, la expresión de ambos marcadores de activación fue menor en presencia de macrófagos M2 respecto a células NK cocultivadas con M1 o cultivadas en ausencia de macrófagos. (**Figura 7A y B**).



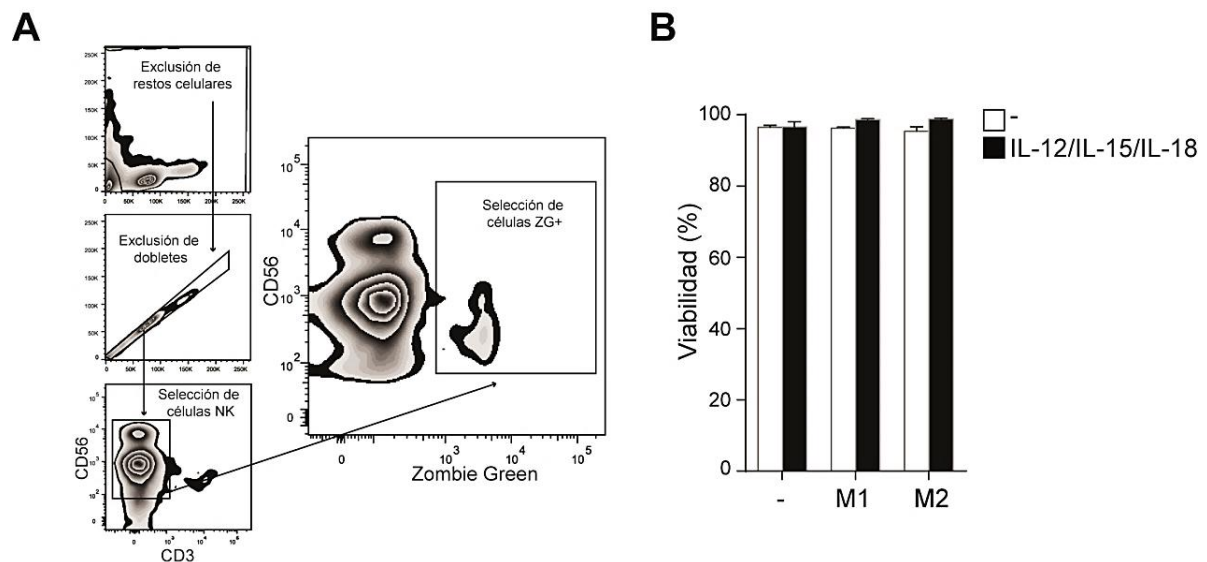
**Figura 7. Los macrófagos M2 reprimen la expresión de CD25 y CD69 en células NK estimuladas con citoquinas.** Porcentaje de células NK que expresaron CD25 (**A**) y CD69 (**B**) luego de 24 h de incubación en ausencia (barras blancas) o presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras), y en ausencia (-) o en presencia de macrófagos M1 o M2. Se muestran los gráficos de tipo *zebra plot* representativos correspondientes a las células NK de un dador sano. En A y B se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni,  $n=6$ . Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

Dado que las células NK CD56<sup>dim</sup> activadas con citoquinas *in vitro* pueden adoptar un fenotipo similar a las células NK CD56<sup>bright</sup> debido a que experimentan un aumento en la expresión de CD56, se evaluó si la expresión de CD56 también se encontraba afectada en células NK estimuladas en presencia de macrófagos M2. Observamos que efectivamente, en concordancia con la menor expresión de CD25 y CD69, las células NK CD56<sup>dim</sup> estimuladas con las citoquinas mencionadas en presencia de macrófagos M2, presentaron menor expresión de CD56 respecto a las células NK estimuladas en presencia de macrófagos M1, confirmando que los macrófagos M2 reprimen la activación de células NK en respuesta a citoquinas proinflamatorias (**Figura 8**).



**Figura 8. Los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* regulan negativamente la expresión de CD56 en células NK CD56<sup>dim</sup>.** **A)** Expresión de CD56 en células NK CD56<sup>dim</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2.  $n=8$ . Se realizó un ANOVA de una vía con prueba post hoc de Bonferroni. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ . **B)** Histograma representativo de células de un dador sano.

A su vez, se evaluó la viabilidad de las células NK luego del cocultivo con macrófagos M1 y M2 utilizando Zombie Green por CF. En todos los casos la muerte celular fue menor al 10 % y no existieron diferencias estadísticamente significativas en la viabilidad de las células NK en reposo o luego del estímulo con IL-12, IL-15 e IL-18 en presencia de macrófagos M1 y M2 (**Figura 9**). Consecuentemente, la diferente respuesta de las células NK a su contacto con macrófagos M1 o M2 no puede asociarse a la muerte celular diferencial inducida por una determinada población de macrófagos.

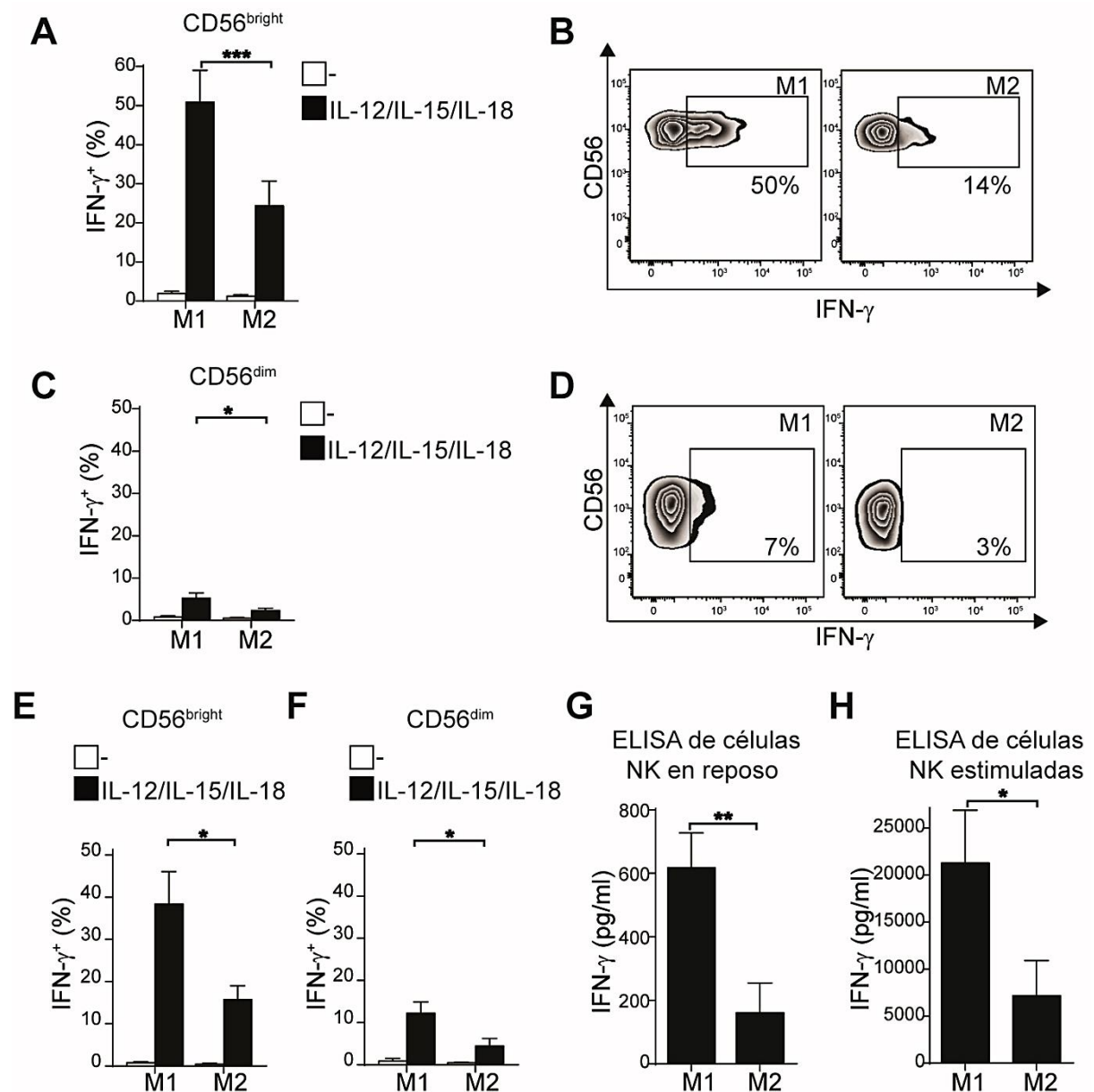


**Figura 9. Los macrófagos M1 y M2 no alteran la viabilidad de las células NK. A)** Estrategia empleada para evaluar viabilidad de las células NK. **B)** Porcentaje de células NK viables luego del cultivo en ausencia (-) o presencia de macrófagos M1, M2 y condiciones de reposo (barras blancas) o estímulo con IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras). Se muestran las células viables: CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>Zombie Green<sup>bajo</sup>. Se grafican las medias  $\pm$  SEM.  $n=4$ .

### 1.3. Efecto de los macrófagos M2 sobre la producción de IFN- $\gamma$ por células NK

Con la intención de evaluar el efecto de los macrófagos sobre la funcionalidad de las células NK, se evaluó en primer lugar el porcentaje de células NK productoras de IFN- $\gamma$ . Para esto, células NK aisladas de sangre periférica de donadores sanos fueron estimuladas con las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-15, IL-18 durante 24 h, en presencia o ausencia de macrófagos M1 y M2 y luego se analizó el porcentaje de células productoras de IFN- $\gamma$  por CF. Observamos que el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> fue menor en las células NK cocultivadas con macrófagos M2 respecto al cocultivo con macrófagos M1 (**Figura 10A y B**). Un efecto similar se observó en las células NK CD56<sup>dim</sup>, pero como se mencionó en la introducción, el porcentaje de células NK que producen IFN- $\gamma$  dentro de esta población es mucho menor que en la población de células NK CD56<sup>bright</sup> (**Figura 10C y D**). Estos resultados fueron validados utilizando combinaciones autólogas de células NK y macrófagos (**Figura 10E y F**). Para ello, se aislaron monocitos y células NK del mismo donador sano, se criopreservaron las células NK durante una semana hasta que se completó la diferenciación y polarización de

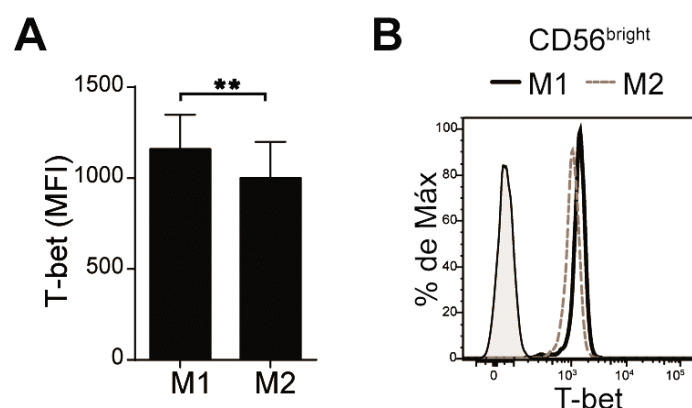
los macrófagos y luego se realizaron los cocultivos correspondientes. En estos casos, la respuesta de las células NK fue similar a la observada mediante el empleo de combinaciones heterólogas de células NK y macrófagos, por lo que por razones de practicidad, los experimentos posteriores se realizaron utilizando cocultivos heterólogos de macrófagos y células NK. Finalmente, el efecto de los macrófagos M2 sobre la producción de IFN- $\gamma$  por células NK fue confirmado por ELISA analizando sobrenadantes de los cocultivos realizados entre células NK en reposo o estimuladas con citoquinas y macrófagos M1 y M2 (Figura 10G y H).





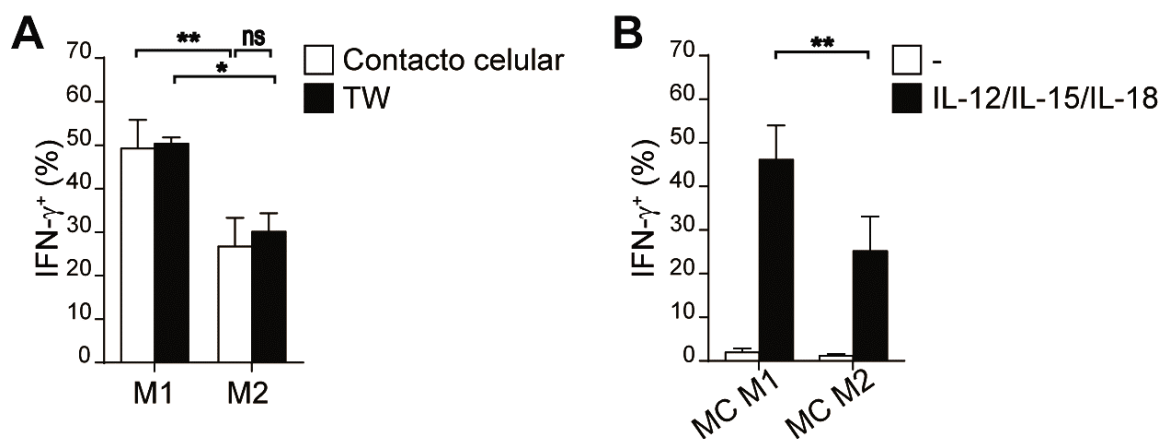
**Figura 10. Los macrófagos M2 inducen una menor producción de IFN- $\gamma$  en células NK CD56<sup>bright</sup> y CD56<sup>dim</sup> estimuladas con citoquinas respecto a los M1.** **A)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 heterólogos en ausencia (barras blancas) o presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras).  $n=6$ . **B)** Gráfico de tipo *zebra plot* representativo de las células de un dador sano. **C)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup> productoras de IFN- $\gamma$  luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 heterólogos en ausencia (barras blancas) o presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras).  $n=6$ . **D)** Gráfico de tipo *zebra plot* representativo de las células de un dador sano. **E y F)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> (**E**) o CD56<sup>dim</sup> (**F**) productoras de IFN- $\gamma$  luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 autólogos en ausencia (barras blancas) o presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras).  $n=4$ . **G)** Producción de IFN- $\gamma$  por células NK en reposo luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 heterólogos, medida por ELISA.  $n=8$ . **H)** Producción de IFN- $\gamma$  por células NK estimuladas con IL-12, IL-15 e IL-18 luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 heterólogos, medida por ELISA.  $n=8$ . En **A**, **C**, **E** y **F** se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni. En **G** y **H** se realizó una prueba *t* pareada. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

Dado que T-bet es un factor de transcripción crítico que regula la producción de IFN- $\gamma$  en LT y células NK, se evaluó si los macrófagos M2 afectaban su expresión en las células NK. La exposición de células NK a macrófagos M2 no modificó la expresión de T-bet en células NK en reposo respecto a las cocultivadas con macrófagos M1 (datos no mostrados). Sin embargo, luego del estímulo con citoquinas, las células NK CD56<sup>bright</sup> cocultivadas con macrófagos M2 presentaron menor expresión de T-bet respecto a células NK cocultivadas con macrófagos M1, sugiriendo que dicha reducción podría estar implicada en la menor producción de IFN- $\gamma$  de estas células (**Figura 11A y B**).



**Figura 11. Los macrófagos M2 inhiben la inducción de la expresión de T-bet en células NK CD56<sup>bright</sup> estimuladas con citoquinas.** **A)** Expresión de T-bet en células NK CD56<sup>bright</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2 en presencia de IL-12, IL-15 e IL-18.  $n=8$ . Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*\*,  $p<0.01$ . **B)** Histogramas representativos de células de un dador sano.

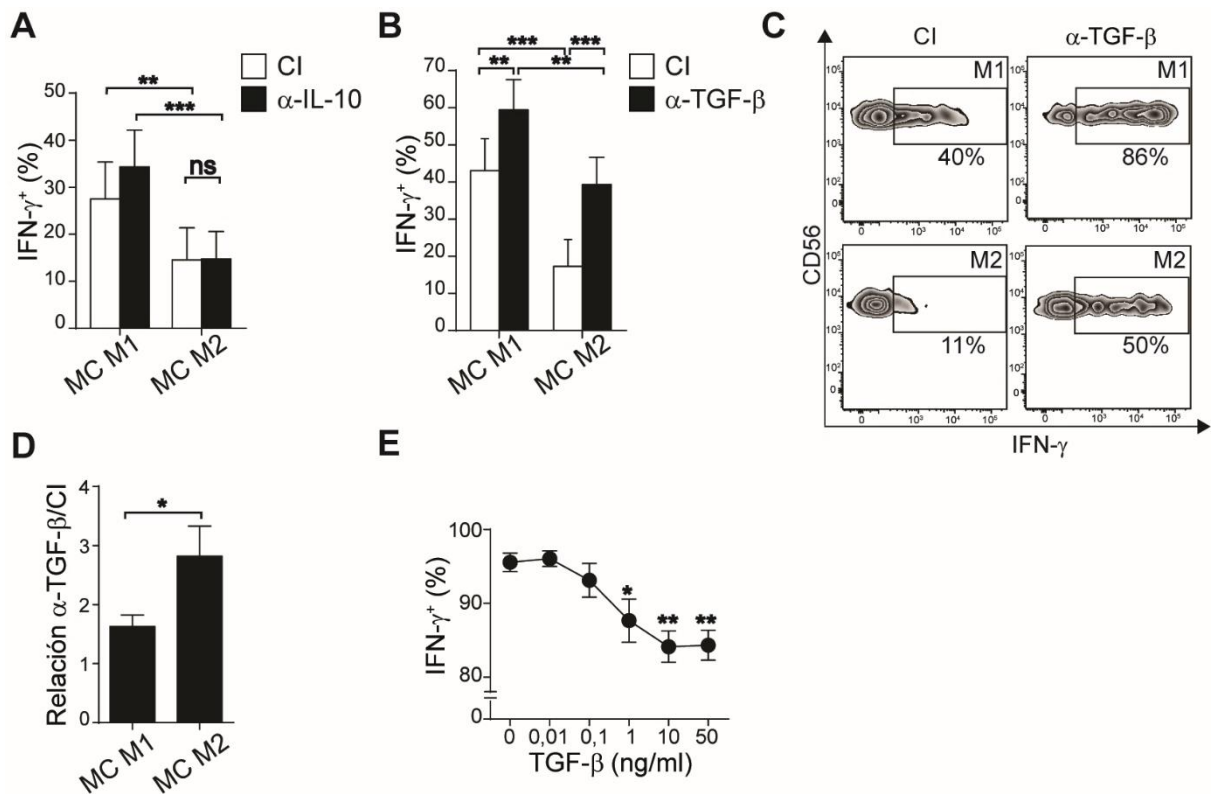
Con el objetivo de ahondar en los mecanismos subyacentes a la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup> inducida por los macrófagos M2, se repitieron los ensayos descritos, pero utilizando dispositivos *transwell* de manera de impedir el contacto macrófago-célula NK. Las células NK se recuperaron luego de 24 h de cocultivo y se evaluó la producción de IFN- $\gamma$  por CF de la misma manera que en los experimentos anteriores. Observamos que la inhibición ejercida por los macrófagos M2 sobre la producción de IFN- $\gamma$  en células NK activadas con citoquinas no requería del contacto entre ambas células (**Figura 12A**) sino que era mediado por factores solubles secretados por los macrófagos M2. Estos resultados fueron confirmados empleando medios condicionados (MC) de macrófagos, donde observamos que la exposición de las células NK a MC de macrófagos M2 fue suficiente para inhibir la producción de IFN- $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup> en respuesta a citoquinas (**Figura 12B**).



**Figura 12. Los macrófagos M2 inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por células NK a través de un mecanismo dependiente de factores solubles. A)** Porcentaje de células CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18 y el cocultivo con macrófagos M1 y M2 en presencia de contacto celular (barras blancas) o cuando las células fueron separadas en dispositivos *transwell* (barras negras).  $n=6$ . **B)** Porcentaje de células CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en presencia de los medios condicionados de macrófagos M1 o M2 (MC M1 o MC M2, respectivamente) y en ausencia (barras blancas) o presencia de IL-12, IL-15 e IL-18 (barras negras).  $n=8$ . Se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .



Como se mencionó en la introducción, dado que los macrófagos M2 producen principalmente las citoquinas antiinflamatorias IL-10 y TGF- $\beta$ , nos orientamos al bloqueo de ambas citoquinas. La neutralización de IL-10 en los MC de macrófagos M2 utilizando un AcMo bloqueante no revirtió la inhibición ejercida por los macrófagos M2 sobre la producción de IFN- $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup> estimuladas con citoquinas (**Figura 13A**), mientras que la neutralización de TGF- $\beta$  en los MC de macrófagos M2 sí resultó en un aumento significativo del porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**Figura 13B y C**). La neutralización de TGF- $\beta$  en los MC de macrófagos M1 también indujo un mayor porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  respecto a la condición control (incubación con el AcMo CI), sugiriendo que el TGF- $\beta$  también ejerce una regulación negativa en la producción de IFN- $\gamma$  de células NK CD56<sup>bright</sup> expuestas a macrófagos proinflamatorios. Sin embargo, es necesario destacar que la neutralización de TGF- $\beta$  en los MC de macrófagos M2 condujo a una mayor recuperación en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  respecto a la neutralización en los MC de macrófagos M1 (**Figura 13D**). Asimismo, la estimulación de células NK con citoquinas en presencia de concentraciones crecientes de TGF- $\beta$  recombinante mostró una reducción dosis-dependiente en el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  (**Figura 13E**). En este ensayo se utilizaron concentraciones de TGF- $\beta$  recombinante en rangos similares a las detectadas por ELISA en los sobrenadantes de los macrófagos M2. Estos resultados confirmaron el rol supresor del TGF- $\beta$  en la producción de IFN- $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup>.

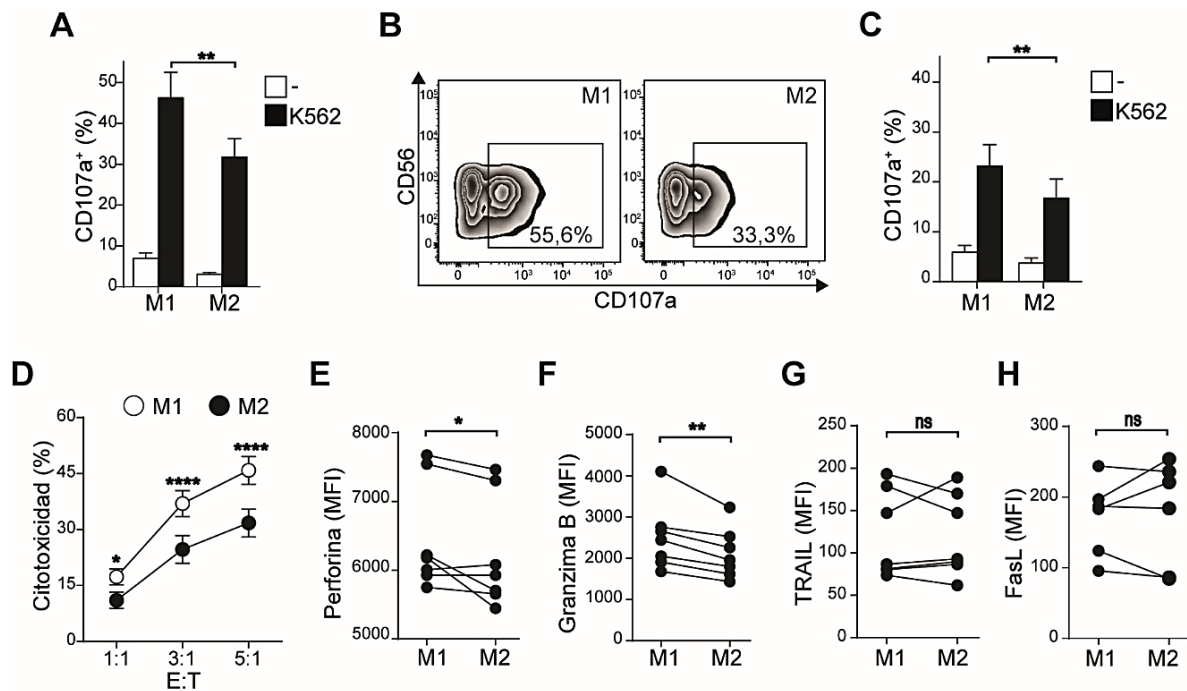


**Figura 13. El TGF- $\beta$  secretado por los macrófagos M2 inhibe la producción de IFN- $\gamma$  en células NK CD56<sup>bright</sup>.** **A)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18 y el cultivo con MC de macrófagos M1 (MC M1) y M2 (MC M2) en presencia de un AcMo CI (barras blancas) o un AcMo neutralizante de IL-10 (barras negras).  $n=5$ . **B)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  luego de la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18 y el cultivo con MC de macrófagos M1 (MC M1) y M2 (MC M2) en presencia de un AcMo CI (barras blancas) o un AcMo neutralizante de TGF- $\beta$  (barras negras).  $n=7$ . **C)** Gráficos de tipo *Zebra plot* representativos de las células de un dador sano. **D)** Relación entre el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> IFN- $\gamma$ + en presencia de un AcMo neutralizante de TGF- $\beta$  y el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> IFN- $\gamma$ + en presencia del AcMo CI para células NK estimuladas con citoquinas y cultivadas con MC M1 o MC M2.  $n=6$ . **E)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> IFN- $\gamma$ + cultivadas en presencia del estímulo de IL-12, IL-15 e IL-18 y concentraciones crecientes de TGF- $\beta$  recombinante.  $n=6$ . En **A** y **B** se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni, mientras que en **D** y **E** se realizó una prueba *t* pareada. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

Estos resultados sugieren que los macrófagos M2 inhiben la producción de IFN- $\gamma$  en células NK activadas con citoquinas a través de un mecanismo fuertemente dependiente de factores solubles y que involucra al TGF- $\beta$  pero no IL-10.

#### 1.4. Efecto de los macrófagos M2 sobre la citotoxicidad de células NK contra las células blanco K562

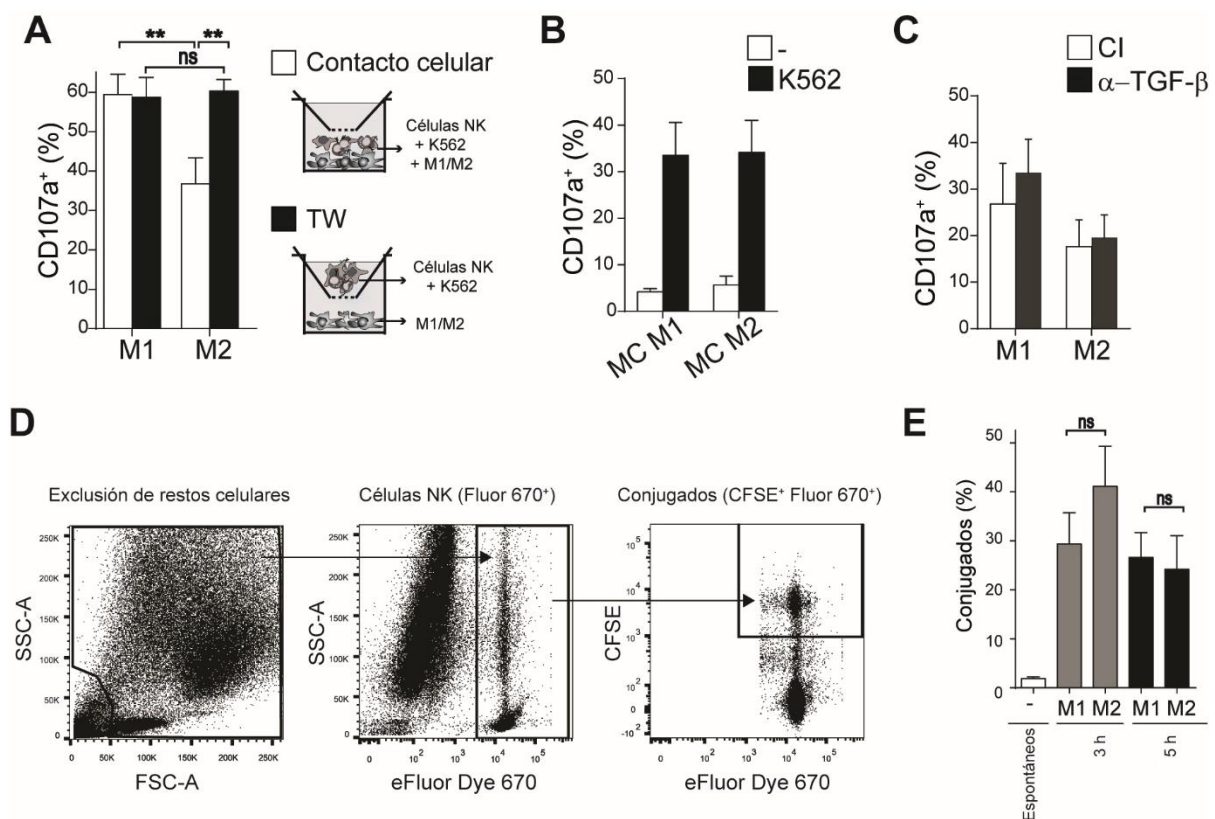
A continuación, se exploró si los macrófagos M2 también eran capaces de afectar el potencial citotóxico de las células NK CD56<sup>dim</sup>. Para esto, células NK aisladas de sangre periférica de dadores sanos fueron cocultivadas con macrófagos M1 o M2 por 24 h, y durante las últimas 5 h del cocultivo se expuso a las células NK a las células blanco K562 y se analizó la degranulación (expresión en superficie celular de CD107a) en la población CD56<sup>dim</sup> por CF. Observamos que los macrófagos M2 indujeron una degranulación de las células NK CD56<sup>dim</sup> contra las células K562 significativamente menor a la inducida por los macrófagos M1 (**Figura 14A y B**). Nuevamente, se validaron los experimentos realizados con células heterólogas empleando cultivos autólogos de células NK y macrófagos, obteniéndose resultados similares (**Figura 14C**). Además, se validó el ensayo de degranulación evaluando la citotoxicidad de las células NK expuestas a los macrófagos contra células K562. Observamos que la respuesta citotóxica de las células NK fue dependiente de la relación E:B en cada condición ensayada y que la presencia de macrófagos M2 generó una menor actividad citotóxica por parte de las células NK que cuando éstas fueron expuestas a macrófagos M1. Este efecto fue independiente de la relación célula efectora: célula blanco (E:B), dado que en todas las relaciones E:B evaluadas, los macrófagos M2 generaron una menor actividad citotóxica de las células NK que los M1 (**Figura 14D**). Asimismo, la menor actividad citotóxica estuvo asociada a un menor contenido de Pfp y granzima B en células NK expuestas a macrófagos M2 respecto a células NK expuestas a macrófagos M1 (**Figura 14E y F**). Sin embargo, la expresión de los mediadores citotóxicos TRAIL y CD178 en células NK CD56<sup>dim</sup> no se vio afectada por los macrófagos M2 (**Figura 14G y H**). Estos resultados confirman que los macrófagos M2 regulan negativamente la actividad citotóxica de las células NK CD56<sup>dim</sup>.



**Figura 14. Los macrófagos M2 regulan negativamente la actividad citotóxica y la expresión de Pfp y granzima B de células NK CD56<sup>dim</sup>.** **A)** Porcentaje de células CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 y M2 heterólogos en ausencia (barras blancas) o presencia de las células blanco K562 (barras negras).  $n=8$ . **B)** Se muestran los gráficos de tipo *zebra plot* representativos de las células de un dador sano. **C)** Porcentaje de células CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 y M2 autólogos en ausencia (barras blancas) o presencia de las células blanco K562 (barras negras).  $n=6$ . Relación E:B (paneles **A-C**), 1:1. **D)** Citotoxicidad de células NK contra las células blanco K562 a diferentes relaciones E:B en presencia de macrófagos M1 (puntos blancos) o M2 (puntos negros).  $n=6$ . **E-H)** Expresión de Pfp (**E**,  $n=7$ ), granzima B (**F**,  $n=7$ ), TRAIL (**G**,  $n=7$ ) y FasL (**H**,  $n=6$ ) en células NK CD56<sup>dim</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 y M2 heterólogos. En **A**, **C** y **D** se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. En **E-H** se realizó un test *t* pareado y se grafican los valores individuales para cada dador. ns, no significativo; \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*\*,  $p<0.0001$ .

Con el objetivo de elucidar los mecanismos subyacentes implicados en la supresión de la actividad citotóxica de las células NK CD56<sup>dim</sup>, se evaluó su degranulación en respuesta a células K562 pero impidiendo el contacto macrófago-célula NK mediante el empleo de dispositivos *transwell*. Observamos que la separación física de ambas células eliminó completamente el efecto inhibitorio de los macrófagos M2 ya que en estas condiciones se obtuvieron porcentajes de células NK CD107a<sup>+</sup> similares tanto en el cultivo en presencia de macrófagos M1 como de macrófagos M2 (**Figura 15A**). Por lo tanto, el mecanismo inhibitorio de los macrófagos M2 sobre la citotoxicidad de las células NK fue dependiente

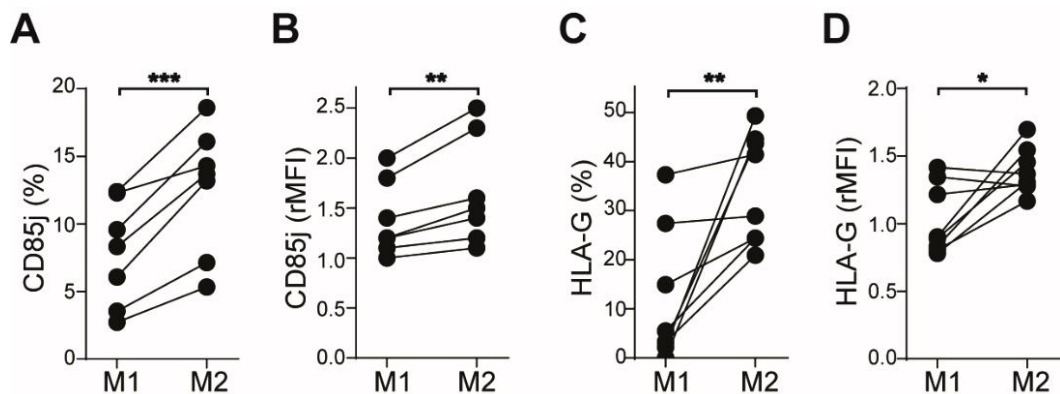
exclusivamente del contacto celular y en concordancia con estos resultados, la exposición de las células NK a MC de los macrófagos M2 no afectó la degranulación de las células NK (**Figura 15B**). Además, experimentos de bloqueo con un AcMo anti-TGF- $\beta$  durante el cocultivo de células NK con los macrófagos M1 o M2 descartaron la posibilidad de que la forma de TGF- $\beta$  de membrana celular esté involucrada en la inhibición de la citotoxicidad por parte de los macrófagos M2 (**Figura 15C**). Finalmente, se evaluó si la menor degranulación de las células NK en presencia de macrófagos M2 se debía a una menor capacidad de las células NK de formar conjugados con las células blanco. Para esto, se realizaron cocultivos de células NK (marcadas con eFluor Dye 670) y células K562 (marcadas con CFSE) en presencia de macrófagos M1 o M2, y se evaluaron por CF el porcentaje de eventos doble positivos: eFluor Dye 670<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> luego de 3 y 5 h de cocultivo (**Figura 15D**). No se observaron diferencias significativas entre la cantidad de conjugados célula efectora-célula blanco formados en presencia de macrófagos M1 o M2 (**Figura 15E**), sugiriendo que en presencia de macrófagos M1 o M2 se forman igual número de sinapsis inmunológicas entre las células NK y las células blanco, aunque las mismas tienen diferentes consecuencias funcionales.



**Figura 15. La inhibición de la citotoxicidad por macrófagos M2 es dependiente del contacto celular y no involucra TGF- $\beta$  de membrana ni una disminución en la formación de conjugados célula NK-célula K562.** **A)** Porcentaje de células CD56<sup>dim</sup> CD107a<sup>+</sup> luego del cocultivo con las células blanco K562 y macrófagos M1 o M2 heterólogos en presencia de contacto célula-célula (barras blancas) o cuando las células NK se separaron de los macrófagos mediante dispositivos *transwell* (TW, barras negras). El diseño experimental se representa a la derecha del gráfico.  $n=4$ . **B)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> cultivadas en ausencia (barras blancas) o presencia de células blanco K562 (barras negras) y los MC de macrófagos M1 o M2.  $n=4$ . **C)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> luego del cocultivo con las células blanco K562, macrófagos M1 o M2 y un AcMo CI (barras blancas) o un AcMo bloqueante de TGF- $\beta$  (barras negras).  $n=4$ . **D)** Esquema del método empleado para la evaluación de conjugados célula NK-célula K562. **E)** Porcentaje de conjugados formados espontáneamente (se realiza la mezcla entre células NK y células K562 justo antes de adquirir en el CF) o luego del cocultivo durante 3 o 5 h entre células NK y células K562 en presencia de macrófagos M1 y M2.  $n=5$ . En **A**, **B** y **C** se realizó un ANOVA de dos vías con mediciones repetidas en ambos factores, mientras que **A** se realizó un ANOVA de una vía para cada tiempo (3 y 5 h) y una prueba post hoc de Bonferroni en cada caso. Se grafican las medias  $\pm$  SEM. \*\*,  $p<0.01$ .

Como se mencionó en la introducción, la respuesta funcional de las células NK depende de la integración del conjunto de señales activadoras o inhibitorias que reciben a través de los receptores expresados en su membrana. Por este motivo, se evaluó si los macrófagos M2 eran capaces de modular el repertorio de expresión de receptores de las células NK. Se realizó una caracterización fenotípica de las células NK por CF luego del cocultivo con macrófagos M1 y M2, partiendo de la hipótesis de que la capacidad citotóxica reducida de las células NK en presencia de macrófagos M2 estaría asociada a una menor expresión de receptores activadores y/o a una mayor expresión de receptores inhibitorios.

En particular, nos centramos en los receptores activadores NCR, NKG2D y DNAM-1, que se consideran los principales receptores implicados en el reconocimiento de ligandos tumorales. Luego del cocultivo con macrófagos M2, no detectamos disminución en la expresión de los receptores activadores CD226 (DNAM-1), CD335 (NKp46), CD337 (NKp30), CD314 (NKG2D), NKp80 (KLRF1) y NKG2C, ni aumento en la expresión de los receptores inhibitorios NKG2A y TIGIT en las células NK (datos no mostrados). Sin embargo, observamos que luego del cultivo con macrófagos M2, un mayor porcentaje de células NK expresaron el receptor inhibitorio CD85j (ILT-2) y que la expresión de este receptor estaba incrementada en estas células NK comparadas con las células NK cocultivadas con macrófagos M1 (**Figura 16A y B**). Además, detectamos que la expresión de HLA-G, uno de los ligandos principales del receptor CD85j, fue mayor en macrófagos M2 respecto a macrófagos M1 (**Figura 16C y D**).



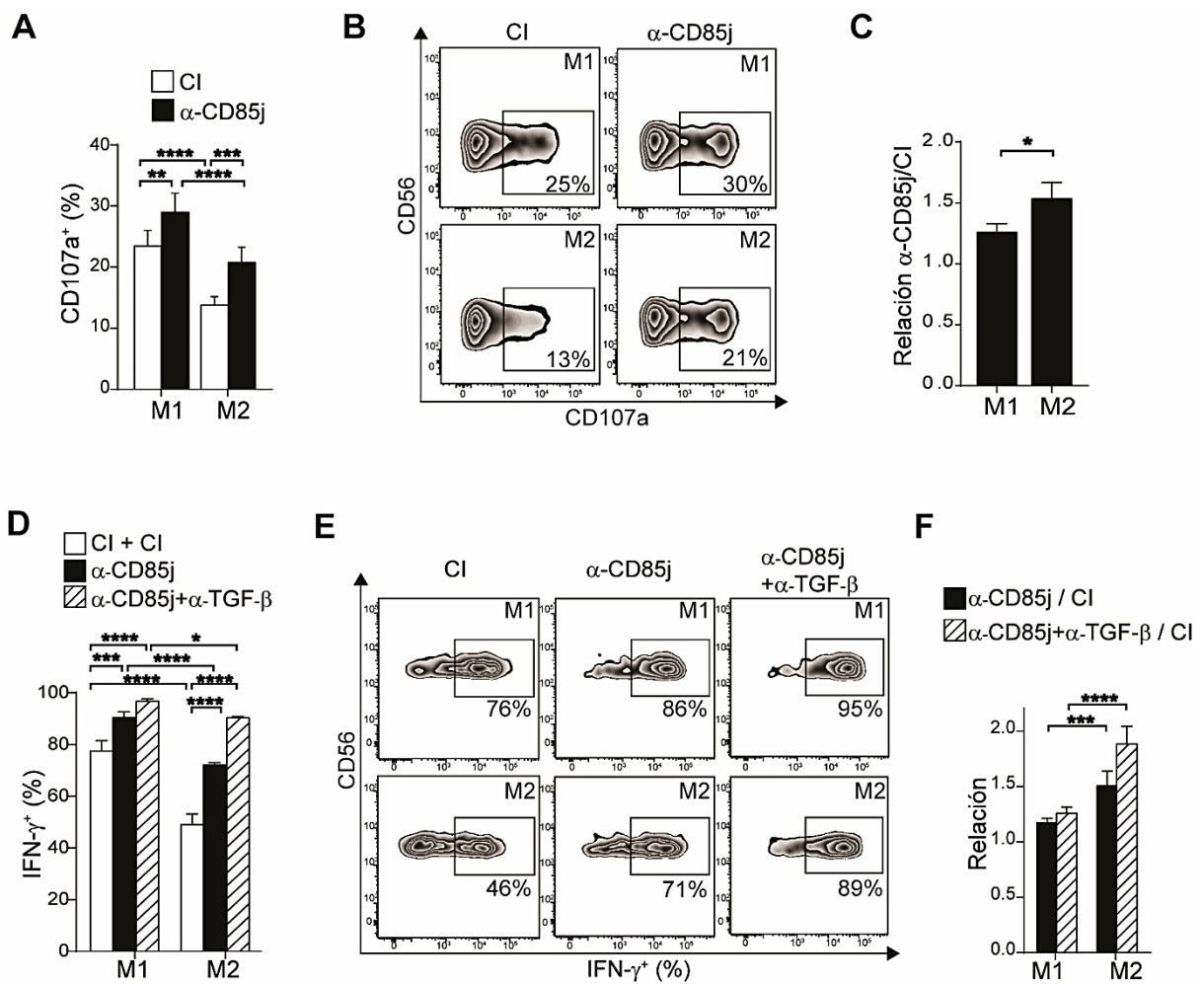
**Figura 16.** Los macrófagos M2 inducen un aumento en la expresión del receptor CD85j (ILT-2) en células NK y sobreexpresan su ligando principal HLA-G. **A)** Porcentaje (izquierda) y rMFI (derecha) de células NK CD85j<sup>+</sup> luego del cocultivo con macrófagos M1 o M2,  $n=7$ . **B)** Porcentaje (izquierda) y rMFI (derecha) de macrófagos M1 y M2 HLA-G<sup>+</sup>,  $n=8$ . En todos los casos se realizó una prueba *t* pareada. Se grafican valores individuales para cada dador. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

Seguidamente, se evaluó si la mayor expresión del receptor CD85j por células NK y su ligando HLA-G en macrófagos M2 contribuía al efecto supresor de los macrófagos M2 sobre la degranulación de células NK CD56<sup>dim</sup>. El bloqueo de este receptor mediante el empleo de un AcMo anti-CD85j durante los cocultivos de las células NK con los macrófagos M1 y M2 resultó en la recuperación parcial del porcentaje de células CD56<sup>dim</sup> capaces de degranular contra las células blanco K562 (**Figura 17A y B**). A su vez, el bloqueo de CD85j durante el cocultivo con M2 condujo a una recuperación significativamente mayor en el porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> en comparación con el bloqueo durante el cocultivo con macrófagos M1 (**Figura 17C**). Con el objeto de investigar si CD85j estaba también involucrado en la supresión de la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK expuestas a macrófagos M2, se analizó el efecto del bloqueo de CD85j sobre la producción de IFN- $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup> bloqueando o no simultáneamente TGF- $\beta$ . En concordancia con los resultados mencionados anteriormente, el bloqueo en conjunto con TGF- $\beta$  fue el mayor responsable de la recuperación en la frecuencia de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$ ; sin embargo, el bloqueo de CD85j resultó también en un mayor porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (**Figura 17D y E**). A su vez, el bloqueo de CD85j durante el cocultivo de las células NK con macrófagos M2 condujo a una recuperación significativamente mayor en el

porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$  en comparación con su bloqueo durante el cocultivo con macrófagos M1 (**Figura 17F**). Finalmente, dado que se conoce la expresión del receptor CD85j en células mieloides [283], se analizó el efecto del bloqueo de CD85j exclusivamente en los macrófagos M1 o M2 sobre la producción de degranulación de células NK CD56<sup>dim</sup>. Para ello, se trataron los macrófagos con el AcMo anti-CD85j o su correspondiente CI, y se lavaron las células antes de realizar el cocultivo con las células NK. Sin embargo, no detectamos recuperación en la degranulación de las células NK, confirmando que el efecto inhibitorio que involucra CD85j fue mediado por el receptor expresado por las células NK y no por los macrófagos (datos no mostrados).

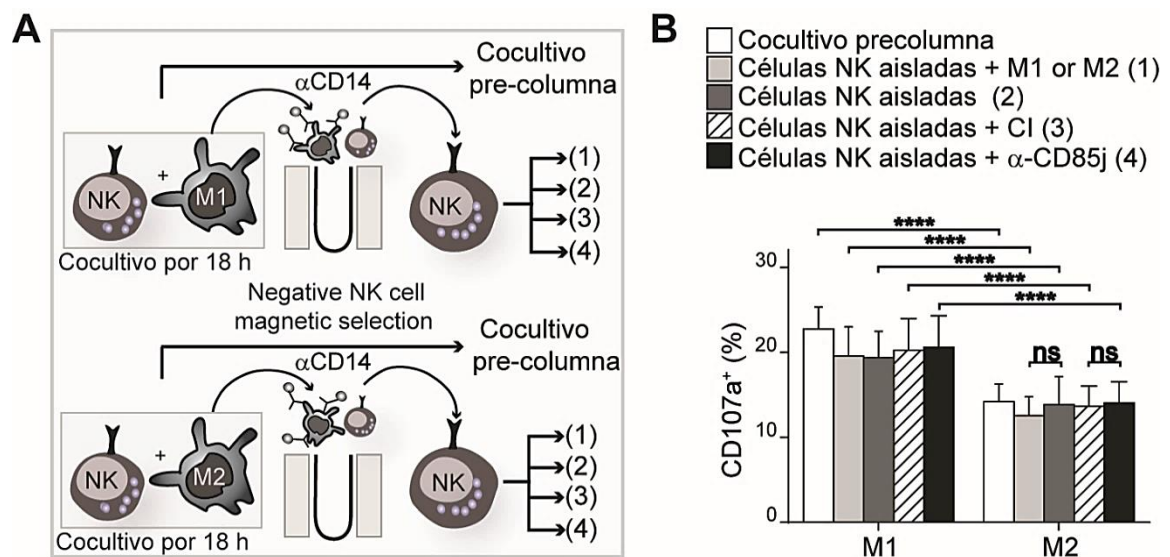
**En conjunto, estos resultados indican que, además del rol anteriormente demostrado del TGF- $\beta$ , los macrófagos M2 restringen la citotoxicidad y producción de IFN- $\gamma$  de células NK a través de la regulación positiva de CD85j en células NK y la interacción con su ligando afín HLA-G expresado en macrófagos M2.**





**Figura 17. La sobreexpresión del receptor inhibitorio CD85j (ILT-2) es responsable de la menor degranulación y producción de IFN- $\gamma$  por células NK expuestas a macrófagos M2.** **A)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> después del cocultivo con las células K562 y macrófagos M1 o M2 en presencia de un AcMo CI (barras blancas) o un AcMo bloqueante anti-CD85j (barras negras),  $n=10$ . **B)** Gráficos de tipo *zebra plot* representativos. **C)** Relación del porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> en presencia de un AcMo bloqueante anti-CD85j y el porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> en presencia de un AcMo CI para células NK cocultivadas con macrófagos M1 o M2,  $n=10$ . **D)** Porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> después de la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18, y cultivadas en presencia de macrófagos M1 o M2 y un AcMo CI (barras blancas), un AcMo bloqueante anti-CD85j (barras negras) o un AcMo bloqueante anti-CD85j en conjunto con un AcMo bloqueante anti-TGF- $\beta$  (barras rayadas),  $n=4$ . **E)** Gráficos de tipo *zebra plot* representativos. **F)** Relación del porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en presencia de un AcMo bloqueante y el porcentaje de células NK CD56<sup>bright</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en presencia de un AcMo CI para células NK cocultivadas con macrófagos M1 o M2,  $n=4$ . En **(A)**, **(D)** y **(F)** se utilizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas combinadas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni y en **(C)** una prueba *t* pareada. Se grafica la media  $\pm$  SEM en **(A)**, **(C)**, **(D)** y **(F)**. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

Finalmente, se evaluó si el efecto supresor de los macrófagos M2 sobre las células NK dependía del contacto continuo entre ambas células, o si las células NK una vez aisladas del contacto con los macrófagos M2 eran capaces de recuperar su capacidad de degranulación contra las células blanco K562. Para esto, se realizó el cocultivo de las células NK con los macrófagos M1 o M2 durante 18 h, tal como efectuó para los experimentos anteriormente detallados, y luego las células NK se aislaron por selección negativa. Esas células fueron posteriormente cultivadas nuevamente con macrófagos M1 o M2 o en ausencia de macrófagos. Además, estas células NK se cultivaron en ausencia y en presencia de un AcMo bloqueante anti-CD85j (**Figura 18A**). Observamos que el efecto supresor sobre la degranulación desencadenado en las células NK por los macrófagos M2 persistió incluso en ausencia de los macrófagos M2 durante al menos 2 h. A su vez, el hecho de que el bloqueo de CD85j con un AcMo en las células NK en ausencia de macrófagos no haya aumentado la degranulación contra las células blanco K562 refuerza la idea de que este receptor inhibitorio estaría interactuando exclusivamente con los ligandos expresados en los macrófagos y que no tendrían lugar interacciones células NK- células NK o células NK-células blanco K562 que involucren a CD85j y que conduzcan a la inhibición de la respuesta citotóxica (**Figura 18B**).



**Figura 18. La exposición de las células NK a macrófagos M2 genera células NK transitoriamente hiporrespondedoras. A)** Representación esquemática del diseño experimental utilizado para evaluar las consecuencias de la exposición de las células NK a macrófagos M2. Brevemente, las células NK se cocultivaron con macrófagos M1 o M2 durante 18 h, se cosecharon, se separaron de los macrófagos (células CD14<sup>+</sup>) por selección inmunomagnética negativa y se recultivaron con macrófagos M1 o M2 (condición 1), en ausencia de macrófagos (condición 2), en ausencia de macrófagos y presencia de un AcMo CI (condición 3) o en ausencia de macrófagos y presencia de un AcMo bloqueante anti-CD85j (condición 4). Finalmente, se realizaron ensayos de degranulación con estas células NK. **B)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> en células NK previamente cultivadas con macrófagos M1 y M2 según se detalla en (A) (condiciones 1-4). Como control, las células NK que permanecieron en contacto con macrófagos M1 o M2 también se analizaron (“Cocultivo pre-columna”). Se utilizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas combinadas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni,  $n=6$ . Se grafica la media  $\pm$  SEM en (B). \*\*\*\*,  $p<0.0001$ .

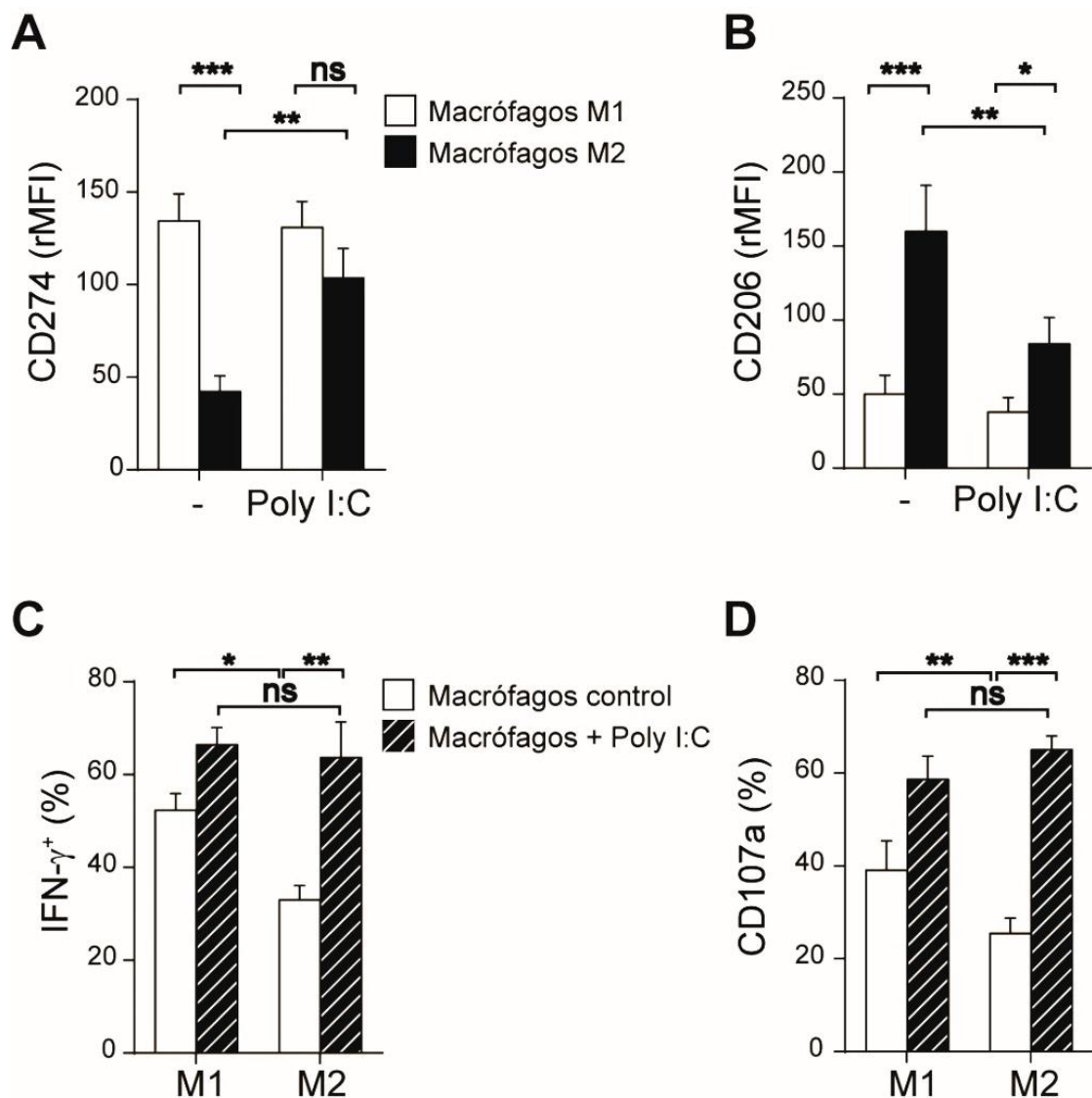
**Nuestros resultados indican que los macrófagos M2 humanos limitan las funciones efectoras de las células NK a través de mecanismos distintivos que implican una supresión mediada por TGF- $\beta$  de la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK CD56<sup>bright</sup>, y una regulación positiva en la expresión de CD85j que inhibe la degranulación de células NK CD56<sup>dim</sup> contra las células K562 y la producción de IFN - $\gamma$  por células NK CD56<sup>bright</sup>. Además, las células NK que experimentan el contacto con los macrófagos M2 permanecen al menos transitoriamente hipo-respondedoras a los estímulos de degranulación.**

### **1.5. Repolarización de los macrófagos M2 hacia un fenotipo M1**

Como se mencionó en la introducción, la manipulación de los estímulos ambientales para repolarizar los TAM hacia un perfil proinflamatorio supresor de tumores en condiciones patológicas es una estrategia de potencial utilidad clínica para la terapia contra el cáncer. Teniendo esto en cuenta, se evaluó si los macrófagos M2 podrían repolarizarse hacia un estado de activación clásico que promueva las funciones tumoricidas de las células NK. Para

esto, se diferenciaron macrófagos M1 y M2 y se los expuso durante 18 h a 25 µg/mL del agonista de TLR3 Poly I:C, se cosecharon y analizaron fenotípicamente por CF. Observamos, que una vez repolarizados los macrófagos M2 aumentaron la expresión de CD274 alcanzando niveles de expresión similares a los macrófagos M1 (**Figura 19A**), mientras que la expresión de CD206 disminuyó (**Figura 19B**). Para esto ensayos, la concentración óptima de Poly I:C se determinó exponiendo los macrófagos M2 a dosis crecientes de Poly I:C (1, 25 y 50 µg/mL) y evaluando por CF el estado de polarización de los macrófagos (datos no mostrados). Seguidamente se evaluó funcionalmente a los macrófagos M2 repolarizados con Poly I:C, para lo cual luego de varios lavados con solución fisiológica se los cocultivó con células NK aisladas de sangre periférica de donadores sanos (en relación 1:1) durante 24 h. Finalmente, se cosecharon las células NK y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-15, IL-18 y la degranulación contra las células blanco K562 por CF (**Figura 19C y D**). Observamos que el cocultivo con macrófagos M2 repolarizados permitió potenciar ambas funciones efectoras, alcanzando valores similares a los de las células NK cocultivadas con macrófagos M1 control.

**Los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* pueden ser repolarizados mediante la exposición a Poly I:C hacia un estado proinflamatorio similar a los M1. Además, el cocultivo con estos TAM repolarizados permitió que las células NK produzcan niveles de IFN- $\gamma$  en respuesta al estímulo con citoquinas y de degranulación contra las células K562 similares a las células NK co-cultivadas con macrófagos M1.**



**Figura 19.** La exposición de macrófagos M2 diferenciados *in vitro* a Poly I:C promueve la adquisición de un fenotipo M1 y potencia las funciones efectoras de las células NK. **A y B)** Expresión de CD274 (**A**) y de CD206 (**B**) en macrófagos M1 (barras blancas) y M2 (barras negras) control (-) o tratados con Poly I:C,  $n=5$  en ambos casos. **C)** Porcentaje de células NK  $\text{IFN-}\gamma^+$  luego del estímulo con IL-12, IL-15 e IL-18 y el cocultivo con macrófagos control (barras blancas) o pretratados con Poly I:C (barras negras rayadas),  $n=5$ . **D)** Porcentaje de células NK  $\text{CD56}^{\text{dim}} \text{CD107a}^+$  luego del cocultivo con las células blanco K562 y macrófagos control (barras blancas) o pretratados con Poly I:C (barras negras),  $n=5$ . Se utilizó un ANOVA de dos vías con medidas repetidas combinadas en ambos factores y una prueba post hoc de Bonferroni. Se grafica la media  $\pm$  SEM. ns, no significativo, \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.0001$ .

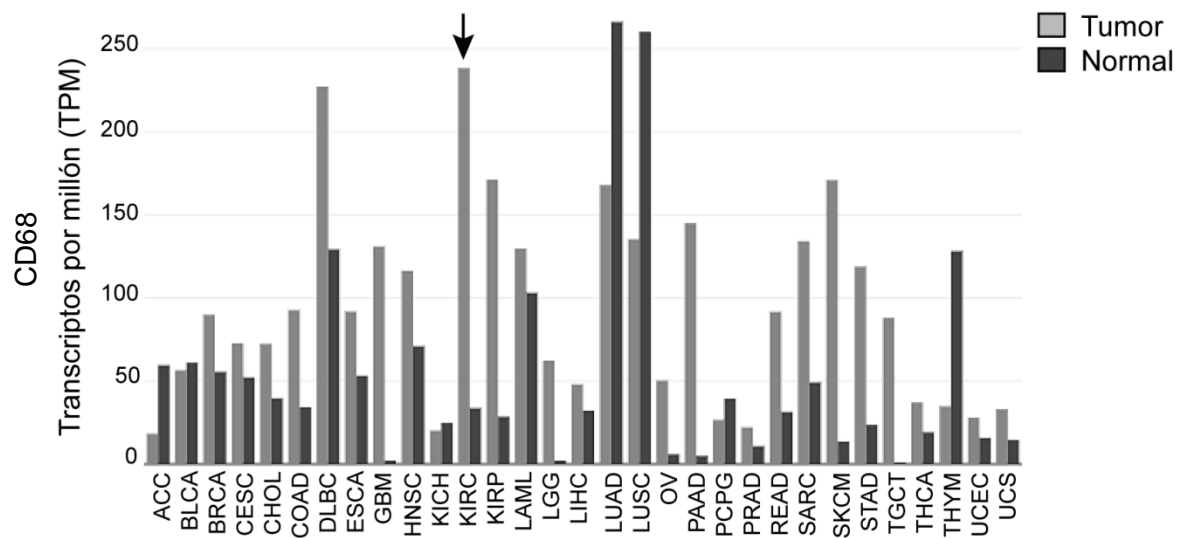
## 2. Validación de los resultados mediante el estudio del efecto de los TAM de CCR sobre el fenotipo y funciones efectoras de células NK humanas y murinas

### 2.1. TAM de CCR humanos

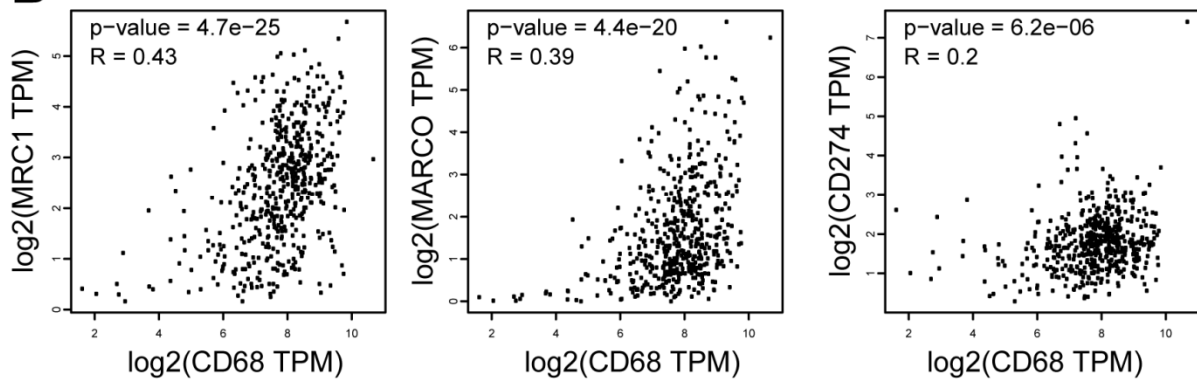
#### 2.1.1.1. Caracterización de los TAM de CCR humanos

Con el objetivo de validar en un entorno de patología humana los resultados previamente obtenidos empleando un modelo de diferenciación de macrófagos *in vitro*, nos propusimos evaluar si los TAM de biopsias de tumores humanos presentaban similitudes fenotípicas y funcionales a los macrófagos M2 diferenciados *in vitro*. Para esto, en primer lugar, realizamos un análisis bioinformático utilizando la base de datos GEPIA. Analizamos la frecuencia o abundancia de macrófagos infiltrantes en más de 30 tipos de tumores empleando a las moléculas CD68, CD206 y MARCO como marcadores macrófagos antiinflamatorios (**Figura 20A**). Observamos que las muestras de CCR de células claras, que como se mencionó previamente son los tumores renales más frecuentes, fueron los que presentaron mayor infiltrado de macrófagos respecto al resto de tumores analizados y a su vez, la cantidad de macrófagos en el tejido tumoral superó varias veces a la cantidad en el tejido normal. Asimismo, la expresión de CD68 correlacionó positivamente más fuertemente con marcadores de macrófagos M2 (CD206 y MARCO) que con el marcador de M1 CD274 (**Figura 20B**).

A

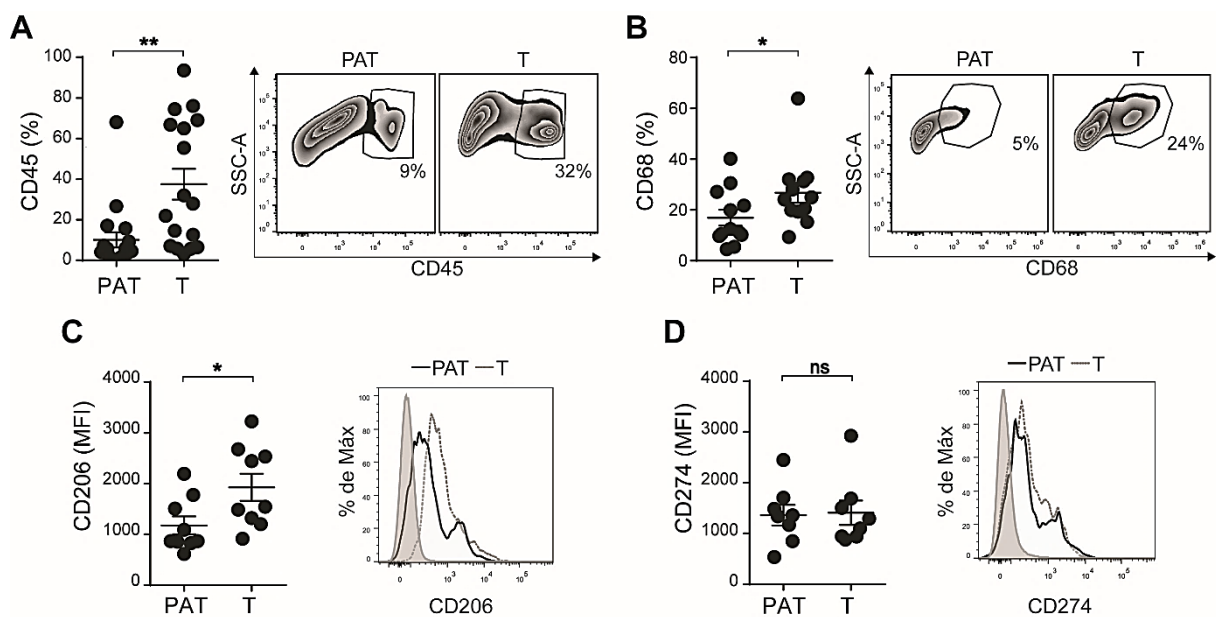


B



**Figura 20.** El análisis bioinformático del infiltrado de macrófagos en varios tipos de tumores muestra que el CCR de células claras presenta un alto infiltrado de macrófagos y que éstos tienen un perfil mayormente antiinflamatorio. **A)** Expresión de CD68 en carcinoma adrenocortical (ACC), carcinoma urotelial de vejiga (BLCA), carcinoma de mama invasivo (BRCA), carcinoma de células escamosas cervicales y adenocarcinoma endocervical (CESC), colangioma (CHOL), adenocarcinoma de colon (COAD), Linfoma difuso de células B grandes (DLBC), carcinoma esofágico (ESCA), glioblastoma multiforme (GBM), carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSC), carcinoma cromóforo renal (KICH), carcinoma renal de células claras (KIRC), carcinoma renal de células papilares (KIRP), leucemia mieloide aguda (LAML), glioma de grado inferior del cerebro (LGG), carcinoma hepatocelular hepático (LIHC), adenocarcinoma pulmonar (LUAD), carcinoma de células escamosas de pulmón (LUSC), mesotelioma (MESO), cistadenocarcinoma seroso ovárico (OV), adenocarcinoma pancreático (PAAD), feocromocitoma y paraganglioma (PCPG), adenocarcinoma de próstata (PRAD), adenocarcinoma de recto (READ), sarcoma (SARC), melanoma cutáneo (SKCM), adenocarcinoma de estómago (STAD), tumores de células germinales testiculares (TGCT), carcinoma de tiroides (THCA), timoma (THYM), carcinoma de endometrio del cuerpo uterino (UCEC), carcinosarcoma uterino (UCS), melanoma uveal (UVM). **B)** Gráficos de correlación de Spearman para CD68 y CD206 (MRC1), MARCO y CD274.

Este análisis nos llevó a pensar que el CCR era un buen modelo para el estudio de los TAM y su interacción con las células NK. Por este motivo se investigó el fenotipo de los TAM por CF en suspensiones celulares preparadas a partir de escisiones quirúrgicas de tumores primarios provenientes de pacientes con CCR (**Figura 21**). Observamos una frecuencia significativamente mayor de infiltrado de células de origen hematopoyético (células CD45<sup>+</sup>) y una frecuencia significativamente mayor de células CD68<sup>+</sup> dentro de la población de células CD45<sup>+</sup> en el tejido tumoral respecto al tejido peritumoral emparejado, corroborando lo observado anteriormente mediante el análisis bioinformático (**Figura 21A y B**). A su vez, los macrófagos intratumorales presentaron alta expresión de CD206 (marcador asociado con el perfil M2) respecto a los macrófagos del parénquima peritumoral, aunque no hubo diferencias en la expresión de CD274 (marcador asociado con el perfil M1) (**Figura 21C y D**).



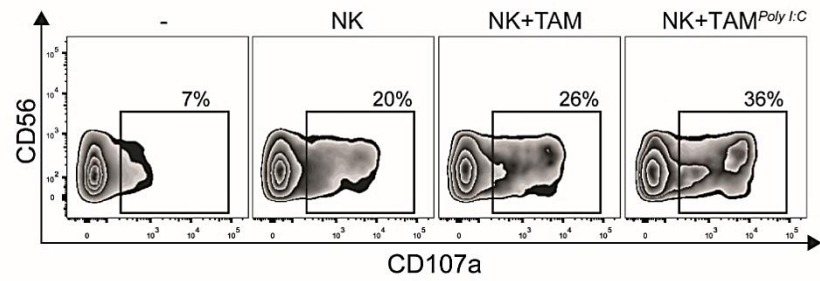
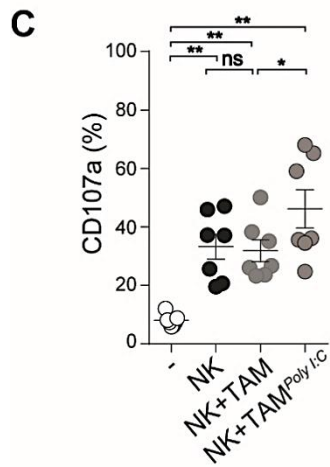
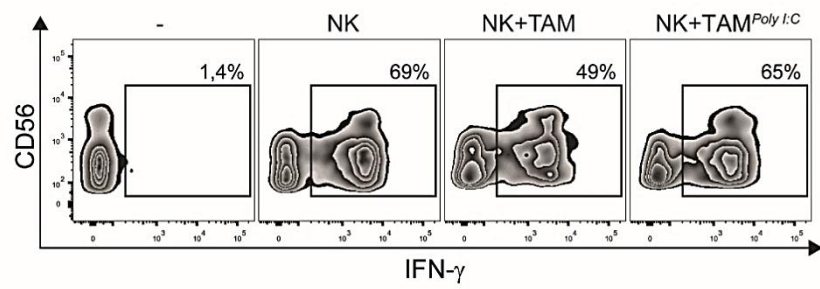
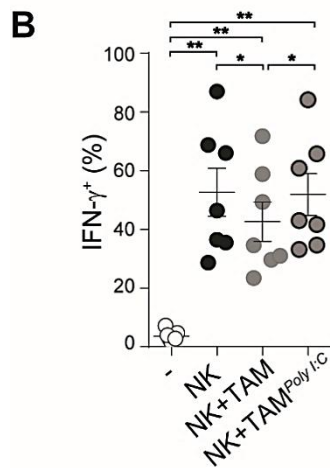
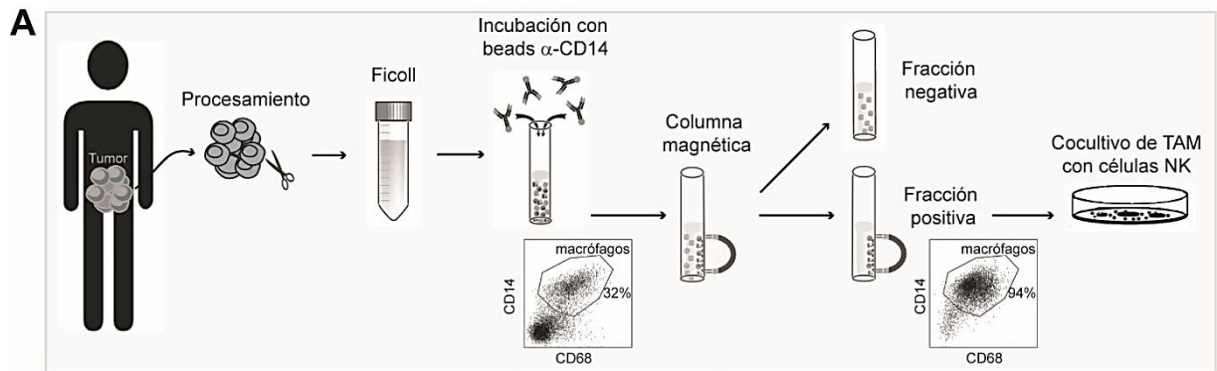
**Figura 21.** Los TAM de CCR presentan alta expresión del marcador de M2 CD206. **A y B**) Porcentaje de células CD45<sup>+</sup> (**A**) y de células CD45<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (macrófagos) (**B**) infiltrantes en tumores (T) comparados con los del parénquima adyacente al tumor (PAT),  $n=17$  (**A**) y  $n=12$  (**B**). Se muestran los gráficos de tipo *zebra plot* representativos. **C y D**) Expresión de CD206 (**C**) y de CD274 (**D**) en macrófagos infiltrantes en tumores (T) comparados con los del parénquima adyacente al tumor (PAT),  $n=9$  (**C**) y  $n=8$  (**D**). Se muestran histogramas representativos. Se grafican valores individuales para cada dador y la media  $\pm$  SEM. Se utilizó una prueba t pareada. Ns, no significativo; \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .



### 2.1.1.2. Efecto de los TAM de CCR humanos sobre las funciones efectoras de células NK

Seguidamente, se aislaron los TAM de las muestras de tumores renales con el objetivo de evaluar su potencial efecto inhibitorio sobre las células NK. Para esto se obtuvieron suspensiones celulares homogéneas de los tumores y se aislaron los TAM por selección positiva de células CD14<sup>+</sup> y columnas inmunomagnéticas (detalles en sección Materiales y métodos). Posteriormente, los TAM fueron cultivados en relación 1:1 con células NK aisladas de muestras de sangre periférica de donadores sanos (**Figura 22A**). Observamos que al igual que los macrófagos M2 diferenciados *in vitro*, los TAM fueron capaces de inducir menor porcentaje de células NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en respuesta a la estimulación con las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18. Además, las células NK cocultivadas con TAM pretratados con Poly I:C mostraron una mayor expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 (datos no mostrados) y el cocultivo con estos TAM repolarizados permitió que las células NK produzcan niveles de IFN- $\gamma$  similares a las células NK cultivadas en ausencia de TAM (**Figura 22B**). En las mismas condiciones se evaluó la degranulación de las células NK contra las células blanco K562 y observamos que a diferencia de los macrófagos M2 diferenciados *in vitro*, los TAM de CCR no inhibieron la capacidad citotóxica de las células NK. Sin embargo, la exposición de las células NK a macrófagos pretratados con Poly I:C fue suficiente para potenciar dicha función efectora a niveles inclusive superiores a los de aquellas células NK cultivadas en ausencia de macrófagos (**Figura 22C**).

**Los TAM de CCR presentan alta expresión del marcador de macrófagos antiinflamatorios CD206 e inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por células NK en respuesta al estímulo con citoquinas. Sin embargo, pueden ser repolarizados mediante la exposición a Poly I:C hacia un estadio proinflamatorio que potencia las funciones efectoras de las células NK.**

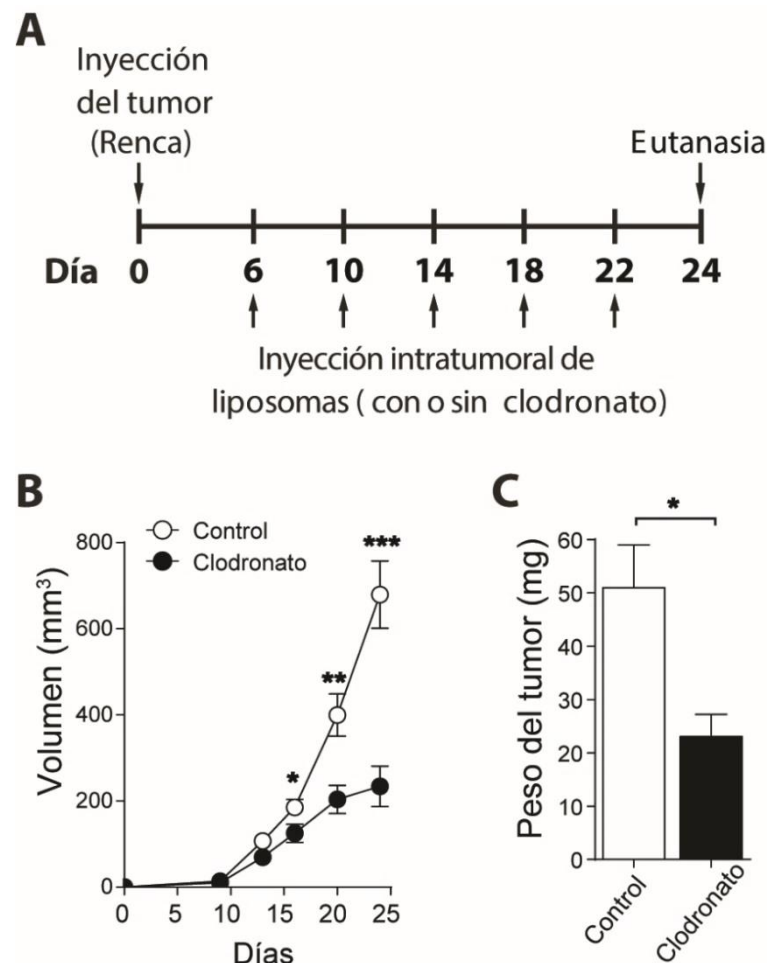


**Figura 22. Los TAM aislados de biopsias de pacientes con CCR inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.** **A)** Representación esquemática del protocolo de aislamiento de TAM a partir de muestras de tumores renales humanos. Brevemente, las biopsias fueron procesadas hasta obtener una suspensión celular homogénea que se sembró sobre un Ficoll-Hypaque. Luego se seleccionaron positivamente a las células CD14<sup>+</sup> (TAM) mediante columnas magnéticas y estos TAM fueron cocultivados con células NK de donantes sanos. **B)** Porcentaje de células NK IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en estado de reposo (-) o luego de la estimulación con IL-12, IL-15 e IL-18 en ausencia (NK) o presencia de TAM no tratados (NK+TAM) o pretratados con Poly I:C (NK+TAM<sup>Poly I:C</sup>),  $n=7$ . Se muestran gráficos de tipo *zebra plot* representativos a la derecha. **C)** Porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> en ausencia (-) o presencia de las células blanco K562 (NK), o luego del cocultivo con TAM no tratados (NK+TAM) o pretratados con Poly I:C (NK+TAM<sup>Poly I:C</sup>),  $n=7$ . Se muestran gráficos de tipo *zebra plot* representativos a la derecha. En todos los casos se grafican los valores individuales para cada dador y la media +SEM. Se utilizó un ANOVA de una vía con medidas repetidas y una prueba post hoc de Dunnett. ns, no significativo, \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ .

## 2.2. TAM de CCR murinos

### 2.2.1.1. Efecto de los TAM de CCR murinos sobre el crecimiento tumoral, fenotipo y funcionalidad de las células NK intratumorales

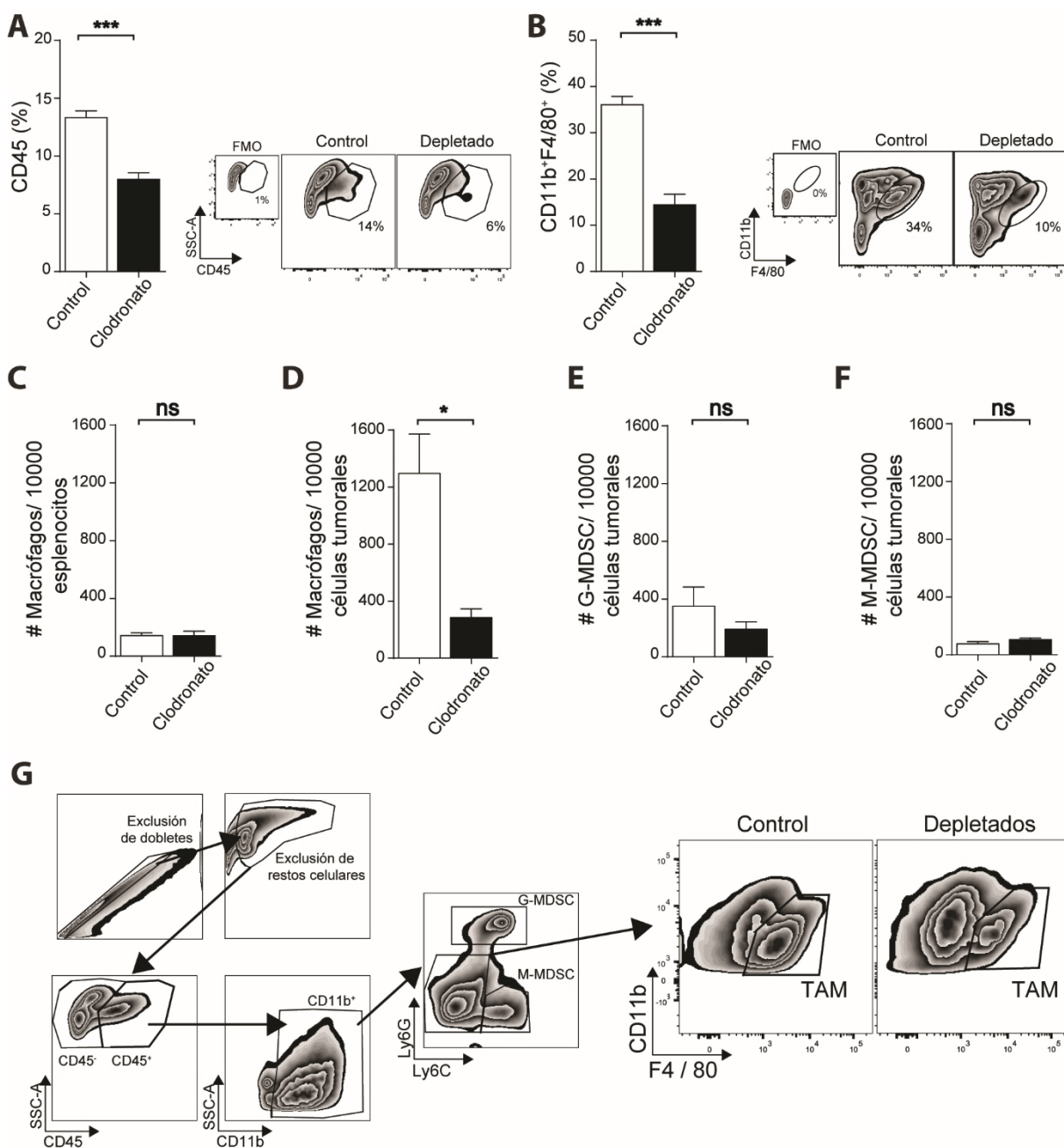
Debido a que nuestros datos demostraron un efecto supresor de los TAM de CCR humanos sobre las células NK, nos propusimos explorar aún más la relevancia de este circuito inhibitorio durante el crecimiento tumoral, para lo cual utilizamos un modelo de CCR de ratón (Renca). Dos grupos de ratones fueron desafiados con células Renca y luego de 6 días, un grupo de ratones se inyectó intratumoralmente con liposomas de clodronato con el objeto de depletar los TAM y el otro grupo se inyectó intratumoralmente con liposomas control como se representa en la **Figura 23A**. Observamos que los tumores de ratones tratados con liposomas de clodronato exhibieron un crecimiento significativamente retrasado (**Figura 23B**) y un peso menor en el momento de la eutanasia (**Figura 23C**) que los tumores de ratones que recibieron liposomas de control. Estos resultados confirman que los TAM de CCR tienen un rol protumoral que facilita el crecimiento del tumor.



**Figura 23. Los TAM del tumor renal murino Renca promueven el crecimiento del tumor. A)** Esquema del diseño experimental empleado: dos grupos de ratones fueron desafiados con el tumor Renca y tratados con liposomas con Clodronato o liposomas control a partir del día 6 y cada cuatro días. Se realizó un seguimiento del volumen tumoral y luego de 24 días los ratones se sacrificaron y se realizaron las correspondientes determinaciones. **B)** Cinética del crecimiento tumoral de células Renca en ratones tratados con liposomas control (puntos negros) o con clodronato (puntos blancos). Los resultados corresponden a la media  $\pm$  SEM de datos acumulados de 2 experimentos independientes, se realizó una prueba t.  $n > 7$ . **C)** Media  $\pm$  SEM del peso del tumor primario extirpado 24 días luego de la inoculación del tumor,  $n = 4$ . Se realizó una prueba t. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ , \*\*\*,  $p < 0.001$

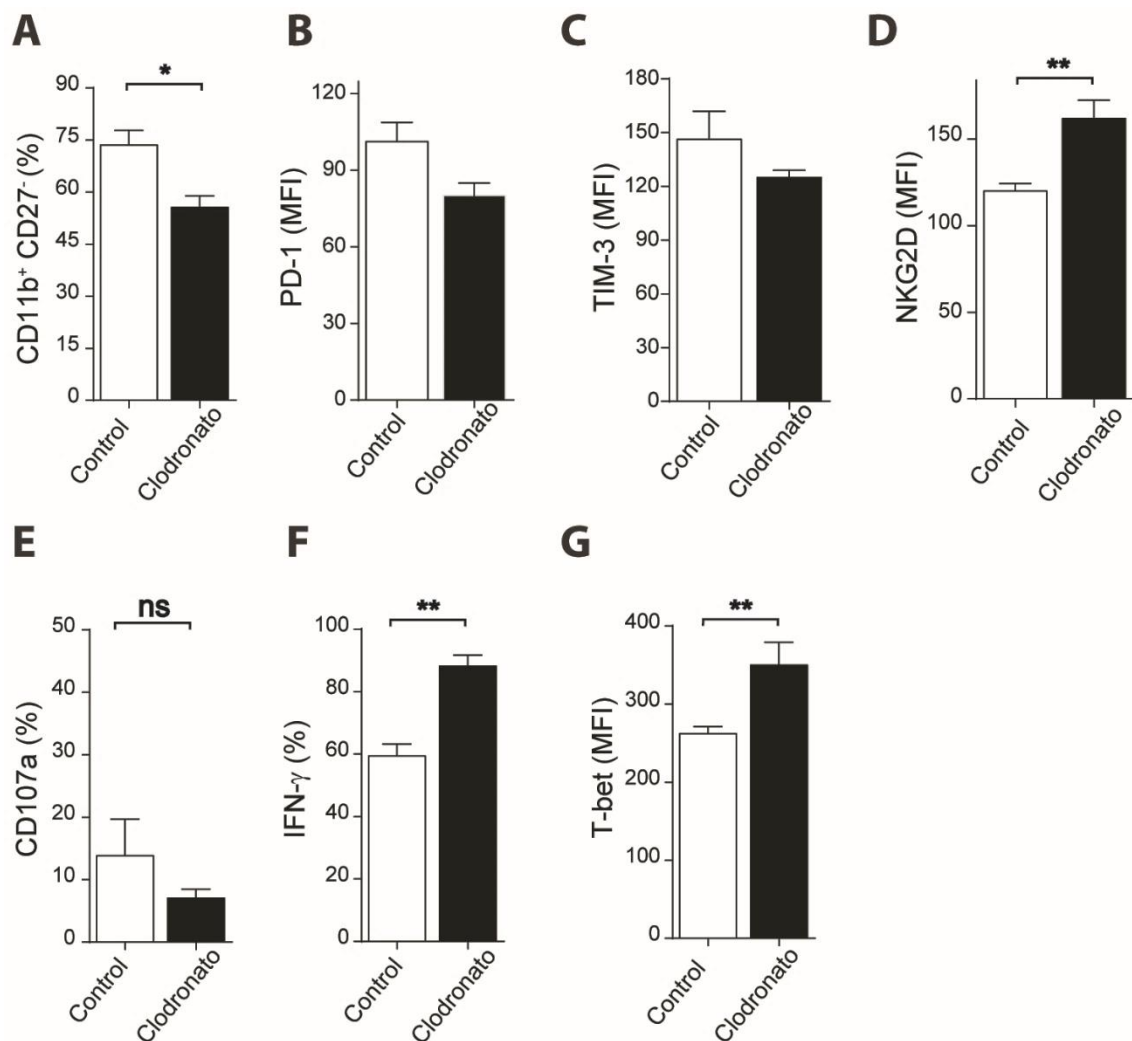
El análisis de las poblaciones de células inmune infiltrantes en los tumores mostró que los ratones tratados con clodronato presentaron menor frecuencia de infiltrado de células CD45<sup>+</sup> (**Figura 24A**) y de TAM (células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>) dentro de la población CD45<sup>+</sup> (**Figura 24B**) que los ratones tratados con liposomas control. Además, se realizó este mismo análisis, pero cuantificando el número absoluto de macrófagos (células

CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>Ly6C<sup>-</sup>Ly6G<sup>-</sup>) y relativizándolo al número de esplenocitos o células tumorales (Figura 24C y D), lo que nos permitió descartar efectos sistémicos del tratamiento con clodronato y confirmar que la depleción ocurrió sólo en el sitio de tumor. A su vez, este análisis nos permitió descartar que el tratamiento afecte el número absoluto de otras poblaciones mieloides supresoras intratumorales como las G-MDSC (células CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>alto</sup>Ly6C<sup>bajo</sup>) o las M-MDSC (células CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>alto</sup>) (Figura 24E y F).



**Figura 24. El tratamiento con clodronato intratumoral depleta de forma exclusiva a los TAM.** Los ratones fueron desafiados con el tumor Renca y tratados con liposomas control o con clodronato. A los 24 días se sacrificaron los animales y se analizó el porcentaje de células infiltrantes de tumor por CF **A)** Porcentaje de células linfoides CD45<sup>+</sup>, *n*>4. **B)** Porcentaje de macrófagos (células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) dentro de la población CD45<sup>+</sup>, *n*>4. **C)** Número absoluto de macrófagos (células CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) relativizado al número de esplenocitos, *n*>4. **D)** Número absoluto de macrófagos (células CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) relativizado al número de células tumorales, *n*>4. **E y F)** Número absoluto de células mieloides supresoras de origen granulocítico (G-MDSC, células CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>alto</sup>Ly6C<sup>bajo</sup>) o monocítico (M-MDSC, células CD45<sup>+</sup>Ly6G<sup>Ly6C<sup>alto</sup></sup>) relativizado al número de células tumorales, *n*>4 en ambos casos. **G)** Estrategia empleada para analizar las diferentes poblaciones celulares. Se grafica la media ± SEM; en todos los casos se realizó una prueba t. ns, no significativo, \*, *p*<0,05, \*\*\*, *p*<0,001.

Finalmente, debido a que la depleción de TAM retrasó el crecimiento tumoral y a que nuestros resultados previos permitieron demostrar un efecto supresor de los macrófagos antiinflamatorios sobre las células NK, investigamos las funciones efectoras de las células NK infiltrantes de tumores (NKIT) en este modelo. Se evaluó en primer lugar el fenotipo de las células NKIT. Observamos que éstas corresponden en su mayoría a la subpoblación terminalmente diferenciada CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> y que la depleción de TAM disminuyó la proporción de células NKIT con dicho fenotipo (**Figura 25A**). A su vez, aunque todavía no alcanza significancia estadística, la depleción de TAM disminuyó los niveles de expresión de PD-1 (**Figura 25B**) y Tim-3 (**Figura 25C**), ambos marcadores recientemente asociados a células NK con un fenotipo disfuncional o exhausto, mientras que aumentó los del receptor activador NKG2D (**Figura 25D**). Asimismo, aunque las células NKIT de ratones depletados de TAM mostraron una capacidad de degranulación similar a las células NKIT de ratones control (**Figura 25E**), exhibieron una producción de IFN- $\gamma$  significativamente mayor (**Figura 25F**) y, concordantemente, estas células presentaron mayor expresión del factor de transcripción T-bet (**Figura 25G**). Esto sugiere que los TAM de CCR ejercen efectos supresores que promueven la adquisición de un fenotipo disfuncional o exhausto por parte de las células NKIT, afectando principalmente su capacidad para producir IFN- $\gamma$ .



**Figura 25 Los TAM de CCR ejercen efectos supresores que promueven la adquisición de un fenotipo disfuncional en las células NK intratumorales.** Los ratones fueron desafiados con el tumor Renca y tratados con liposomas control o con clodronato, a los 24 días se sacrificaron y analizó el fenotipo y funcionalidad de las células NK por CF **A)** Porcentaje de células NKIT con fenotipo terminalmente diferenciado CD11b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>,  $n=4$  **B-D)** MFI de PD-1 (**B**), Tim-3 (**C**) y NKG2D (**D**) en células NKIT,  $n\geq 3$ . **E)** Porcentaje de células NKIT CD107a<sup>+</sup>,  $n\geq 3$  **F)** Porcentaje de células NKIT IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>,  $n\geq 3$  **G)** MFI de T-bet en células NKIT,  $n\geq 3$ . Se grafica la media  $\pm$  SEM, en todos los casos se realizó una prueba *t*. ns, no significativo, \*,  $p<0,05$ , \*\*,  $p<0,001$ .

## Discusión

---

Las células NK desempeñan un papel importante en la supresión tumoral ejerciendo citotoxicidad sobre la mayoría de las células cancerosas y participando en la polarización de las respuestas de tipo Th1 [31]. Sin embargo, los datos clínicos sugieren que *in vivo* durante la fase de escape tumoral, las funciones efectoras de estas células suelen verse afectadas por mecanismos regulatorios negativos desarrollados por los tumores y su microambiente [284]. Considerando que los macrófagos constituyen la población de células del sistema inmune más abundante en una gran variedad de tumores sólidos, en este trabajo hipotetizamos que uno de estos mecanismos podría estar representado por la interacción con los macrófagos infiltrantes polarizados hacia un fenotipo funcional antiinflamatorio, similar al perfil M2, promotor del tumor e inmunosupresor. Por lo tanto, dado que los estudios *in vivo* en humanos son limitados, en primer lugar establecimos un sistema de cocultivo de células NK humanas y macrófagos diferenciados *in vitro* que nos permitiera estudiar las consecuencias funcionales y los mecanismos celulares subyacentes a la interacción entre ambos tipos celulares. Siguiendo las pautas consenso de polarización de macrófagos *in vitro* [168] observamos que los macrófagos M1 secretaron mayores cantidades de las citoquinas proinflamatorias IL-12, IL-23, IL-27 e IL-18 y produjeron más NO que los macrófagos M2. Sin embargo, en concordancia con otros trabajos [285–287] hemos detectado también elevadas cantidades de IL-10 y TGF- $\beta$  en los sobrenadantes de los macrófagos M1. Aunque *a priori* podría considerarse que estos resultados van en contra de la literatura, es necesario destacar que mientras que los macrófagos M2 se caracterizan por la producción de IL-10 en el contexto de una baja o nula producción de citoquinas proinflamatorias, se ha reportado que los macrófagos M1 a menudo producen IL-10 en conjunto con la secreción de una elevada cantidad de citoquinas proinflamatorias y que las vías que inducen IL-10 en realidad regulan negativamente a las primeras [288–290]. Concordantemente, mediante experimentación *in vitro*, Boonstra y colegas demostraron que mientras que los macrófagos murinos producen cantidades significativas de IL-10 luego de la estimulación con ligandos de TLR4 y TLR9 [291], la presencia de LPS fue capaz de inducir la producción de elevadas



cantidades de IL-10 en conjunto con IL-6 y TNF- $\alpha$  en macrófagos humanos diferenciados con M-CSF [292]. En este sentido, creemos que la mejor forma de definir el perfil de los macrófagos es analizando la proporción de citoquinas proinflamatorias a antiinflamatorias, la cual fue considerablemente mayor para los macrófagos M1 que para los M2 que generamos y empleamos en este trabajo. Trasladándonos a un contexto fisiológico, TGF- $\beta$  e IL-10 producidas localmente en un tejido por macrófagos proinflamatorios podrían actuar sobre otros macrófagos residentes o sobre aquellos monocitos que ingresen al tejido desde la circulación, promoviendo su diferenciación hacia el perfil M2 y por lo tanto actuando como mecanismos de auto-regulación negativa que controlan la magnitud de la respuesta inmune y previenen el daño al tejido huésped. En línea con este concepto, se ha demostrado que la producción de IL-10 por monocitos humanos activados con LPS es relativamente tardía en comparación con la producción de citoquinas proinflamatorias [293]. El sentido biológico de dicho desfase podría ser que *in vivo* la respuesta proinflamatoria necesaria para la erradicación de un patógeno o noxa se complete anticipadamente al inicio del programa de mitigación de daño al tejido propio que mediante la secreción de citoquinas antiinflamatorias promueve la diferenciación de macrófagos antiinflamatorios M2.

A continuación, evaluamos los efectos del cocultivo de los macrófagos M2 sobre las células NK. En primer lugar, observamos que a diferencia de los macrófagos M2, el cocultivo con macrófagos M1 indujo un aumento en la expresión del marcador de superficie CD69 en células NK en reposo. CD69 es un receptor de lectina C de tipo II unido a la membrana cuyo papel preciso en la función de las células inmunes aún no se ha dilucidado. Sin embargo, evidencia experimental reciente demuestra que este receptor se expresa en varios subconjuntos de células inmunes residentes en los tejidos, incluidas las células T de memoria residentes, células T gamma delta ( $\gamma\delta$ ) y células NK, por lo que se cree que cumple un rol importante en la migración y retención tisular de estas células [294, 295]. Asimismo, la expresión de este receptor se regula positivamente de manera rápida después de la estimulación, lo que subyace a su uso generalizado como marcador temprano de activación de linfocitos y células NK [296]. En línea con nuestros resultados, varios grupos han demostrado una regulación positiva de la expresión de CD69 en la superficie de células NK cuando se las expuso a monocitos/macrófagos infectados con varios patógenos [186–188]. Contrariamente, observamos que los macrófagos M2 restringieron la expresión de CD69 en

células NK estimuladas con citoquinas (IL-12, IL-15 e IL-18) y reafirmamos que los macrófagos M2 limitaron la activación de las células NK frente al estímulo con citoquinas dado que en estas condiciones los macrófagos M2 también afectaron negativamente la expresión de CD25 y la producción de IFN- $\gamma$ . Estudios previos demostraron que la activación de las células NK con citoquinas, de manera similar a lo que ocurre en el sitio de una respuesta inflamatoria o en durante la interacción con CD maduras, induce la expresión de CD25 (receptor de alta afinidad para la IL-2) en las células NK [297]. Esto confiere una mayor capacidad de respuesta a IL-2, como hemos demostrado en trabajos de nuestro laboratorio [298, 299], dado que bajas concentraciones de esta citoquina inducen proliferación y estimulan la producción de IFN- $\gamma$  en células NK CD25<sup>+</sup>. Es por ello que habitualmente también se utiliza la expresión de CD25 como marcador de activación e índice de potencial proliferativo de células NK [300].

Se ha demostrado que el TGF- $\beta$  tiene un papel importante en la promoción de la progresión de los tumores establecidos, en parte al inhibir la vigilancia inmunológica a través de la modulación de la proliferación, el estado de activación y diferenciación de células de la inmunidad innata y de la inmunidad adaptativa [301, 302]. En este trabajo, demostramos que el TGF- $\beta$  soluble secretado por los macrófagos M2 limita la producción de IFN- $\gamma$  por células NK y que dicha inhibición es dependiente de la dosis de TGF- $\beta$  presente en el medio. Consistentemente, Bellone y colaboradores reportaron que el agregado de TGF- $\beta$  exógeno inhibe la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  en células NK humanas estimuladas *in vitro* con IL-2 e IL-12 [78]. La menor producción de IFN- $\gamma$  por las células NK se asoció con una expresión reducida de T-bet, factor de transcripción crítico que modula la expresión de numerosos genes asociados al sistema inmune y en particular estimula la transcripción génica de IFN- $\gamma$  [303]. En concordancia con estos resultados, Jianhua y colaboradores demostraron que el TGF- $\beta$  antagoniza la expresión de IFN- $\gamma$  inducida por las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18 a través de la modulación negativa de T-bet [304]. El TGF- $\beta$  secretado por los macrófagos M1 también restringió, aunque en menor medida, la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK CD56<sup>bright</sup>, lo cual refuerza la hipótesis del mecanismo de autocontrol de los macrófagos proinflamatorios planteada anteriormente. Nuestros resultados sugieren que los macrófagos M2, suprimen la producción de IFN- $\gamma$  por células NK a través de la producción de TGF- $\beta$  soluble más eficientemente que los macrófagos M1, posiblemente debido que no secretan

concomitantemente citoquinas proinflamatorias. Por otra parte, la IL-10 secretada por los macrófagos no moduló la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.

El efecto supresor de los macrófagos M2 también se extendió a las células NK CD56<sup>dim</sup> ya que éstas mostraron menor degranulación y citotoxicidad contra las células blanco K562 en presencia de los macrófagos M2 en comparación con los macrófagos M1. Este efecto se asoció con una reducción en el contenido de Pfp y granzima B en las células NK, pero no con alteraciones en la expresión de FasL y TRAIL. En línea con nuestros resultados, otros grupos han demostrado que el menor contenido de mediadores líticos en los gránulos secretorios de las células NK se asocia a una menor capacidad citotóxica [305, 306]. Por otro lado, se ha reportado que la actividad citotóxica de la línea celular NK92, que tiene características de células NK humanas, se asocia directamente a la tasa de unión a las células blanco K562 y que la formación de los conjugados NK92-K562 depende de la expresión de las moléculas de adhesión LFA-1 (CD11a) y CD2 que se acumulan en la interfaz del contacto, ya que Ac bloqueantes de dicha interacción impidieron la formación de conjugados y repercutieron directamente en la actividad citotóxica de las células NK92 [307]. Por este motivo evaluamos si los macrófagos M2 podrían afectar la formación de conjugados entre las células NK y las células blanco K562. Sin embargo, no observamos diferencias en la formación de estos conjugados en presencia de macrófagos M1 o macrófagos M2. Estos resultados sugieren que, aunque las células NK son igualmente eficientes para formar la sinapsis inmunológica con la célula blanco K562 en presencia de macrófagos M1 o de macrófagos M2, posiblemente estos últimos promuevan la liberación de gránulos con menor potencial citotóxico dado que, como hemos observado, en presencia de macrófagos M2 las células NK exhiben un contenido reducido de Pfp y granzima B.

Por otro lado, de manera contraria a lo reportado para macrófagos alveolares de rata que inhibieron la actividad de células NK a través de la secreción de TGF- $\beta$  [308] y en concordancia con los hallazgos recientemente publicados en un modelo murino [186], mediante el uso de dispositivos *transwell* demostramos que el efecto inhibitorio de los macrófagos M2 sobre la citotoxicidad de células NK requirió del contacto célula-célula. Dado que Ghiringhelli y colegas demostraron que los LT regulatorios humanos expresan TGF- $\beta$  unido a la membrana que es capaz de inhibir la producción de IFN- $\gamma$  por células NK [79],

evaluamos si una posible expresión de TGF- $\beta$  unido a la membrana de los macrófagos M2 podría ser la responsable de la inhibición de la citotoxicidad de las células NK. Sin embargo, el bloqueo de TGF- $\beta$  mediante el agregado de un AcMo al cocultivo entre macrófagos M2 y células NK no aumentó la citotoxicidad de estas últimas contra las células blanco K562. Por lo tanto, descartamos que una posible expresión de TGF- $\beta$  unido a membrana en macrófagos M2 sea la responsable de la inhibición de la degranulación de células NK.

Teniendo en cuenta que la funcionalidad de las células NK está regulada por el balance de señales activadoras e inhibitorias que reciben a través de sus receptores de membrana, realizamos una caracterización fenotípica de las células NK evaluando la expresión de los principales receptores activadores e inhibitorios luego de su cocultivo con macrófagos M1 o M2. Encontramos que los macrófagos M2 indujeron la sobreexpresión del receptor inhibitorio CD85j en las células NK y que su ligando principal HLA-G se expresó en mayor medida en macrófagos M2 respecto a macrófagos M1. Consistentemente, Philippe y colaboradores demostraron que HLA-G se sobreexpresa en monocitos de sangre periférica tras el tratamiento con IL-10, estímulo de polarización hacia el perfil M2 [309].

Los experimentos de bloqueo de CD85j con un AcMo demostraron que este receptor inhibitorio participa en la generación de células NK CD56<sup>dim</sup> con capacidad de degranulación disminuida y células NK CD56<sup>bright</sup> con menor capacidad de producción de IFN- $\gamma$ , aunque en línea con los resultados anteriormente discutidos, el bloqueo de TGF- $\beta$  fue el mayor responsable de la recuperación en las células NK CD56<sup>bright</sup> productoras de IFN- $\gamma$ . Asimismo, las células NK expuestas a macrófagos M2 experimentaron un mayor grado de inhibición de ambas funciones efectoras (citotoxicidad y producción de IFN- $\gamma$ ) a través de un mecanismo que involucra al receptor CD85j respecto a las células NK expuestas a macrófagos M1, posiblemente como consecuencia tanto de la sobreexpresión de CD85j en las células NK como de HLA-G en macrófagos M2. En concordancia con nuestros resultados, Morel y colaboradores demostraron que CD85j inhibió la producción de IFN- $\gamma$  en la línea de células NK NK-92 y en células NK de sangre periférica en respuesta a la interacción con células blanco, CDi o agonistas de TLR3, tres condiciones que estimulan la producción de esta citoquina [60]. Asimismo, la relevancia de esta interacción en condiciones fisiológicas se ha demostrado en los tejidos placentarios fetales, donde la sobreexpresión de HLA-G protege al

trofoblasto de la actividad citotóxica de las células NK [310]. Más aún, LeMaoult y colaboradores reportaron que la expresión de HLA-G en células presentadoras de antígeno es capaz de regular positivamente la expresión de CD85j en células NK y células T, constituyendo un mecanismo de escape inmunológico que otorga ventajas a aquellos tejidos que expresan HLA-G y que son objetivos potenciales de la actividad citotóxica de los linfocitos T y células NK [311]. La inducción en la expresión de un receptor inhibitorio tal como CD85j en las células NK sin afectar la expresión de los principales receptores activadores sugiere que a través de este mecanismo los macrófagos M2 podrían elevar el umbral de activación de las células NK. Como se detalló en la introducción, a diferencia de las células T y B que expresan receptores específicos de antígeno que están distribuidos de manera clonal, las células NK expresan simultáneamente un conjunto de varios receptores, por lo que una característica importante de la biología de estas células que la regulación positiva de cualquier receptor inhibitorio, como en este caso CD85j, es suficiente para reducir la actividad de las células NK contra todos los blancos posibles, independientemente del receptor de activación utilizado para detectar las células blanco. Dicha estrategia constituye una manera eficiente de suprimir las funciones efectoras de las células NK, dado que una hipotética disminución en la expresión de un único receptor activador desensibilizaría las células NK sólo frente a aquellas células blanco que expresen el ligando específico. Por lo tanto, nuestros hallazgos respaldan firmemente la idea de que, además de su papel inmunomodulador en la tolerancia materno-fetal, la molécula de clase I HLA-G puede participar en el escape de la inmunovigilancia que realizan los tumores. Consistentemente, se ha demostrado la expresión de HLA-G en TAM de biopsias de carcinomas de pulmón [312] y en el caso de tumores mamarios se ha observado expresión de HLA-G tanto en las células tumorales como en los TAM infiltrantes, en conjunto con células linfoides infiltrantes que expresan mayores cantidades de CD85j [313]. Al mismo tiempo, Roberti y colaboradores demostraron que la sobreexpresión de CD85j en las células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama triple negativo reduce la CCDA mediada por Cetuximab y que este efecto puede revertirse mediante el bloqueo de CD85j [314]. Diversos reportes indican que los tumores son capaces de disminuir la expresión de las moléculas clásicas de clase I del CMH, escapando de esta manera de la inmunovigilancia de los LT citotóxicos pero convirtiéndose en muchos casos en blancos más susceptibles a la

lisis por parte de las células NK [315]. Por lo tanto, la sobreexpresión de ligandos para receptores inhibitorios de las células NK, como es HLA-G, tanto en células tumorales como en TAM podría constituir un mecanismo de escape de la inmunovigilancia de las células NK aprovechado por ambos tipos celulares que contribuye a la capacidad del tumor de crecer *in vivo*. Por ejemplo, se ha evidenciado que las células de tumor colorrectal expresan HLA-G [316], mientras que a su vez, Rocca y colaboradores demostraron que las células NK de sangre periférica de pacientes con cáncer colorrectal presentan sobreexpresión de CD85j [317]. Observaciones similares se encontraron al analizar la expresión de HLA-G en las líneas celulares de melanoma humano IGR y M74 y el mismo grupo detectó un nivel más alto de transcripción de HLA-G en una biopsia de metástasis de melanoma en comparación con un fragmento de piel sano del mismo individuo [318].

En conjunto, nuestros resultados indican que, además del rol anteriormente demostrado del TGF- $\beta$  derivado de los macrófagos M2, estos macrófagos restringen la citotoxicidad y producción de IFN- $\gamma$  por células NK a través de un único mecanismo que implica la regulación positiva de CD85j en células NK cuyo ligando específico HLA-G se sobreexpresa en los macrófagos M2. Más aún, hemos demostrado que la inhibición de la citotoxicidad de las células NK persiste durante varias horas, confirmando que los macrófagos M2 generan células NK transitoriamente hiporrespondedoras. Este circuito podría ser relevante en el microambiente tumoral donde los macrófagos de tipo M2 podrían generar células NK hiporreactivas que posteriormente exhibirían una actividad citotóxica deteriorada contra las células tumorales incluso sin contactar directamente a los macrófagos de tipo M2.

Por otra parte, los resultados discutidos, aunque obtenidos con macrófagos humanos diferenciados *in vitro*, refuerzan la noción de que las inmunoterapias dirigidas contra los TAM representan un enfoque terapéutico prometedor contra el cáncer. Entre estas terapias, se incluyen estrategias que involucran la interferencia con su supervivencia, tendiente a promover la depleción de TAM y/o de los precursores existentes, la prevención de su acumulación mediante el bloqueo del tráfico hacia el foco tumoral, o la inducción de la reprogramación de TAM hacia perfiles proinflamatorios supresores de tumores similares a M1. La "reeducación" de los macrófagos se ha probado mediante el tratamiento con IL-12,

IFN- $\gamma$ , agonistas de CD40 y agonistas de TLR. En modelos experimentales murinos, la administración de IL-12 a ratones portadores de carcinoma hepatocelular alteró el fenotipo funcional de los TAM reduciendo su producción de citoquinas promotoras de tumores e inhibiendo el crecimiento tumoral [319]. A su vez, los TAM derivados de la ascitis del cáncer de ovario humano al ser expuestos a IFN- $\gamma$  pudieron ser repolarizados a un fenotipo similar a M1, los que aumentaron la proliferación de LT CD4 y potenciaron las propiedades citotóxicas de los LT CD8 [320]. Por otro lado, la combinación de un Ac agonista de CD40 con quimioterapia con gemcitabina en una pequeña cohorte de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático incurable quirúrgicamente favoreció la regresión tumoral en algunos pacientes y la reproducción de este tratamiento utilizando un modelo de adenocarcinoma ductal pancreático de ratón permitió dilucidar que la regresión tumoral requirió de macrófagos, que tras ser activados por CD40 se convirtieron en tumoricidas y facilitaron la depleción del estroma tumoral, pero no de los LT o la gemcitabina [267]. Asimismo, la administración de Poly I:C por vía subcutánea o intraperitoneal a ratones desafiados con tumores de carcinoma de pulmón de Lewis resultó en la regresión tumoral al convertir los TAM hacia un perfil supresor de tumores que secretaron citoquinas proinflamatorias, entre las cuales el TNF- $\alpha$  parece ser crucial dado que la respuesta antitumoral fue abolida en ratones TNF- $\alpha^{-/-}$  [321]. Sin embargo, en ninguna de estas investigaciones se ha ahondado en el rol de las células NK. Por lo tanto, en nuestro trabajo también tratamos los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* con Poly I:C, que como se mencionó previamente fue capaz de repolarizar TAM hacia perfiles proinflamatorios, con el objetivo de evaluar los efectos de la repolarización de los macrófagos sobre la funcionalidad de las células NK. Observamos que, en respuesta a este estímulo, los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* además de adquirir un fenotipo similar al de los macrófagos M1, se tornaron capaces de inducir la actividad citotóxica y la secreción de IFN- $\gamma$  por las células NK, citoquina crucial para la polarización de respuestas inmunes hacia el perfil Th1 y citotóxico [322, 82]. Consistentemente, Bellora y colaboradores demostraron que los macrófagos M0 y M2 repolarizados hacia el fenotipo M1 mediante el tratamiento con el agonista de TLR4 LPS, conducen a un aumento de la actividad citotóxica de las células NK contra la línea celular blanco K562 y contra CD inmaduras [323]. De esta manera, estos resultados sugieren que aquellas terapias orientadas a promover la repolarización de los TAM hacia un fenotipo similar al M1 también darían como resultado

una fuerte activación de las células NK, las que a su vez, podrían también promover las respuestas inmunes de tipo 1 y la edición de las CD inmaduras [324].

Posteriormente, dado que los TAM representan la población leucocitaria mayoritaria del infiltrado de varios tumores sólidos y se cree que en el microentorno del tumor están polarizados predominantemente hacia un fenotipo M2 protumoral asociado con la progresión tumoral y la supervivencia reducida en pacientes con cáncer [325], y con el objeto de validar los resultados previamente obtenidos mediante el empleo de un sistema experimental *in vitro*, nos propusimos evaluar las consecuencias de la interacción de los TAM provenientes de un contexto patológico con las células NK de individuos sanos. En particular nos centramos en el estudio de esta interacción en el contexto del CCR, dado que mediante el empleo de la plataforma bioinformática GEPIA observamos que los CCR de células claras (el principal tipo de CCR) estos tumores se encuentran altamente infiltrados por células CD68<sup>+</sup> (marcador asociado a macrófagos), y que CD68 correlaciona positivamente principalmente con los marcadores de M2 CD206 y MARCO, lo que constituye una evidencia, aunque indirecta, acerca del perfil mayoritariamente antiinflamatorio de los TAM en CCR. Consistentemente con la noción de que el microentorno del tumor promueve la polarización de los TAM predominantemente hacia un fenotipo M2, aquí demostramos que las muestras de nefrectomías de pacientes con CCR se caracterizan por un alto porcentaje de infiltrado de células CD68<sup>+</sup> que a su vez sobreexpresan el marcador CD206 (no analizamos la expresión de MARCO), respecto a los observado en el parénquima adyacente al tumor, validando en parte los resultados obtenidos previamente mediante el estudio *in silico*. Sin embargo, observamos también niveles de expresión del marcador de macrófagos M1 CD274 similares a los detectados en macrófagos del parénquima adyacente al tumor, por lo que nuestros resultados indicarían que los TAM de CCR presentan un fenotipo híbrido M1/M2. Fenotipos híbridos M1/M2 también se han detectado en TAM de fibrosarcomas murinos [326], adenocarcinoma de pulmón murinos [227] y tumores pancreáticos humanos [327]. La coexpresión de marcadores de macrófagos M1 y M2 podría interpretarse como la adquisición por parte de los macrófagos en un estado intermedio entre ambos fenotipos en respuesta a las múltiples señales del microambiente. Este fenómeno de plasticidad fenotípica ha sido estudiado *in vitro* por Smith y colegas, quienes emplearon estímulos mixtos LPS/IFN- $\gamma$  y/o IL-4/IL-13 ya sea simultánea o secuencialmente, para diferenciar



macrófagos murinos derivados de la médula ósea y estudiaron la regulación del fenotipo de macrófagos. Estos autores reportaron que en presencia de estímulos mixtos, los macrófagos adoptan un fenotipo híbrido M1/M2 dependiente de la fuerza relativa de los estímulos presentes, pero con el tiempo las células progresan finalmente hacia un fenotipo M2 [328]. Consistentemente, otros autores demostraron que los macrófagos activados hacia el perfil M1 mediante la exposición a bacterias, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$ , comienzan a expresar marcadores asociados con un fenotipo antiinflamatorio M2 luego del tratamiento posterior con IL-4 o IL-10 [172, 329]. Asimismo, otros investigadores también han detectado este mismo fenotipo híbrido M1/M2 en muestras de nefrectomías de pacientes con CCR, aunque mediante el empleo de técnicas histológicas y midiendo otros receptores de superficie para definir las poblaciones de macrófagos M1 y M2 (CD11c y CD163, respectivamente) [330].

Al analizar la interacción de los TAM aislados de CCR con células NK aisladas de sangre periférica de donadores sanos, encontramos otra diferencia respecto a los macrófagos M2 diferenciados *in vitro*, dado que los TAM, a diferencia de los M2, no afectaron la degranulación de las células NK contra las células blanco K562. Sin embargo, podemos afirmar que los TAM poseen propiedades inhibitorias similares a los M2 diferenciados *in vitro* en cuanto a la inhibición de la producción de IFN- $\gamma$  por células NK activadas con citoquinas. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la noción de que en un contexto *in vivo* la medición de la expresión de biomarcadores sin determinar la actividad y/o función de los TAM no proporciona una imagen precisa de la programación de los macrófagos. Asimismo, hemos demostrado que al igual que los macrófagos M2 diferenciados *in vitro*, los TAM de CCR pueden ser repolarizados empleando el agonista de TLR3 Poly I:C hacia un perfil proinflamatorio que promueve las funciones tumoricidas de las células NK. Teniendo en cuenta que actualmente están en curso varios ensayos clínicos orientados a la repolarización de los macrófagos intratumorales en diversos tipos de tumores, como cáncer de páncreas avanzado, cáncer de pulmón, melanoma metastásico, glioma maligno recurrente y metástasis cerebrales, carcinoma hepatocelular avanzado/metastásico, cáncer colorrectal mutante KRAS en estadio IV, neuroblastoma y linfoma difuso de células B resistentes a la terapia convencional [267, 331, 332], nuestros resultados abren la posibilidad de estudiar si en pacientes con CCR inclinar el equilibrio de los macrófagos hacia un fenotipo antitumoral aparece como posible opción terapéutica.

En último lugar, investigamos las consecuencias de la interacción de macrófagos antiinflamatorios-células NK en un sistema murino, con el objetivo final de estudiar si dicha interacción afecta de alguna manera el crecimiento tumoral. Por lo tanto, extendimos el estudio a un modelo murino *in vivo* de CCR desafiando a los ratones con la línea de tumor renal Renca y depletamos específicamente los TAM mediante la inyección por vía intratumoral de liposomas con clodronato. Demostramos por primera vez que los TAM murinos promueven el crecimiento de tumores renales Renca y que su depleción retrasa significativamente el volumen tumoral. Es importante destacar, que en nuestro sistema experimental el tratamiento con los liposomas con clodronato por vía intra-tumoral no alteró el número de macrófagos en bazo, ni la cantidad de M-MDSC ni G-MDSC infiltrantes en tumor, células que también son reconocidas por perturbar la inmunovigilancia y promover la progresión tumoral [333]. Concordantemente, el tratamiento con clodronato encapsulado en liposomas, pero no el clodronato libre, depleta eficientemente los TAM de teratocarcinomas F9 y rhabdomyosarcomas humanos A-673 inyectados en ratones, inhibe el crecimiento tumoral y reduce drásticamente la densidad de vasos sanguíneos en el tejido tumoral, obteniéndose los efectos más robustos cuando se administra en conjunto con Ac anti-VEGF [229]. A su vez, la depleción de TAM de cáncer de pulmón murino a través de la administración de liposomas con clodronato retarda el crecimiento tumoral [227] e inhibe las metástasis óseas y musculares [334], mientras que aumenta el efecto del sorafenib en modelos murinos de cáncer de hígado mediante efectos antimetastásicos y antiangiogénicos [335]. Además, la depleción de TAM sensibiliza a la leucemia linfocítica crónica a la apoptosis inhibiendo la progresión de la enfermedad [226]. Sin embargo, en ninguno de los trabajos mencionados se ahonda en el efecto de la depleción de los TAM sobre el resto del infiltrado inmune. En cambio, en nuestro sistema evaluamos, en particular, el efecto de la depleción de los TAM de los tumores Renca sobre el estado fenotípico de las células NK. Se ha demostrado que en el contexto de tumores e infecciones crónicas, las células NK desarrollan un estado de agotamiento similar al de las células T exhaustas, mostrando funciones efectoras deficientes y un fenotipo alterado [95, 98, 336–339]. Tal agotamiento parece ser el resultado de un proceso activo, ya que células NK murinas transferidas adoptivamente a ratones con leucemia perdieron rápidamente la producción de IFN- $\gamma$  seguido de la pérdida de la actividad citotóxica [340]. Aunque los mecanismos exactos que conducen al

agotamiento de las células NK aún no están bien definidos, estudios recientes con células NK humanas han demostrado que las células NK exhaustas presentan una firma fenotípica característica. Por un lado, regulan negativamente ciertos receptores activadores como NKG2D, CD16 y los NCR NKp30, NKp44 y NKp46, mientras que regulan positivamente algunos receptores inhibitorios como Tim-3 y PD-1 [341, 342]. Por ejemplo, se observa una regulación negativa de la expresión de NKG2D en células NK de pacientes con varios tipos de neoplasias malignas, como cáncer de páncreas, cáncer gástrico y cáncer colorrectal [96]. A su vez, pacientes con melanoma metastásico presentan células NK funcionalmente deterioradas o exhaustas cuyos niveles de expresión de Tim-3 correlacionan con la etapa de la enfermedad y el bloqueo de Tim-3 revierte este fenotipo mejorando la funcionalidad de las células NK [343]. Por otro lado, PD-1 se encuentra regulado positivamente en las células NK de pacientes con sarcoma de Kaposi [344], mieloma múltiple [345] y carcinoma de ovario [346], asociándose a una degranulación, secreción de citoquinas y capacidad proliferativa en respuesta a citoquinas disminuídas. En nuestro sistema experimental, observamos que luego del tratamiento con liposomas con clodronato disminuyó la cantidad de células NK infiltrantes de tumor que expresan Tim-3 y PD-1, mientras que aumentaron las que expresan el receptor activador NKG2D, lo que sugiere que la depleción de TAM disminuiría la cantidad de células NKIT con fenotipo exhausto. Además, en concordancia con nuestros resultados, MacFarlane y colaboradores reportaron que pacientes con CCR presentan células NK de sangre periférica que sobreexpresan PD-1 y que dicha expresión correlaciona con el estadio de la enfermedad, mientras que poco después de la resección quirúrgica del tumor primario la expresión de PD-1 se redujo significativamente [347]. Encontramos además, que la depleción de TAM disminuyó la proporción de células NKIT con fenotipo terminalmente diferenciado CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>. Estudios anteriores demostraron que las células NK con baja expresión de CD27 tienen un umbral de activación elevado debido que expresan mayores niveles de receptores inhibitorios y exhiben funciones efectoras y secreción de citoquinas reducidas en comparación con las células NK con alta expresión de CD27 [348], mientras que ratones deficientes genéticamente en CD27 presentan células NK con actividad citotóxica y producción de citoquinas deterioradas [349]. En conjunto, estos resultados sugieren que los TAM favorecen la adquisición de un fenotipo exhausto por parte de las células NKIT definido por varios marcadores de superficie celular. Concordantemente, un trabajo reciente

demuestra que tumores de pacientes con CCR de células claras atraen macrófagos e inducen su polarización hacia el perfil M2, lo que a su vez induce la adquisición de un fenotipo exhausto en células T definido por la menor producción de citoquinas proinflamatorias y el aumento de la expresión de PD-1 y Tim-3 [243].

Finalmente, demostramos que la depleción de TAM aumentó el porcentaje de células NK productoras de IFN- $\gamma$  y que estas células expresaron mayores niveles del factor de transcripción T-bet, reforzando la idea de que los TAM suprimen la funcionalidad de las células NK pero que el fenotipo exhausto de estas células es reversible, al menos mediante la depleción de los macrófagos. Consistentemente, se ha demostrado la reversión parcial del fenotipo exhausto de las células NK en un modelo de melanoma murino mediante el estímulo a través del receptor activador NKG2D o con citoquinas [340]. En conjunto, creemos que en un contexto fisiológico, el microambiente del tumor renal podría estar favoreciendo el perfilado de los macrófagos residentes así como el de los nuevos monocitos que se infiltran desde circulación hacia macrófagos con características protumorales cuya expansión suprime las funciones efectoras de las células NK.

En resumen, estudios anteriores han demostrado por separado que las células NK pierden sus capacidades tumoricidas en el microambiente tumoral y que los TAM suprimen las respuestas inmunitarias antitumorales y ayudan en la progresión del tumor. En este trabajo de Tesis Doctoral, demostramos un nuevo aspecto inmunosupresor de los macrófagos antiinflamatorios M2 y los TAM de CCR asociado a su capacidad para suprimir directamente las funciones efectoras de las células NK y alterar su fenotipo, contribuyendo a la progresión tumoral. Los resultados obtenidos con muestras de nefrectomías de pacientes con CCR se suman a los estudios existentes que demostraron una asociación entre el número de TAM con fenotipo M2 y el mal pronóstico de la enfermedad y que el cocultivo directo de macrófagos M0 con células CCR induce el fenotipo de macrófagos tipo M2 [222], reforzando nuestras observaciones en el modelo murino de CCR. Asimismo, demostramos que tanto los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* como los TAM de CCR pueden ser repolarizados hacia estados proinflamatorios M1 que favorecen las funciones tumoricidas de las células NK. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de considerar a los TAM de CCR como potencial blanco para inmunoterapia antitumoral, donde la reprogramación o la

depleción terapéutica de los macrófagos similares a M2 constituyen enfoques prometedores para el tratamiento del CCRm o del tumor primario de pacientes que no puedan ser tratados con cirugía. A su vez, abren la posibilidad de estudiar si la repolarización o la depleción de los TAM en el CCR podrían mejorar la eficacia de las de las estrategias de inmunoterapia basadas en el empleo de ICB (Ipilimumab, Nivolumab, Pembrolizumab).

## Conclusiones

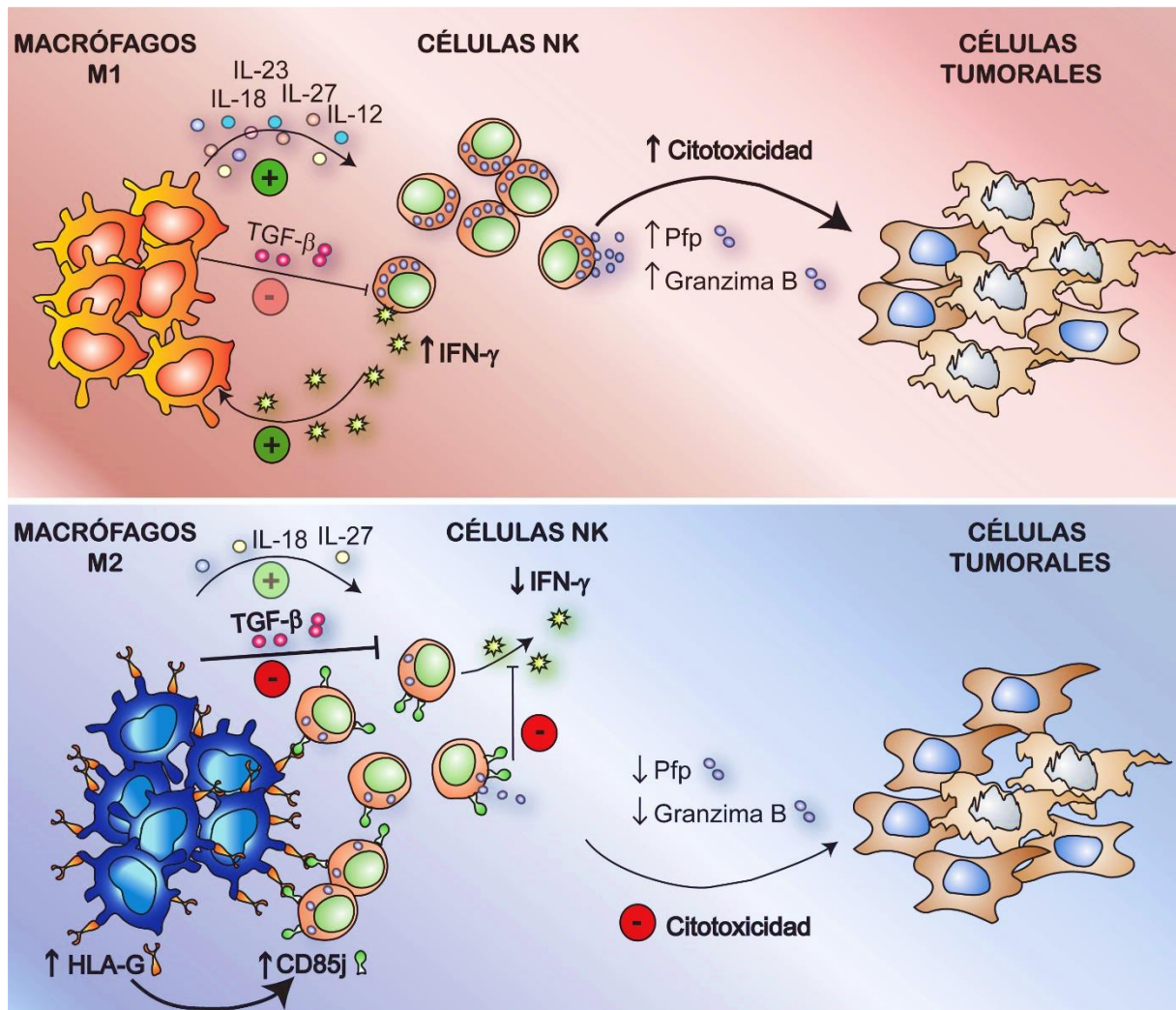
---

Nuestros hallazgos permitieron demostrar que:

- ❖ Los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* inhiben la activación y las funciones efectoras de las células NK humanas.
- ❖ Suprimen la producción de IFN- $\gamma$  a través de un mecanismo que involucra TGF- $\beta$  soluble.
- ❖ Suprimen la citotoxicidad de las células NK a través de un mecanismo dependiente de contacto y que involucra la inducción del receptor inhibitorio CD85j (ILT-2).
- ❖ Disminuyen la cantidad de granzima B y Pfp en los gránulos secretorios de células NK CD56<sup>dim</sup> sin afectar la expresión de los receptores de muerte celular FasL y TRAIL ni la formación de conjugados entre células efectoras y células blanco.
- ❖ Generan células NK hiporrespondedoras que persisten en ese estado varias horas después de la eliminación de los macrófagos M2.
- ❖ Los TAM aislados de muestras de pacientes con CCR presentan un fenotipo híbrido M1/M2 e inhiben la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK sin suprimir su actividad citotóxica.
- ❖ Tanto los macrófagos M2 diferenciados *in vitro* como los TAM de CCR pueden “repolarizarse” mediante el empleo del agonista de TLR3 Poly I:C hacia estados proinflamatorios que no suprimen las funciones efectoras de las células NK o que incluso las potencian.
- ❖ Los TAM de tumores renales Renca, línea celular modelo de CCR murino, promueven el crecimiento del tumor y regulan negativamente la producción de IFN- $\gamma$  de células NK murinas.
- ❖ La depleción de los TAM mediante la administración de liposomas de clodronato disminuye el crecimiento de tumores Renca y el porcentaje de células NKIT con fenotipo exhausto y terminalmente diferenciado.

En conjunto, a lo largo de este trabajo de Tesis, utilizamos una combinación de estrategias experimentales *in vitro*, *in silico* e *in vivo* que nos permitieron describir un

novedoso rol regulatorio de los macrófagos antiinflamatorios sobre las células NK en el contexto de la respuesta inmune antitumoral. Los mecanismos celulares subyacentes a la inmunosupresión por parte de los macrófagos M2 sobre las funciones efectoras de las células NK se ilustran en la **Figura 26**.



**Figura 26.** Modelo que ilustra los mecanismos celulares subyacentes a la interacción de macrófagos M1 o M2 con células NK y la inmunosupresión mediada por estos últimos.

Asimismo, demostramos que los TAM en el CCR favorecen el crecimiento del tumor y proponemos un nuevo circuito regulatorio donde las células NKIT en un tumor altamente infiltrado por macrófagos con fenotipo predominantemente antiinflamatorio presentan funciones efectoras disminuidas que favorecen el escape tumoral. En este contexto, nuestros hallazgos respaldan la idea de que la depleción o la repolarización de los TAM

podrían cobrar particular importancia como estrategias que contrarresten la inmunosupresión y mejoren la eficacia de las nuevas inmunoterapias dirigidas que actualmente son empleadas para atenuar la progresión del CCR.



## Referencias bibliográficas

---

1. Robertson MJ, Ritz J. *Biology and clinical relevance of human natural killer cells*. Blood. 1990;76:2421–38.
2. Greenberg AH, Hudson L, Shen L, Roitt IM. *Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to a “null” lymphoid cell*. Nature New Biol. 1973;242:111–3.
3. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. *Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity*. Int J Cancer. 1975;16:216–29.
4. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. *“Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype*. Eur J Immunol. 1975;5:112–7.
5. Bukowski JF, Warner JF, Dennert G, Welsh RM. *Adoptive transfer studies demonstrating the antiviral effect of natural killer cells in vivo*. J Exp Med. 1985;161:40–52.
6. Bukowski JF, Woda BA, Habu S, Okumura K, Welsh RM. *Natural killer cell depletion enhances virus synthesis and virus-induced hepatitis in vivo*. J Immunol. 1983;131:1531–8.
7. Stein-Streilein J, Guffee J. *In vivo treatment of mice and hamsters with antibodies to asialo GM1 increases morbidity and mortality to pulmonary influenza infection*. J Immunol. 1986;136:1435–41.
8. Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. *Severe Herpesvirus Infections in an Adolescent without Natural Killer Cells*. N Engl J Med. 1989;320:1731–5.
9. Haller O, Hansson M, Kiessling R, Wigzell H. *Role of non-conventional natural killer cells in resistance against syngeneic tumour cells in vivo*. Nature. 1977;270:609–11.
10. Barlozzari T, Leonhardt J, Wiltrout RH, Herberman RB, Reynolds CW. *Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases*. J Immunol. 1985;134:2783–9.
11. Hanna N, Burton RC. *Definitive evidence that natural killer (NK) cells inhibit experimental tumor metastases in vivo*. J Immunol. 1981;127:1754–8.
12. Trapani JA, Thia KYT, Andrews M, Davis ID, Gedye C, Parente P, et al. *Human perforin mutations and susceptibility to multiple primary cancers*. Oncoimmunology. 2013;2. doi:10.4161/onci.24185.
13. Kadish AS, Doyle AT, Steinhauer EH, Ghossein NA. *Natural cytotoxicity and interferon production in human cancer: deficient natural killer activity and normal interferon production in patients with advanced disease*. J Immunol. 1981;127:1817–22.
14. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. *Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population*. Lancet. 2000;356:1795–9.
15. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. *Innate Lymphoid Cells: 10 Years On*. Cell. 2018;174:1054–66.
16. Prlic M, Blazar BR, Farrar MA, Jameson SC. *In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells*. J Exp Med. 2003; 21;197(8):967-76.
17. Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. *Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions*. J Immunol. 2004;172:864–70.
18. Sun JC, Beilke JN, Bezman NA, Lanier LL. *Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection*. J Exp Med. 2011;208:357–68.

19. Koka R, Burkett PR, Chien M, Chai S, Chan F, Lodolce JP, et al. *Interleukin (IL)-15R[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15R[alpha]-deficient mice*. J Exp Med. 2003;197:977–84.
20. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. *The biology of human natural killer-cell subsets*. Trends Immunol. 2001;22:633–40.
21. Allan DSJ, Cerdeira AS, Ranjan A, Kirkham CL, Aguilar OA, Tanaka M, et al. *Transcriptome analysis reveals similarities between human blood CD3 – CD56 bright cells and mouse CD127 + innate lymphoid cells*. Sci Rep. 2017;7:3501.
22. Shibuya A, Nagayoshi K, Nakamura K, Nakauchi H. *Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells*. Blood. 1995; 15;85(12):3538-46.
23. Yu H, Fehniger TA, Fuchshuber P, Thiel KS, Vivier E, Carson WE, et al. *Flt3 Ligand Promotes the Generation of a Distinct CD34+Human Natural Killer Cell Progenitor That Responds to Interleukin-15*. Blood. 1998;92:3647–57.
24. Becknell B, Caligiuri MA. *Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells*. Adv Immunol. Elsevier; 2005. p. 209–39. doi:10.1016/S0065-2776(04)86006-1.
25. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, Mao HC, Ferketich AK, Nuovo GJ, et al. *A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56brightNatural Killer Cells*. Immunity. 2005;22:295–304.
26. Res P, Martinez-Caceres E, Jaleco AC, Staal F, Noteboorn E, Weijer K, et al. *CD34+CD38dim Cells in the HumanThymus Can Differentiate Into T, Natural Killer, and Dendritic Cells But Are Distinct From Pluripotent Stem Cells*. Blood. 1996 ; 15;87(12):5196-206.
27. Moroso V, Famili F, Papazian N, Cupedo T, Laan LJW van der, Kazemier G, et al. *NK cells can generate from precursors in the adult human liver*. Eur J Immunol. 2011;41:3340–50.
28. Carrega P, Ferlazzo G. *Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues*. Front Immunol. 2012;3:347.
29. Sojka DK, Tian Z, Yokoyama WM. *Tissue-Resident Natural Killer Cells and Their Potential Diversity*. Semin Immunol. 2014;26:127–31.
30. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, et al. *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood. 2003;101:3052–7.
31. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol. 2004;5:1260–5.
32. Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR, Phillips JH. *The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes*. J Immunol. 1986;136:4480–6.
33. Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, et al. *The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic*. J Immunol. 2004;172:1455–62.
34. Caligiuri MA, Zmuidzinas A, Manley TJ, Levine H, Smith KA, Ritz J. *Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors*. J Exp Med. 1990;171:1509–26.
35. Caligiuri MA, Murray C, Robertson MJ, Wang E, Cochran K, Cameron C, et al. *Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2*. J Clin Invest. 1993;91:123–32.

36. Baume DM, Robertson MJ, Levine H, Manley TJ, Schow PW, Ritz J. *Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells*. Eur J Immunol. 1992;22:1–6.
37. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset*. Blood. 2001;97:3146–51.
38. Caligiuri MA. *Human natural killer cells*. Blood. 2008;112:461–9.
39. Jacobs R, Stoll M, Stratmann G, Leo R, Link H, Schmidt RE. *CD16- CD56+ natural killer cells after bone marrow transplantation*. Blood. 1992;79:3239–44.
40. Romagnani C, Juelke K, Falco M, Morandi B, D’Agostino A, Costa R, et al. *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation*. J Immunol. 2007;178:4947–55.
41. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park I, et al. *CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets*. Blood. 2010;115:274–81.
42. Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, et al. *Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education*. Blood. 2010;116:3853–64.
43. Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, Parente E, Gruen J, Morandi B, et al. *CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells*. Blood. 2010;116:1299–307.
44. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. *Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program*. Blood. 2009;113:5488–96.
45. Geiger TL, Sun JC. *Development and maturation of natural killer cells*. Curr Opin Immunol. 2016;39:82–9.
46. Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. *Adaptive Immune Features of Natural Killer Cells*. Nature. 2009;457:557–61.
47. Lopez-Vergès S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, et al. *Expansion of a unique CD57+NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection*. Proc Natl Acad Sci USA. 2011;108:14725–32.
48. Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. *Cytokine-induced memory-like natural killer cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106:1915–9.
49. Romee R, Schneider SE, Leong JW, Chase JM, Keppel CR, Sullivan RP, et al. *Cytokine activation induces human memory-like NK cells*. Blood. 2012;120:4751–60.
50. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A. *Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors*. J Exp Med. 2012;209:2351–65.
51. Romee R, Rosario M, Berrien-Elliott MM, Wagner JA, Jewell BA, Schappe T, et al. *Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia*. Sci Transl Med. 2016;8:357ra123.
52. O’Sullivan TE, Sun JC, Lanier LL. *Natural Killer Cell Memory*. Immunity. 2015;43:634–45.
53. Zwirner NW, Domaica CI. *Cytokine regulation of natural killer cell effector functions*. BioFactors. 2010;36:274–88.
54. Viant C, Fenis A, Chicanne G, Payrastra B, Ugolini S, Vivier E. *SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells*. Nat Commun. 2014;5:5108.
55. Yusa S-I, Campbell KS. *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-2 (SHP-2) can play a direct role in the inhibitory function of killer cell Ig-like receptors in human NK cells*. J Immunol. 2003;170:4539–47.

56. Long EO. *Regulation of immune responses through inhibitory receptors*. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:875–904.
57. Braud VM, Allan DS, O’Callaghan CA, Söderström K, D’Andrea A, Ogg GS, et al. *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C*. *Nature*. 1998;391:795–9.
58. Vance RE, Kraft JR, Altman JD, Jensen PE, Raulet DH. *Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b)*. *J Exp Med*. 1998;188:1841–8.
59. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, Shirakihara Y, Colonna M, Braud VM, et al. *Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8856–61.
60. Morel E, Bellón T. *HLA Class I Molecules Regulate IFN- $\gamma$  Production Induced in NK Cells by Target Cells, Viral Products, or Immature Dendritic Cells through the Inhibitory Receptor ILT2/CD85j*. *J Immunol*. 2008;181:2368–81.
61. Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P, Dausset J, et al. *The immunotolerance role of HLA-G*. *Semin Cancer Biol*. 1999;9:3–12.
62. da Silva IL, Montero-Montero L, Ferreira E, Quintanilla M. *New Insights Into the Role of Qa-2 and HLA-G Non-classical MHC-I Complexes in Malignancy*. *Front Immunol*. 2018;9. doi:10.3389/fimmu.2018.02894.
63. Takai T, Nakamura A, Endo S. *Role of PIR-B in Autoimmune Glomerulonephritis*. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011. doi:10.1155/2011/275302.
64. Loumagne L, Baudhuin J, Favier B, Montespan F, Carosella ED, Rouas-Freiss N. *In vivo evidence that secretion of HLA-G by immunogenic tumor cells allows their evasion from immunosurveillance*. *Int J Cancer*. 2014;135:2107–17.
65. Ljunggren HG, Kärre K. *In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition*. *Immunol Today*. 1990;11:237–44.
66. Raulet DH, Guerra N. *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors*. *Nat Rev Immunol*. 2009;9:568–80.
67. Hatjiharissi E, Xu L, Santos DD, Hunter ZR, Ciccarelli BT, Verselis S, et al. *Increased natural killer cell expression of CD16, augmented binding and ADCC activity to rituximab among individuals expressing the Fc $\gamma$ R11a-158 V/V and V/F polymorphism*. *Blood*. 2007;110:2561–4.
68. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, et al. *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. *J Exp Med*. 2003;198:557–67.
69. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, et al. *NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy*. *Immunity*. 2008;28:571–80.
70. Smyth MJ, Swann J, Cretney E, Zerafa N, Yokoyama WM, Hayakawa Y. *NKG2D function protects the host from tumor initiation*. *J Exp Med*. 2005;202:583–8.
71. Iguchi-Manaka A, Kai H, Yamashita Y, Shibata K, Tahara-Hanaoka S, Honda S, et al. *Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor*. *J Exp Med*. 2008;205:2959–64.
72. Sivori S, Pende D, Bottino C, Marcenaro E, Pessino A, Biassoni R, et al. *NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells*. *Eur J Immunol*. 1999;29:1656–66.
73. Kruse PH, Matta J, Ugolini S, Vivier E. *Natural cytotoxicity receptors and their ligands*. *Immunol Cell Biol*. 2014;92:221–9.

74. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. *The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease*. Front Immunol. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.00909.
75. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. *TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When?*. Front Immunol. 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00105.
76. Girart MV, Fuertes MB, Domaica CI, Rossi LE, Zwirner NW. *Engagement of TLR3, TLR7, and NKG2D regulate IFN-gamma secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12*. J Immunol. 2007;179:3472–9.
77. Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, et al. *CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells*. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101:10116–21.
78. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U. *Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1*. J Immunol. 1995;155:1066–73.
79. Ghiringhelli F, Ménard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. *CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-β-dependent manner*. J Exp Med. 2005;202:1075–85.
80. Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, et al. *Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire*. J Immunol. 2001;166:6477–82.
81. Frey M, Packianathan NB, Fehniger TA, Ross ME, Wang WC, Stewart CC, et al. *Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets*. J Immunol. 1998;161:400–8.
82. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, Egeter O, Ziegler H, Reusch U, et al. *Natural Killer Cells Activated by MHC Class II Targets Prime Dendritic Cells to Induce Protective CD8 T Cell Responses*. Immunity. 2003;19:561–9.
83. Tosi D, Valenti R, Cova A, Sovena G, Huber V, Pilla L, et al. *Role of Cross-Talk between IFN-α-Induced Monocyte-Derived Dendritic Cells and NK Cells in Priming CD8+ T Cell Responses against Human Tumor Antigens*. J Immunol. 2004;172:5363–70.
84. Orange JS. *Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse*. Nat Rev Immunol. 2008;8:713–25.
85. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. *CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity*. J Immunol Methods. 2004;294:15–22.
86. Smyth MJ, Thia KY, Cretney E, Kelly JM, Snook MB, Forbes CA, et al. *Perforin is a major contributor to NK cell control of tumor metastasis*. J Immunol. 1999;162:6658–62.
87. van den Broek ME, Kägi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, et al. *Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice*. J Exp Med. 1996;184:1781–90.
88. Wallin RPA, Screpanti V, Michaëlsson J, Grandien A, Ljunggren H-G. *Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity*. Eur J Immunol. 2003;33:2727–35.
89. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrout RH, Sedger LM, Kayagaki N, et al. *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis*. J Exp Med. 2001;193:661–70.
90. Sun C, Sun H, Zhang C, Tian Z. *NK cell receptor imbalance and NK cell dysfunction in HBV infection and hepatocellular carcinoma*. Cell Mol Immunol. 2015;12:292–302.
91. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, et al. *Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma*. Neoplasia. 2004;6:558–68.

92. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee H-G, et al. *Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia*. *Blood*. 2003;102:1389–96.
93. Du C, Bevers J, Cook R, Lombana TN, Rajasekaran K, Matsumoto M, et al. *MICA immune complex formed with alpha 3 domain-specific antibody activates human NK cells in a Fc-dependent manner*. *J ImmunoTherapy of Cancer*. 2019;7:207.
94. Castriconi R, Cantoni C, Chiesa MD, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, et al. *Transforming growth factor  $\beta$ 1 inhibits expression of Nkp30 and NKG2D receptors: Consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:4120–5.
95. Mamessier E, Sylvain A, Thibult M-L, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, et al. *Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity*. *J Clin Invest*. 2011;121:3609–22.
96. Peng Y-P, Zhu Y, Zhang J-J, Xu Z-K, Qian Z-Y, Dai C-C, et al. *Comprehensive analysis of the percentage of surface receptors and cytotoxic granules positive natural killer cells in patients with pancreatic cancer, gastric cancer, and colorectal cancer*. *J Transl Med*. 2013;11:262.
97. Garcia-Iglesias T, Del Toro-Arreola A, Albarran-Somoza B, Del Toro-Arreola S, Sanchez-Hernandez PE, Ramirez-Dueñas MG, et al. *Low Nkp30, Nkp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions*. *BMC Cancer*. 2009;9:186.
98. Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, et al. *High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer*. *Oncoimmunology*. 2017;6:e1264562.
99. Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M, Campana D. *Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells*. *J Clin Invest*. 2019;129:2094–106.
100. Barrow AD, Colonna M. *Exploiting NK Cell Surveillance Pathways for Cancer Therapy*. *Cancers (Basel)*. 2019;11. doi:10.3390/cancers11010055.
101. Vey N, Karlin L, Sadot-Lebouvier S, Broussais F, Berton-Rigaud D, Rey J, et al. *A phase 1 study of lirilumab (antibody against killer immunoglobulin-like receptor antibody KIR2D; IPH2102) in patients with solid tumors and hematologic malignancies*. *Oncotarget*. 2018;9:17675–88.
102. Yalniz FF, Daver N, Rezvani K, Kornblau S, Ohanian M, Borthakur G, et al. *A Pilot Trial of Lirilumab With or Without Azacitidine for Patients With Myelodysplastic Syndrome*. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2018;18:658-663.e2.
103. Gautier EL, Shay T, Miller J, Greter M, Jakubzick C, Ivanov S, et al. *Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages*. *Nat Immunol*. 2012;13:1118–28.
104. Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. *Macrophage biology in development, homeostasis and disease*. *Nature*. 2013;496:445–55.
105. Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, et al. *Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors*. *Nature*. 2015;518:547–51.
106. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. *Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages*. *Science*. 2010;330:841–5.
107. Bain CC, Bravo-Blas A, Scott CL, Perdiguero EG, Geissmann F, Henri S, et al. *Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice*. *Nat Immunol*. 2014;15:929–37.
108. Munro DAD, Hughes J. *The Origins and Functions of Tissue-Resident Macrophages in Kidney Development*. *Front Physiol*. 2017;8. doi:10.3389/fphys.2017.00837.

109. Stremmel C, Schuchert R, Wagner F, Thaler R, Weinberger T, Pick R, et al. *Yolk sac macrophage progenitors traffic to the embryo during defined stages of development*. *Nat Commun*. 2018;9:1–14.
110. Röszer T. *Understanding the Biology of Self-Renewing Macrophages*. *Cells*. 2018;7:103.
111. Ginhoux F, Williams M. *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. *Immunity*. 2016;44:439–49.
112. Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. *Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects*. *Blood*. 2002;99:111–20.
113. Hua L, Shi J, Shultz LD, Ren G. *Genetic Models of Macrophage Depletion*. *Methods Mol Biol*. 2018;1784:243–58.
114. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. *J Immunol*. 1992;148:2207–16.
115. Savill J, Hogg N, Ren Y, Haslett C. *Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis*. *J Clin Invest*. 1992;90:1513–22.
116. Savill J, Dransfield I, Hogg N, Haslett C. *Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis*. *Nature*. 1990;343:170–3.
117. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA, et al. *C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells*. *J Exp Med*. 2001;194:781–95.
118. Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD. *Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells*. *Nature*. 1998;392:505–9.
119. Roberts AW, Lee BL, Deguine J, John S, Shlomchik MJ, Barton GM. *Tissue-resident Macrophages are Locally Programmed for Silent Clearance of Apoptotic Cells*. *Immunity*. 2017;47:913-927.e6.
120. Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF*. *J Clin Invest*. 1998;101:890–8.
121. Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK. *Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- $\kappa$ B pathway*. *Int Immunol*. 2000;12:1539–46.
122. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. *Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation*. *Nature*. 2002;418:191–5.
123. Ishii KJ, Suzuki K, Coban C, Takeshita F, Itoh Y, Matoba H, et al. *Genomic DNA released by dying cells induces the maturation of APCs*. *J Immunol*. 2001;167:2602–7.
124. Elliott MR, Chekeni FB, Trampont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, et al. *Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance*. *Nature*. 2009;461:282–6.
125. Piccinini AM, Midwood KS. *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling*. *Mediators Inflamm*. 2010;2010.
126. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. *Macrophage receptors and immune recognition*. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:901–44.
127. Lukacs GL, Rotstein OD, Grinstein S. *Phagosomal acidification is mediated by a vacuolar-type H(+)-ATPase in murine macrophages*. *J Biol Chem*. 1990;265:21099–107.

128. Stuart LM, Ezekowitz RAB. *Phagocytosis: Elegant Complexity*. *Immunity*. 2005;22:539–50.
129. West AP, Brodsky IE, Rahner C, Woo DK, Erdjument-Bromage H, Tempst P, et al. *TLR signaling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS*. *Nature*. 2011;472:476–80.
130. Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ. *Acute phase reaction and acute phase proteins*. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2005;6:1045–56.
131. Arango Duque G, Descoteaux A. *Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases*. *Front Immunol*. 2014;5. doi:10.3389/fimmu.2014.00491.
132. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. *J Immunol*. 2000;164:6166–73.
133. Hu X, Ivashkiv LB. *Cross-regulation of Signaling Pathways by Interferon- $\gamma$ : Implications for Immune Responses and Autoimmune Diseases*. *Immunity*. 2009;31:539–50.
134. Boehm U, Klamp T, Groot M, Howard JC. *Cellular responses to interferon-gamma*. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:749–95.
135. Schroder K, Sweet MJ, Hume DA. *Signal integration between IFN $\gamma$  and TLR signalling pathways in macrophages*. *Immunobiology*. 2006;211:511–24.
136. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. *Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages*. *J Exp Med*. 1990;171:35–47.
137. Morris KR, Lutz RD, Choi H-S, Kamitani T, Chmura K, Chan ED. *Role of the NF- $\kappa$ B Signaling Pathway and  $\kappa$ B cis-Regulatory Elements on the IRF-1 and iNOS Promoter Regions in Mycobacterial Liparabinomannan Induction of Nitric Oxide*. *Infection and Immunity*. 2003;71:1442–52.
138. MacMicking J, Xie Q, Nathan C. *Nitric oxide and macrophage function*. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:323–50.
139. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. *J Exp Med*. 1992;175:1111–22.
140. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. *Trends Immunol*. 2004;25:677–86.
141. Celhar T, Pereira-Lopes S, Thornhill SI, Lee HY, Dhillon MK, Poidinger M, et al. *TLR7 and TLR9 ligands regulate antigen presentation by macrophages*. *Int Immunol*. 2016;28:223–32.
142. Atri C, Guerfali FZ, Laouini D. *Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases*. *Int J Mol Sci*. 2018;19. doi:10.3390/ijms19061801.
143. Heller NM, Qi X, Junttila IS, Shirey KA, Vogel SN, Paul WE, et al. *Type I IL-4Rs Selectively Activate IRS-2 to Induce Target Gene Expression in Macrophages*. *Sci Signal*. 2008;1:ra17–ra17.
144. Min B, Prout M, Hu-Li J, Zhu J, Jankovic D, Morgan ES, et al. *Basophils produce IL-4 and accumulate in tissues after infection with a Th2-inducing parasite*. *J Exp Med*. 2004;200:507–17.
145. Falcone FH, Dahinden CA, Gibbs BF, Noll T, Amon U, Hebestreit H, et al. *Human basophils release interleukin-4 after stimulation with Schistosoma mansoni egg antigen*. *Eur J Immunol*. 1996;26:1147–55.
146. Komai-Koma M, Brombacher F, Pushparaj PN, Arendse B, McSharry C, Alexander J, et al. *Interleukin-33 amplifies IgE synthesis and triggers mast cell degranulation via interleukin-4 in naïve mice*. *Allergy*. 2012;67:1118–26.
147. Wang M, Saxon A, Diaz-Sanchez D. *Early IL-4 production driving Th2 differentiation in a human in vivo allergic model is mast cell derived*. *Clin Immunol*. 1999;90:47–54.



148. Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, et al. *Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology*. *Immunity*. 2004;20:623–35.
149. Arnold L, Henry A, Poron F, Baba-Amer Y, van Rooijen N, Plonquet A, et al. *Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis*. *J Exp Med*. 2007;204:1057–69.
150. Jetten N, Verbruggen S, Gijbels MJ, Post MJ, De Winther MPJ, Donners MMPC. *Anti-inflammatory M2, but not pro-inflammatory M1 macrophages promote angiogenesis in vivo*. *Angiogenesis*. 2014;17:109–18.
151. Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. *Contribution of myeloid cell subsets to liver fibrosis in parasite infection*. *J Pathol*. 2013;229:186–97.
152. Hesse M, Modolell M, Flamme ACL, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al. *Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism*. *J Immunol*. 2001;167:6533–44.
153. Liu X, Liu J, Zhao S, Zhang H, Cai W, Cai M, et al. *Interleukin-4 Is Essential for Microglia/Macrophage M2 Polarization and Long-Term Recovery After Cerebral Ischemia*. *Stroke*. 2016;47:498–504.
154. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. *J Exp Med*. 1992;176:287–92.
155. Levings MK, Schrader JW. *IL-4 Inhibits the Production of TNF- $\alpha$  and IL-12 by STAT6-Dependent and -Independent Mechanisms*. *J Immunol*. 1999;162:5224–9.
156. Georgoudaki A-M, Prokopec KE, Boura VF, Hellqvist E, Sohn S, Östling J, et al. *Reprogramming Tumor-Associated Macrophages by Antibody Targeting Inhibits Cancer Progression and Metastasis*. *Cell Rep*. 2016;15:2000–11.
157. Anderson CF, Mosser DM. *A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage*. *J Leukoc Biol*. 2002;72:101–6.
158. Gerber JS, Mosser DM. *Reversing Lipopolysaccharide Toxicity by Ligating the Macrophage Fc $\gamma$  Receptors*. *J Immunol*. 2001;166:6861–8.
159. Ambarus CA, Santegoets KCM, Bon L van, Wenink MH, Tak PP, Radstake TRDJ, et al. *Soluble Immune Complexes Shift the TLR-Induced Cytokine Production of Distinct Polarized Human Macrophage Subsets towards IL-10*. *PLOS ONE*. 2012;7:e35994.
160. Anderson CF, Gerber JS, Mosser DM. *Modulating macrophage function with IgG immune complexes*. *J Endotoxin Res*. 2002;8:477–81.
161. Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. *Interleukin-10 Receptor Signaling through the JAK-STAT Pathway REQUIREMENT FOR TWO DISTINCT RECEPTOR-DERIVED SIGNALS FOR ANTI-INFLAMMATORY ACTION*. *J Biol Chem*. 1999;274:16513–21.
162. Couper KN, Blount DG, Riley EM. *IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection*. *J Immunol*. 2008;180:5771–7.
163. Hilgenberg E, Shen P, Dang VD, Ries S, Sakwa I, Fillatreau S. *Interleukin-10-producing B cells and the regulation of immunity*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2014;380:69–92.
164. Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Alves C, Sotto MN. *Role of mast cells as IL10 producing cells in paracoccidioidomycosis skin lesions*. *Mycopathologia*. 2006;162:331–5.

165. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BMJ, et al. *IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3*. J Immunol. 2007;178:4779–85.
166. Zizzo G, Hilliard BA, Monestier M, Cohen PL. *Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires M2c polarization and MerTK induction*. J Immunol. 2012;189:3508–20.
167. Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. *Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences*. J Immunol. 2005;175:342–9.
168. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, et al. *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. Immunity. 2014;41:14–20.
169. Porta C, Riboldi E, Ippolito A, Sica A. *Molecular and epigenetic basis of macrophage polarized activation*. Semin Immunol. 2015;27:237–48.
170. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. *Phenotypic, functional, and plasticity features of classical and alternatively activated human macrophages*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2015;53:676–88.
171. Ishii M, Wen H, Corsa CAS, Liu T, Coelho AL, Allen RM, et al. *Epigenetic regulation of the alternatively activated macrophage phenotype*. Blood. 2009;114:3244–54.
172. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. *Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in Cryptococcus neoformans infection*. MBio. 2013;4:e00264-00213.
173. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization*. Trends in Immunol. 2004;25:677–86.
174. Gratchev A, Kzhyshkowska J, Utikal J, Goerdts S. *Interleukin-4 and Dexamethasone Counterregulate Extracellular Matrix Remodelling and Phagocytosis in Type-2 Macrophages*. Scandinavian J Immunol. 2005;61:10–7.
175. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. *Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells*. Nat Immunol. 2007;8:950–7.
176. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. *Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells*. Nat Immunol. 2007;8:942–9.
177. Shahrara S, Pickens SR, Dorfleutner A, Pope RM. *IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis*. J Immunol. 2009;182:3884–91.
178. Feng B, Jiao P, Nie Y, Kim T, Jun D, van Rooijen N, et al. *Clodronate liposomes improve metabolic profile and reduce visceral adipose macrophage content in diet-induced obese mice*. PLoS ONE. 2011;6:e24358.
179. Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti J-F. *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie. 2005;87:99–109.
180. Patsouris D, Li P-P, Thapar D, Chapman J, Olefsky JM, Neels JG. *Ablation of CD11c-positive cells normalizes insulin sensitivity in obese insulin resistant animals*. Cell Metab. 2008;8:301–9.
181. Han MS, Jung DY, Morel C, Lakhani SA, Kim JK, Flavell RA, et al. *JNK expression by macrophages promotes obesity-induced insulin resistance and inflammation*. Science. 2013;339:218–22.
182. Suzuki K, Meguro K, Nakagomi D, Nakajima H. *Roles of alternatively activated M2 macrophages in allergic contact dermatitis*. Allergol Int. 2017;66:392–7.

183. Buchacher T, Ohradanova-Repic A, Stockinger H, Fischer MB, Weber V. *M2 Polarization of Human Macrophages Favors Survival of the Intracellular Pathogen Chlamydia pneumoniae*. PLOS ONE. 2015;10:e0143593.
184. Hu G, Guo M, Xu J, Wu F, Fan J, Huang Q, et al. *Nanoparticles Targeting Macrophages as Potential Clinical Therapeutic Agents Against Cancer and Inflammation*. Front Immunol. 2019;10. doi:10.3389/fimmu.2019.01998.
185. Michel T, Hentges F, Zimmer J. *Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells*. Front Immunol. 2013;3. doi:10.3389/fimmu.2012.00403.
186. Haller D, Serrant P, Granato D, Schiffrin EJ, Blum S. *Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes*. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9:649–57.
187. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, Lee YCG, McMichael AJ, Callan MFC. *CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation*. J Immunol. 2004;173:6418–26.
188. Scott MJ, Hoth JJ, Stagner MK, Gardner SA, Peyton JC, Cheadle WG. *CD40-CD154 interactions between macrophages and natural killer cells during sepsis are critical for macrophage activation and are not interferon gamma dependent*. Clin Exp Immunol. 2004;137:469–77.
189. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vély F, Pende D, et al. *Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses*. Blood. 2007;109:3776–85.
190. Lapaque N, Walzer T, Méresse S, Vivier E, Trowsdale J. *Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection*. J Immunol. 2009;182:4339–48.
191. Baratin M, Roetynck S, Lépolard C, Falk C, Sawadogo S, Uematsu S, et al. *Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:14747–52.
192. Sirén J, Sareneva T, Pirhonen J, Strengell M, Veckman V, Julkunen I, et al. *Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza A or Sendai virus-infected macrophages*. J Gen Virol. 2004;85 Pt 8:2357–64.
193. Romo N, Magri G, Muntasell A, Heredia G, Baía D, Angulo A, et al. *Natural killer cell-mediated response to human cytomegalovirus-infected macrophages is modulated by their functional polarization*. J of Leuk Biol. 2011;90:717–26.
194. Hanahan D, Weinberg RA. *The Hallmarks of Cancer*. Cell. 2000;100:57–70.
195. Guan X. *Cancer metastases: challenges and opportunities*. Acta Pharmaceutica Sinica B. 2015;5:402–18.
196. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell. 2011;144:646–74.
197. Cui Y, Guo G. *Immunomodulatory Function of the Tumor Suppressor p53 in Host Immune Response and the Tumor Microenvironment*. Int J Mol Sci. 2016;17:1942.
198. Mytar B, Siedlar M, Woloszyn M, Ruggiero I, Pryjma J, Zembala M. *Induction of reactive oxygen intermediates in human monocytes by tumour cells and their role in spontaneous monocyte cytotoxicity*. Br J Cancer. 1999;79:737–43.
199. Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, Volkmer J-P, Ho PY, McKenna KM, et al. *Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: roles of TLR and Btk*. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112:2145–50.

200. Tannenbaum CS, Tubbs R, Armstrong D, Finke JH, Bukowski RM, Hamilton TA. *The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor.* J Immunol. 1998;161:927–32.
201. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo S-R, Kranz DM, Murphy KM, et al. *Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 $\alpha$ + dendritic cells.* J Exp Med. 2011;208:2005–16.
202. Trinchieri G. *Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes.* Blood. 1994;84:4008–27.
203. Nishimura T, Watanabe K, Lee U, Yahata T, Ando K, Kimura M, et al. *Systemic in vivo antitumor activity of interleukin-12 against both transplantable and primary tumor.* Immunol Lett. 1995;48:149–52.
204. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, et al. *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.* Nature. 2001;410:1107–11.
205. Nishimura T, Iwakabe K, Sekimoto M, Ohmi Y, Yahata T, Nakui M, et al. *Distinct Role of Antigen-Specific T Helper Type 1 (Th1) and Th2 Cells in Tumor Eradication in Vivo.* J Exp Med. 1999;190:617–28.
206. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. *Natural innate and adaptive immunity to cancer.* Annu Rev Immunol. 2011;29:235–71.
207. Sprangers B, Nair V, Launay-Vacher V, Riella LV, Jhaveri KD. *Risk factors associated with post-kidney transplant malignancies: an article from the Cancer-Kidney International Network.* Clin Kidney J. 2018;11:315–29.
208. Mayor PC, Eng KH, Singel KL, Abrams SI, Odunsi K, Moysich KB, et al. *Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry.* J Allergy and Clin Immunol. 2018;141:1028–35.
209. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ, Engels EA. *Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS.* J Acquir Immune Defic Syndr. 2003;32:527–33.
210. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. *Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.* Nature. 2007;450:903–7.
211. Teng MWL, Vesely MD, Duret H, McLaughlin N, Towne JE, Schreiber RD, et al. *Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state.* Cancer Res. 2012;72:3987–96.
212. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion.* Science. 2011;331:1565–70.
213. Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, et al. *Molecular Mechanisms Used by Tumors to Escape Immune Recognition: Immunogenetherapy and the Cell Biology of Major Histocompatibility Complex Class I.* J Immunother Emphasis Tumor Immunol. 1993;14:182–90.
214. Frenzel A, Grespi F, Chmelewskij W, Villunger A. *Bcl2 family proteins in carcinogenesis and the treatment of cancer.* Apoptosis. 2009;14:584–96.
215. Kønig SM, Rissler V, Terkelsen T, Lambrughi M, Papaleo E. *Alterations of the pro-survival Bcl-2 protein interactome in breast cancer at the transcriptional, mutational and structural level.* bioRxiv. 2019;:695379.
216. Munn DH, Bronte V. *Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment.* Curr Opin Immunol. 2016;39:1–6.

217. Barros MHM, Segges P, Vera-Lozada G, Hassan R, Niedobitek G. *Macrophage polarization reflects T cell composition of tumor microenvironment in pediatric classical Hodgkin lymphoma and has impact on survival*. PLoS ONE. 2015;10:e0124531.
218. Steidl C, Lee T, Shah SP, Farinha P, Han G, Nayar T, et al. *Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma*. N Engl J Med. 2010;362:875–85.
219. Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, et al. *Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas*. Clin Cancer Res. 1999;5:1107–13.
220. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J, Harris AL. *Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma*. Cancer Res. 1996;56:4625–9.
221. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, Høyer M, Maniecki MB, Sjoegren P, et al. *Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma*. J Clin Oncol. 2009;27:3330–7.
222. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Suzu S, Eto M, et al. *Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma*. Cancer Sci. 2011;102:1424–31.
223. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, Tamaya T. *Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers*. Cancer Res. 2000;60:2632–5.
224. Daemen T, Veninga A, Roerdink FH, Scherphof GL. *Conditions controlling tumor cytotoxicity of rat liver macrophages mediated by liposomal muramyl dipeptide*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 1989;991:145–51.
225. Fan S, Fehr H-G, Adams D. *Activation of macrophages for ADCC in vitro: Effects of IL-4, TNF, interferons- $\alpha\beta$ , interferon- $\gamma$ , and GM-CSF*. Cell Immunol. 1991;135:78–87.
226. Galletti G, Scielzo C, Barboglio F, Rodriguez TV, Riba M, Lazarevic D, et al. *Targeting Macrophages Sensitizes Chronic Lymphocytic Leukemia to Apoptosis and Inhibits Disease Progression*. Cell Reports. 2016;14:1748–60.
227. Fritz JM, Tennis MA, Orlicky DJ, Lin H, Ju C, Redente EF, et al. *Depletion of tumor-associated macrophages slows the growth of chemically induced mouse lung adenocarcinomas*. Front Immunol. 2014;5:587.
228. Opperman KS, Vandyke K, Clark KC, Coulter EA, Hewett DR, Mrozik KM, et al. *Clodronate-Liposome Mediated Macrophage Depletion Abrogates Multiple Myeloma Tumor Establishment In Vivo*. Neoplasia. 2019;21:777–87.
229. Zeisberger SM, Odermatt B, Marty C, Zehnder-Fjällman AHM, Ballmer-Hofer K, Schwendener RA. *Clodronate-liposome-mediated depletion of tumour-associated macrophages: a new and highly effective antiangiogenic therapy approach*. Br J Cancer. 2006;95:272–81.
230. Lewis CE, Pollard JW. *Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments*. Cancer Res. 2006;66:605–12.
231. Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. *Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes*. Trends in Immunol. 2002;23:549–55.
232. Elgert KD, Alleva DG, Mullins DW. *Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection*. J Leukoc Biol. 1998;64:275–90.
233. Suk K, Somers SD, Erickson KL. *Regulation of murine macrophage function by IL-4: IL-4 and IFN- $\gamma$  differentially regulate macrophage tumoricidal activation*. Immunology. 1993;80:617–24.

234. Zhang F, Wang H, Wang X, Jiang G, Liu H, Zhang G, et al. *TGF- $\beta$  induces M2-like macrophage polarization via SNAIL-mediated suppression of a pro-inflammatory phenotype*. *Oncotarget*. 2016;7:52294–306.
235. Heusinkveld M, de Vos van Steenwijk PJ, Goedemans R, Ramwadhoebe TH, Gorter A, Welters MJP, et al. *M2 macrophages induced by prostaglandin E2 and IL-6 from cervical carcinoma are switched to activated M1 macrophages by CD4+ Th1 cells*. *J Immunol*. 2011;187:1157–65.
236. Kodelja V, Müller C, Tenorio S, Schebesch C, Orfanos CE, Goerdt S. *Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages*. *Immunobiology*. 1997;197:478–93.
237. Lin EY, Li J, Bricard G, Wang W, Deng Y, Sellers R, et al. *Vascular endothelial growth factor restores delayed tumor progression in tumors depleted of macrophages*. *Mol Oncol*. 2007;1:288–302.
238. Lin EY, Li J-F, Gnatovskiy L, Deng Y, Zhu L, Grzesik DA, et al. *Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer*. *Cancer Res*. 2006;66:11238–46.
239. Mazziere R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Raghetti A, Berti A, et al. *Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells*. *Cancer Cell*. 2011;19:512–26.
240. Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, et al. *Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: Possible involvement of TNF $\alpha$  and IL-1 $\alpha$* . *Int J Cancer*. 2000;85:182–8.
241. Du R, Lu KV, Petritsch C, Liu P, Ganss R, Passequé E, et al. *HIF1 $\alpha$  induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion*. *Cancer Cell*. 2008;13:206–20.
242. Luo X, Tarbell KV, Yang H, Pothoven K, Bailey SL, Ding R, et al. *Dendritic cells with TGF- $\beta$ 1 differentiate naive CD4+CD25- T cells into islet-protective Foxp3+ regulatory T cells*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:2821–6.
243. Dannenmann SR, Thielicke J, Stöckli M, Matter C, von Boehmer L, Cecconi V, et al. *Tumor-associated macrophages subvert T-cell function and correlate with reduced survival in clear cell renal cell carcinoma*. *Oncoimmunology*. 2013;2. doi:10.4161/onci.23562.
244. Maeda H, Shiraishi A. *TGF- $\beta$  contributes to the shift toward Th2-type responses through direct and IL-10-mediated pathways in tumor-bearing mice*. *J Immunol*. 1996;156:73–8.
245. Thomas DA, Massagué J. *TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*. *Cancer Cell*. 2005;8:369–80.
246. Liu J, Zhang N, Li Q, Zhang W, Ke F, Leng Q, et al. *Tumor-associated macrophages recruit CCR6+ regulatory T cells and promote the development of colorectal cancer via enhancing CCL20 production in mice*. *PLoS ONE*. 2011;6:e19495.
247. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. *Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival*. *Nat Med*. 2004;10:942–9.
248. Peranzoni E, Lemoine J, Vimeux L, Feuillet V, Barrin S, Kantari-Mimoun C, et al. *Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:E4041–50.
249. McKerrow JH, Bhargava V, Hansell E, Huling S, Kuwahara T, Matley M, et al. *A functional proteomics screen of proteases in colorectal carcinoma*. *Mol Med*. 2000;6:450–60.
250. Sloane BF, Yan S, Podgorski I, Linebaugh BE, Cher ML, Mai J, et al. *Cathepsin B and tumor proteolysis: contribution of the tumor microenvironment*. *Semin Cancer Biol*. 2005;15:149–57.

251. Coussens LM, Tinkle CL, Hanahan D, Werb Z. *MMP-9 supplied by bone marrow-derived cells contributes to skin carcinogenesis*. Cell. 2000;103:481–90.
252. Vasiljeva O, Papazoglou A, Krüger A, Brodoefel H, Korovin M, Deussing J, et al. *Tumor cell-derived and macrophage-derived cathepsin B promotes progression and lung metastasis of mammary cancer*. Cancer Res. 2006;66:5242–50.
253. Gocheva V, Wang H-W, Gadea BB, Shree T, Hunter KE, Garfall AL, et al. *IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion*. Genes Dev. 2010;24:241–55.
254. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. *Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy*. J Exp Med. 2001;193:727–40.
255. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. *Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology*. Nat Rev Clin Oncol. 2017;14:399–416.
256. Pulaski HL, Spahlinger G, Silva IA, McLean K, Kueck AS, Reynolds RK, et al. *Identifying alemtuzumab as an anti-myeloid cell antiangiogenic therapy for the treatment of ovarian cancer*. J Transl Med. 2009;7:49.
257. Grosso F, Jones RL, Demetri GD, Judson IR, Blay J-Y, Le Cesne A, et al. *Efficacy of trabectedin (ecteinascidin-743) in advanced pretreated myxoid liposarcomas: a retrospective study*. Lancet Oncol. 2007;8:595–602.
258. Monk BJ, Herzog TJ, Kaye SB, Krasner CN, Vermorken JB, Muggia FM, et al. *Trabectedin plus pegylated liposomal Doxorubicin in recurrent ovarian cancer*. J Clin Oncol. 2010;28:3107–14.
259. Germano G, Frapolli R, Belgiovine C, Anselmo A, Pesce S, Liguori M, et al. *Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin*. Cancer Cell. 2013;23:249–62.
260. Cannarile MA, Weisser M, Jacob W, Jegg A-M, Ries CH, Rüttinger D. *Colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R) inhibitors in cancer therapy*. J ImmunoTherapy of Cancer. 2017;5:53.
261. Wainberg ZA, Eisenberg PD, Sachdev JC, Weise AM, Kaufman DR, Hutchinson M, et al. *Phase 1/2a study of double immune suppression blockade by combining a CSF1R inhibitor (pexidartinib/PLX3397) with an anti PD-1 antibody (pembrolizumab) to treat advanced melanoma and other solid tumors*. JCO. 2016;34 4\_suppl:TPS465–TPS465.
262. Nywening TM, Wang-Gillam A, Sanford DE, Belt BA, Panni RZ, Cusworth BM, et al. *Targeting tumour-associated macrophages with CCR2 inhibition in combination with FOLFIRINOX in patients with borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer: a single-centre, open-label, dose-finding, non-randomised, phase 1b trial*. The Lancet Oncology. 2016;17:651–62.
263. Yang L, Wang F, Wang L, Huang L, Wang J, Zhang B, et al. *CD163+ tumor-associated macrophage is a prognostic biomarker and is associated with therapeutic effect on malignant pleural effusion of lung cancer patients*. Oncotarget. 2015;6:10592–603.
264. Vidyarthi A, Khan N, Agnihotri T, Negi S, Das DK, Aqdas M, et al. *TLR-3 Stimulation Skews M2 Macrophages to M1 Through IFN- $\alpha$ 6 Signaling and Restricts Tumor Progression*. Front Immunol. 2018;9:1650.
265. Dietsch GN. *Motolimod effectively drives immune activation in advanced cancer patients*. Oncoimmunology. 2016;5:e1126037.
266. Chow LQM, Morishima C, Eaton KD, Baik CS, Goulart BH, Anderson LN, et al. *Phase 1b Trial of the Toll-like Receptor 8 Agonist, Motolimod (VTX-2337), Combined with Cetuximab in Patients with Recurrent or Metastatic SCCHN*. Clin Cancer Res. 2017;23:2442–50.

267. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, et al. *CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans*. *Science*. 2011;331:1612–6.
268. Vonderheide RH, Flaherty KT, Khalil M, Stumacher MS, Bajor DL, Hutnick NA, et al. *Clinical activity and immune modulation in cancer patients treated with CP-870,893, a novel CD40 agonist monoclonal antibody*. *J Clin Oncol*. 2007;25:876–83.
269. Beatty GL, Torigian DA, Chiorean EG, Saboury B, Brothers A, Alavi A, et al. *A phase I study of an agonist CD40 monoclonal antibody (CP-870,893) in combination with gemcitabine in patients with advanced pancreatic ductal adenocarcinoma*. *Clin Cancer Res*. 2013;19:6286–95.
270. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. *Renal-Cell Carcinoma*. *N Engl J Med*. 1996;335:865–75.
271. Rathmell WK, Godley PA. *Recent updates in renal cell carcinoma*. *Curr Opin Oncol*. 2010;22:250–6.
272. Garcia JA, Cowey CL, Godley PA. *Renal cell carcinoma*. *Curr Opin Oncol*. 2009;21:266–71.
273. Nielsen OH, Grimm D, Wehland M, Bauer J, Magnusson NE. *Anti-Angiogenic Drugs in the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: Advances in Clinical Application*. *Curr Vasc Pharmacol*. 2015;13:381–91.
274. Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, et al. *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene*. *Science*. 1993;260:1317–20.
275. Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, González Del Alba A, Duran I. *Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review*. *Cancer Treat Rev*. 2017;60:77–89.
276. Sadeghi S, Quinn DI. *Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma*. *American J Hematology / Oncology*. 2015;11.
277. Santoni M, Massari F, Di Nunno V, Conti A, Cimadamore A, Scarpelli M, et al. *Immunotherapy in renal cell carcinoma: latest evidence and clinical implications*. *Drugs Context*. 2018;7. doi:10.7573/dic.212528.
278. Parekh H, Rini BI. *Emerging therapeutic approaches in renal cell carcinoma*. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2015;15:1305–14.
279. Schmidinger M. *Clinical decision-making for immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma*. *Curr Opin Urol*. 2018;28:29–34.
280. Murphy GP, Hrushesky WJ. *A murine renal cell carcinoma*. *J Natl Cancer Inst*. 1973;50:1013–25.
281. Bi J, Tian Z. *NK Cell Exhaustion*. *Front Immunol*. 2017;8:760.
282. Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K. *Measurement of human and mouse interleukin 18*. *Curr Protoc Immunol*. 2001;Chapter 6:Unit 6.26.
283. Colonna M, Navarro F, Bellón T, Llano M, García P, Samaridis J, et al. *A Common Inhibitory Receptor for Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on Human Lymphoid and Myelomonocytic Cells*. *J Exp Med*. 1997;186:1809–18.
284. Morvan MG, Lanier LL. *NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks*. *Nat Rev Cancer*. 2016;16:7–19.
285. Vogel DYS, Glim JE, Stavenuiter AWD, Breur M, Heijnen P, Amor S, et al. *Human macrophage polarization in vitro: maturation and activation methods compared*. *Immunobiology*. 2014;219:695–703.
286. Tarique AA, Logan J, Thomas E, Holt PG, Sly PD, Fantino E. *Phenotypic, Functional, and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2015;53:676–88.



287. Mia S, Warnecke A, Zhang X-M, Malmström V, Harris RA. *An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  yields a dominant immunosuppressive phenotype.* Scand J Immunol. 2014;79:305–14.
288. Baseler WA, Davies LC, Quigley L, Ridnour LA, Weiss JM, Hussain SP, et al. *Autocrine IL-10 functions as a rheostat for M1 macrophage glycolytic commitment by tuning nitric oxide production.* Redox Biol. 2016;10:12–23.
289. Bosschaerts T, Morias Y, Stijlemans B, Hérin M, Porta C, Sica A, et al. *IL-10 limits production of pathogenic TNF by M1 myeloid cells through induction of nuclear NF- $\kappa$ B p50 member in Trypanosoma congolense infection-resistant C57BL/6 mice.* Eur J Immunol. 2011;41:3270–80.
290. Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ. *Shaping Gene Expression in Activated and Resting Primary Macrophages by IL-10.* J Immunol. 2002;169:2253–63.
291. Boonstra A, Rajsbaum R, Holman M, Marques R, Asselin-Paturel C, Pereira JP, et al. *Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF-dependent TLR signals, and TLR-independent signals.* J Immunol. 2006;177:7551–8.
292. Kwan W-H, Boix C, Gougelet N, Fridman WH, Mueller CGF. *LPS induces rapid IL-10 release by M-CSF-conditioned tolerogenic dendritic cell precursors.* J Leukoc Biol. 2007;82:133–41.
293. Malefyt R de W, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, Vries JE de. *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.* J Exp Med. 1991;174:1209–20.
294. Björkström NK, Ljunggren H-G, Michaëlsson J. *Emerging insights into natural killer cells in human peripheral tissues.* Nat Rev Immunol. 2016;16:310–20.
295. Mackay LK, Braun A, Macleod BL, Collins N, Tebartz C, Bedoui S, et al. *Cutting edge: CD69 interference with sphingosine-1-phosphate receptor function regulates peripheral T cell retention.* J Immunol. 2015;194:2059–63.
296. González-Amaro R, Cortés JR, Sánchez-Madrid F, Martín P. *Is CD69 an effective brake to control inflammatory diseases?* Trends Mol Med. 2013;19:625–32.
297. Chase JM, Leong JW, Romee R, Fehniger TA. *Cytokine Activation Induces CD25 Expression and a Signaling-Competent High-Affinity IL-2 Receptor On CD56dim Human NK Cells.* Blood. 2012;120:2159–2159.
298. Rossi LE, Avila DE, Spallanzani RG, Ziblat A, Fuertes MB, Lapyckyj L, et al. *Histone deacetylase inhibitors impair NK cell viability and effector functions through inhibition of activation and receptor expression.* J Leukoc Biol. 2012;91:321–31.
299. Ziblat A, Domaica CI, Spallanzani RG, Iraolagoitia XLR, Rossi LE, Avila DE, et al. *IL-27 stimulates human NK-cell effector functions and primes NK cells for IL-18 responsiveness.* Eur J Immunol. 2015;45:192–202.
300. Clausen J, Vergeiner B, Enk M, Petzer AL, Gastl G, Gunsilius E. *Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells.* Immunobiology. 2003;207:85–93.
301. Travis MA, Sheppard D. *TGF- $\beta$  activation and function in immunity.* Annu Rev Immunol. 2014;32:51–82.
302. Sanjabi S, Oh SA, Li MO. *Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection.* Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9.
303. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH. *A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.* Cell. 2000;100:655–69.

304. Yu J, Wei M, Becknell B, Trotta R, Liu S, Boyd Z, et al. *Pro- and antiinflammatory cytokine signaling: reciprocal antagonism regulates interferon-gamma production by human natural killer cells*. *Immunity*. 2006;24:575–90.
305. Koga T, Harada H, Shi TS, Okada S, Suico MA, Shuto T, et al. *Hyperthermia suppresses the cytotoxicity of NK cells via down-regulation of perforin/granzyme B expression*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;337:1319–23.
306. Foltz JA, Moseman JE, Thakkar A, Chakravarti N, Lee DA. *TGF $\beta$  Imprinting During Activation Promotes Natural Killer Cell Cytokine Hypersecretion*. *Cancers*. 2018;10:423.
307. Zheng X, Wang Y, Wei H, Sun R, Tian Z. *LFA-1 and CD2 Synergize for the Erk1/2 Activation in the Natural Killer (NK) Cell Immunological Synapse*. *J Biol Chem*. 2009;284:21280–7.
308. Lauzon W, Lemaire I. *Alveolar Macrophage Inhibition of Lung-Associated NK Activity: Involvement of Prostaglandins and Transforming Growth Factor- $\beta$ 1*. *Exp Lung Res*. 1994;20:331–49.
309. Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. *IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes*. *Int Immunol*. 1999;11:803–11.
310. Pazmany L, Mandelboim O, Valés-Gómez M, Davis DM, Reyburn HT, Strominger JL. *Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells*. *Science*. 1996;274:792–5.
311. LeMaoult J, Zafaranloo K, Le Danff C, Carosella ED. *HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells*. *FASEB J*. 2005;19:662–4.
312. Pangault C, Amiot L, Caulet-Maugendre S, Brasseur F, Burtin F, Guilloux V, et al. *HLA-G protein expression is not induced during malignant transformation*. *Tissue Antigens*. 1999;53 4 Pt 1:335–46.
313. Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, McMaster M, Dausset J, Carosella ED, et al. *Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer*. *J Pathol*. 2002;196:266–74.
314. Roberti MP, Juliá EP, Rocca YS, Amat M, Bravo AI, Loza J, et al. *Overexpression of CD85j in TNBC patients inhibits Cetuximab-mediated NK-cell ADCC but can be restored with CD85j functional blockade*. *Eur J Immunol*. 2015;45:1560–9.
315. Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL. *Natural killer cell lines kill autologous  $\beta$ 2-microglobulin-deficient melanoma cells: Implications for cancer immunotherapy*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:13140–5.
316. Fukushima Y, Oshika Y, Nakamura M, Tokunaga T, Hatanaka H, Abe Y, et al. *Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells*. *Int J Mol Med*. 1998;2:349–51.
317. Rocca YS, Roberti MP, Juliá EP, Pampena MB, Bruno L, Rivero S, et al. *Phenotypic and Functional Dysregulated Blood NK Cells in Colorectal Cancer Patients Can Be Activated by Cetuximab Plus IL-2 or IL-15*. *Front Immunol*. 2016;7:413.
318. Paul P, Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Moreau P, Riteau B, Le Gal FA, et al. *HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:4510–5.
319. Wang Q, Cheng F, Ma T-T, Xiong H-Y, Li Z-W, Xie C-L, et al. *Interleukin-12 inhibits the hepatocellular carcinoma growth by inducing macrophage polarization to the M1-like phenotype through downregulation of Stat-3*. *Mol Cell Biochem*. 2016;415:157–68.
320. Duluc D, Corvaisier M, Blanchard S, Catala L, Descamps P, Gamelin E, et al. *Interferon- $\gamma$  reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages*. *Int J Cancer*. 2009;125:367–73.

321. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, et al. *Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:2066–71.
322. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, et al. *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming*. Nat Immunol. 2004;5:1260–5.
323. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, Reggiardo G, Moretta L, Mantovani A, 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;107:21659–64.
324. Moretta A, Marcenaro E, Sivori S, Della Chiesa M, Vitale M, Moretta L. *Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues*. Trends Immunol. 2005;26:668–75.
325. Elliott LA, Doherty GA, Sheahan K, Ryan EJ. *Human Tumor-Infiltrating Myeloid Cells: Phenotypic and Functional Diversity*. Front Immunol. 2017;8:86.
326. Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Saccani A, Sironi M, et al. *A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)*. Blood. 2006;107:2112–22.
327. Karnevi E, Andersson R, Rosendahl AH. *Tumour-educated macrophages display a mixed polarisation and enhance pancreatic cancer cell invasion*. Immunol Cell Biol. 2014;92:543–52.
328. Smith TD, Tse MJ, Read EL, Liu WF. *Regulation of macrophage polarization and plasticity by complex activation signals*. Int Bio (Cam). 2016;8:946–55.
329. Porcheray F, Viaud S, Rimaniol A-C, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, et al. *Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation*. Clin Exp Immunol. 2005;142:481–9.
330. Kovaleva OV, SamoiloVA DV, Shitova MS, Gratchev A. *Tumor Associated Macrophages in Kidney Cancer*. Anal Cell Pathol (Amst). 2016;2016. doi:10.1155/2016/9307549.
331. Yang L, Zhang Y. *Tumor-associated macrophages: from basic research to clinical application*. J Hematology & Oncology. 2017;10:58.
332. Johnson P, Challis R, Chowdhury F, Gao Y, Harvey M, Geldart T, et al. *Clinical and biological effects of an agonist anti-CD40 antibody: a Cancer Research UK phase I study*. Clin Cancer Res. 2015;21:1321–8.
333. Ostrand-Rosenberg S, Fenselau C. *Myeloid-derived suppressor cells: Immune suppressive cells that impair antitumor immunity and are sculpted by their environment*. J Immunol. 2018;200:422–31.
334. Hiraoka K, Zenmyo M, Watari K, Iguchi H, Fotovati A, Kimura YN, et al. *Inhibition of bone and muscle metastases of lung cancer cells by a decrease in the number of monocytes/macrophages*. Cancer Sci. 2008;99:1595–602.
335. Zhang W, Zhu X-D, Sun H-C, Xiong Y-Q, Zhuang P-Y, Xu H-X, et al. *Depletion of tumor-associated macrophages enhances the effect of sorafenib in metastatic liver cancer models by antimetastatic and antiangiogenic effects*. Clin Cancer Res. 2010;16:3420–30.
336. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, et al. *Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma*. Cancer Res. 2011;71:5412–22.
337. Gill S, Vasey AE, De Souza A, Baker J, Smith AT, Kohrt HE, et al. *Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells*. Blood. 2012;119:5758–68.

338. Sun C, Fu B, Gao Y, Liao X, Sun R, Tian Z, et al. *TGF- $\beta$ 1 down-regulation of NKG2D/DAP10 and 2B4/SAP expression on human NK cells contributes to HBV persistence.* PLoS Pathog. 2012;8:e1002594.
339. Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, et al. *T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B.* J Hepatol. 2010;52:322–9.
340. Paul S, Kulkarni N, Shilpi null, Lal G. *Intratatumoral natural killer cells show reduced effector and cytolytic properties and control the differentiation of effector Th1 cells.* Oncoimmunology. 2016;5:e1235106.
341. Bi J, Tian Z. *NK Cell Exhaustion.* Front Immunol. 2017;8. doi:10.3389/fimmu.2017.00760.
342. Ju Y, Hou N, Meng J, Wang X, Zhang X, Zhao D, et al. *T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule-3 (Tim-3) mediates natural killer cell suppression in chronic hepatitis B.* J Hepatol. 2010;52:322–9.
343. da Silva IP, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, et al. *Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade.* Cancer Immunol Res. 2014;2:410–22.
344. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, Vély F, Vivier E, Olive D, et al. *PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma.* Oncotarget. 2016;7:72961–77.
345. Benson DM, Bakan CE, Mishra A, Hofmeister CC, Efebera Y, Becknell B, et al. *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody.* Blood. 2010;116:2286–94.
346. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, Rampinelli F, Parolini S, Olive D, et al. *Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization.* J Allergy Clin Immunol. 2017;139:335-346.e3.
347. MacFarlane AW, Jilab M, Plimack ER, Hudes GR, Uzzo RG, Litwin S, et al. *PD-1 expression on peripheral blood cells increases with stage in renal cell carcinoma patients and is rapidly reduced after surgical tumor resection.* Cancer Immunol Res. 2014;2:320–31.
348. Hayakawa Y, Smyth MJ. *CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity.* J Immunol. 2006;176:1517–24.
349. De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M, De Smedt M, Vandekerckhove B, Taghon T, et al. *CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation.* Immunol Cell Biol. 2011;89:803–11.