



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

# **Células NK regulatorias en la respuesta inmune antitumoral**

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

**Lic. Jessica Mariel Sierra**

Directora de tesis: Dra. Mercedes Beatriz Fuertes

Consejero de estudios: Dra. Verónica Edith García

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

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 2023

# RESUMEN

---

## Células NK regulatorias en la respuesta inmune antitumoral

Las células *Natural Killer* (NK) cumplen un papel clave en la inmunovigilancia tumoral. Sin embargo, las células NK de pacientes con cáncer muestran un fenotipo alterado y una disminución en sus funciones efectoras. Además, está surgiendo evidencia de un rol regulatorio de las células NK en diversos modelos de infección viral, trasplante y autoinmunidad. En este trabajo, realizamos un análisis bioinformático de datos genómicos y clínicos disponibles en *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) de pacientes con carcinoma renal de células claras (ccRCC) y observamos que una mayor expresión de genes característicos de células NK se asocia con menor supervivencia, lo que sugiere que las células NK podrían estar teniendo un rol regulatorio. El análisis de muestras tumorales frescas obtenidas de pacientes con ccRCC reveló la presencia de una alta frecuencia de células NK infiltrantes del tumor que expresan la molécula inhibitoria PD-L1. *In vitro*, la expresión de PD-L1 fue inducida en células NK de donantes sanos luego del reconocimiento de células tumorales a través de NKG2D. Esta expresión se vio aumentada por la acción de IL-18, producida por monocitos como consecuencia del reconocimiento directo de las células tumorales y su posterior fagocitosis. Además, las células NK PD-L1<sup>+</sup> generadas *in vitro* mostraron un fenotipo activado y mayor capacidad efectora comparadas con las células NK PD-L1<sup>-</sup>, pero simultáneamente, inhibieron en forma directa la proliferación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> de manera dependiente de PD-L1. Nuestros resultados sugieren que los tumores podrían conducir al desarrollo de células NK que expresan PD-L1 y adquieren funciones inmunoregulatorias en humanos. Por lo tanto, la manipulación racional de estas células surge como una posibilidad que puede conducir a mejorar la respuesta inmune antitumoral en pacientes con cáncer.

**Palabras clave:** células NK, PD-L1, monocitos, LT CD8<sup>+</sup>, regulación, carcinoma renal.

# ABSTRACT

---

## Regulatory NK cells in antitumor immune response

Natural Killer (NK) cells play a key role in cancer immunosurveillance. However, NK cells from cancer patients display an altered phenotype and impaired effector functions. In addition, evidence of a regulatory role for NK cells is emerging in diverse models of viral infection, transplantation, and autoimmunity. Here, we performed a bioinformatic analysis of genomic and clinic clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) and observed that a higher expression of NK cell signature genes is associated with reduced survival, suggesting that NK cells might exhibit immunoregulatory functions. Analysis of fresh tumor samples from ccRCC patients unraveled the presence of a high frequency of tumor-infiltrating NK cells expressing the inhibitory molecule PD-L1. In vitro, PD-L1 expression was induced on NK cells from healthy donors upon direct tumor cell recognition through NKG2D. This expression was further up-regulated by monocyte-derived IL-18, as a consequence of direct recognition and following phagocytosis of tumor cells. Moreover, in vitro generated PD-L1<sup>+</sup> NK cells displayed an activated phenotype and enhanced effector functions compared to PD-L1<sup>-</sup> NK cells, but simultaneously, they directly inhibited CD8<sup>+</sup> T cell proliferation in a PD-L1-dependent manner. Our results suggest that tumors might drive the development of PD-L1-expressing NK cells that acquire immunoregulatory functions in humans. Hence, rational manipulation of these regulatory cells emerges as a possibility that may lead to improved anti-tumor immunity in cancer patients.

**Keywords:** NK cells, PD-L1, monocytes, CD8<sup>+</sup> T cells, regulation, renal cell carcinoma.

# AGRADECIMIENTOS

---

En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de Tesis Mercedes por darme la oportunidad de sumarme a su grupo de investigación, por recibirme hace muchos años siendo una estudiante, acompañarme en mi formación y crecimiento tanto a nivel profesional como personal. Gracias Mer por tu calidez, por tu infinita paciencia, por tu comprensión, por estar siempre abierta al diálogo, por brindarme todas las herramientas, la libertad y la confianza para pensar y llevar adelante cada experimento, por fomentar el pensamiento crítico y tener siempre en cuenta mis sugerencias. Me llevo la mejor de las experiencias y aprendizaje de todos estos años.

Gracias Norber por abrirme las puertas del laboratorio y hacerme sentir parte desde el primer momento, por formar un grupo de trabajo hermoso que fue renovándose pero mantiene intactos sus valores. Gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia, es realmente admirable tu vocación y excelencia.

Quiero agradecer también al resto de mis compañeros del laboratorio, los que están y los que estuvieron. Gracias Caro por los consejos, por ser como la madre de todos. A Andre por la buena onda y un poco de su locura. Gracias Adri, Ceci, Maru, Belu, Nati y Aldi por traer energías renovadas, por ser la charla y el mate de cada tarde, el oído, el consejo y el abrazo cada vez que fue necesario, por hacer que quiera quedarme después de haber terminado mi trabajo sólo para compartir un ratito más con ustedes. Y a Vicky, Flor y Sol que transitaron prácticamente toda esta etapa a la par, por hacer que las largas jornadas de pipeteo se pasen más rápido, por compartir tantas risas y también frustraciones. Gracias Flor y Sol por la amistad que formamos en estos años, por acompañarme en momentos difíciles y en los más alegres, y por esos viajes con mas anécdotas que kilómetros recorridos. A todos muchísimas GRACIAS, sin ninguna duda trascendieron el ámbito laboral, y hoy me llevo amigos.

Gracias a Nico Sarbia, Rami, Nico Dalton, Pau, Cintia, Mati y toda la gente que hizo del IBYME un lugar único.

Al CONICET por otorgarme la beca para realizar esta Tesis, y a la UBA que tanto me brindó.

A mis amigos, porque la vida compartida con ellos es más linda.

Empezando por la Misio, Inés y Luli, por la hermosa amistad que nos dejó la facu, por acompañarnos hace tantos años, porque incluso en la distancia sabemos encontrarnos. Gracias Ine y Lu por ser mi contención siempre, por las charlas, mates, viajes y tantas cosas más que simplemente no podría resumir.

A Ailén, y una amistad que nació a miles de kilómetros de distancia, gracias por tantos momentos de diversión.

A Luqui, Beto y Cris, gracias por los buenos momentos y siempre sacarme una sonrisa.

A Martu, Noe, Gabi y Flor, este grupo que me acompaña hace incontables años y que acaba de agrandarse con la llegada de Franchu.

A Pablo, por estar siempre, no importa cuándo, dónde o por qué.

A Cami, que ya traspasó cualquier definición de amistad y hoy es como familia. Gracias por tu incondicionalidad, porque ya nos conocemos y compartimos tanto que a veces las palabras simplemente no son necesarias.

A Dami, Coco, Martu, Connie, Emita y Jony por tantas juntadas, charlas y comidas, por estar y abrirnos las puertas a mi y a mi familia. Y por confiarme el cuidado de Lisita en más de una oportunidad, esa hermosa compañía de cuatro patas que alegra mi casa con cada visita.

A mis compañeras de voley, Noe, Carli, Ceci, Ivi, Mica y Mar por ser mi momento de despeje y cable a tierra, y por reconectarme con todo lo lindo del deporte.

Y principalmente a mi familia, el motor de todo.

A mi abuela Elvira, por dejarme muchísimo amor, sonrisas y un poco de locura; por acompañarme en cada paso y alegrarse siempre por mis logros. Y porque desde donde esté se que se sentiría orgullosa.

A Leo por siempre estar dispuesto a ayudarme, por mimarme, y sobre todo por ser un gran compañero para mamá.

A mi papá, por apoyarme y acompañarme en todas mis decisiones, por estar siempre presente para que no me falte nada. Gracias pa por creer en mí incondicionalmente. Gracias también a Gri, por el aliento, por estar siempre dispuesta a darme una mano; y gracias a ambos por la contención todos estos años.

A mi hermana, Meli, gracias por estar, por escucharme, por acompañarme y dejarme acompañarte también. Gracias por a veces hacerme tener otra mirada, y porque cada vez nos encontramos compartiendo más cosas.

A mi mamá, mi mayor ejemplo y pilar, por ser la primera en darse cuenta todos mis estados de ánimo, por fomentar siempre mi libertad y animarme a ir en busca de mis sueños. Gracias ma por hacer hasta lo imposible por nuestra felicidad, por darme fuerzas y nunca dudar de mí, incluso cuando yo si lo hago. Gracias por ser siempre la palabra justa.

Transitar estos años de sacrificio y de tantas emociones no hubiera sido posible sin el apoyo y contención de cada uno de ustedes. Me siento sumamente dichosa de estar rodeada de personas hermosas.

A todos, infinitas GRACIAS.

*“... porque cada persona que pasa en nuestra vida es única.*

*Siempre deja un poco de sí y se lleva un poco de nosotros.*

*Habrà de los que se llevarán mucho,*

*pero no habrá de los que no nos dejarán nada.”*

Fragmento de “El árbol de los amigos”.

**A mi mamá, mi papá y mi hermana**



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

**Tumor-Experienced Human NK Cells Express High Levels of PD-L1 and Inhibit CD8<sup>+</sup> T Cell Proliferation**

Sierra JM, Secchiari F, Nuñez SY, Iraolagoitia XLR, Ziblat A, Friedrich AD, Regge MV, Santilli MC, Torres NI, Gantov M, Trotta A, Ameri C, Vitagliano G, Pita HR, Rico L, Rovegno A, Richards N, Domaica CI, Zwirner NW, Fuertes MB.

**Front Immunol.** 2021 Sep 20; 12: 745939. doi: 10.3389/fimmu.2021.745939. PMID: 34616407; PMCID: PMC8488336.

# ÍNDICE

---

<b>Abreviaturas .....</b>	<b>13</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>17</b>
Células NK.....	18
1. <i>Generalidades</i> .....	18
2. <i>Receptores</i> .....	21
3. <i>Regulación de la activación y funciones efectoras</i> .....	26
4. <i>Diálogo recíproco entre células mieloides y células NK</i> .....	29
5. <i>Funciones regulatorias</i> .....	32
Inmunología antitumoral .....	34
1. <i>Teoría de la inmunoección</i> .....	34
2. <i>PD-L1 y escape tumoral</i> .....	35
3. <i>Inmunoterapias</i> .....	38
Carcinoma de células renales .....	40
<b>Hipótesis y objetivos .....</b>	<b>43</b>
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>45</b>
1. <i>Análisis bioinformático</i> .....	46
2. <i>Muestras biológicas</i> .....	46
3. <i>Procesamiento de muestras de biopsias tumorales</i> .....	47
4. <i>Líneas celulares</i> .....	48
5. <i>Aislamiento y cultivo de células</i> .....	48
5.1. <i>Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)</i> .....	48
5.2. <i>Aislamiento de células NK y LT</i> .....	49
5.3. <i>Aislamiento de monocitos (Mo)</i> .....	49

---

6. Ensayos de co-cultivo.....	50
6.1. Ensayos de degranulación .....	51
6.2. Ensayos de transwell .....	51
6.3. Ensayos con medios condicionados (MC) .....	52
6.4. Ensayos de bloqueo, neutralización y estimulación.....	52
6.5. Ensayos con monocitos .....	52
6.6. Ensayos con inhibidores .....	53
6.7. Ensayo de fagocitosis.....	53
7. Citometría de flujo .....	53
7.1. Anticuerpos.....	53
7.2. Inmunomarcación de superficie.....	54
7.3. Inmunomarcación intracitoplasmática.....	54
7.4. Evaluación de activación y funciones efectoras de las células NK .....	55
7.5. Expresión de PD-L1 en muestras de pacientes con ccRCC .....	55
7.6. Expresión de PD-L1 en células NK estimuladas in vitro.....	56
8. ELISA .....	57
9. Marcación de poblaciones celulares con trazadores fluorescentes .....	58
10. Microscopía .....	59
11. Cell sorting y ensayo de proliferación de linfocitos T .....	59
12. Análisis estadístico .....	61
<b>Resultados .....</b>	<b>62</b>
1. Rol de las células NK en la progresión tumoral de pacientes con ccRCC.....	63
2. Expresión de PD-L1 en células NK de pacientes con ccRCC .....	64
3. Inducción de la expresión de PD-L1 en células NK in vitro .....	66
4. Identificación de factores solubles involucrados en la expresión de PD-L1.....	72

---

5. Rol de IL-18 .....	74
6. Rol de IL-1 $\beta$ .....	79
7. Rol de los monocitos .....	80
8. Mecanismos involucrados en la inducción de la producción de IL-18 y de la expresión de PD-L1 .....	82
9. Rol de la Fagocitosis .....	85
10. Características de las células NK PD-L1 <sup>hi</sup> .....	88
11. Capacidad regulatoria de las células NK PD-L1 <sup>hi</sup> .....	90
<b>Discusión.....</b>	<b>95</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>109</b>
<b>Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>112</b>

## ABREVIATURAS

---

Ac: Anticuerpo(s)	GM-CSF: <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
AcMo: Anticuerpo(s) monoclonal(es)	HBV: Virus de hepatitis B
ADCP: Fagocitosis celular dependiente de anticuerpos o <i>Antibody-dependent cellular phagocytosis</i>	HLA: Antígenos leucocitarios humanos o <i>Human leukocyte antigen</i>
ANOVA: Análisis de la varianza	HSC: Células madres hematopoyéticas o <i>Haemopoietic Stem Cells</i> .
BTLA: <i>B and T lymphocyte attenuator</i>	ICI: Inhibidores de puntos de control inmunológico o <i>Immune checkpoint inhibitors</i>
CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	ICOS: <i>Inducible T cell costimulator</i>
ccRCC: Carcinoma renal de células claras	IFN: Interferón
CD: Célula(s) dendrítica(s)	Ig: Inmunoglobulina
CFSE: <i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>	IL: Interleuquina
ChRCC: Carcinoma de células renales cromóforas	IL-1RA: Antagonista del receptor de IL-1
CLP: Precursor linfoide común	ILC: Células linfoides innatas o <i>Innate Lymphoid Cells</i>
CMH: Complejo Mayor de Histocompatibilidad	ILT: <i>Immunoglobulin-like transcript</i>
CMV: Citomegalovirus	ITAM: <i>Immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>
CTLA-4: <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>	ITIM: <i>Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
DAMPs: Patrones moleculares asociados a daño o <i>Damage associated molecular patterns</i>	ITSM: <i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>
DS: Donantes sanos	KIR: <i>Killer cell immunoglobulin-like receptors</i>
FasL: Ligando de Fas	LAG-3: <i>Lymphocyte activation gene-3</i>
Flt3-L: Ligando de Flt3	LAMP-1: <i>Lysosome-associated membrane protein</i>
FMO: <i>Fluorescence Minus One</i>	LB: Linfocito(s) B

LCMV: Virus de la coriomeningitis linfocítica	Pfp: Perforina
LT: Linfocito(s) T	PRCC: Carcinoma papilar renal
MC: Medio condicionado	RCC: Carcinoma de células renales
MCMV: Citomegalovirus murino	RLR: <i>Retinoic acid-inducible gene (RIG)-1-like receptors</i>
MFI: <i>Mean Fluorescence Intensity</i>	RO: Oncocitoma renal
MICA/B: <i>MHC class I chain-related protein A/B</i>	ROS: Especies reactivas del oxígeno
Mo: Monocitos	SCF: <i>Stem Cell Factor</i>
NCR: Receptores de citotoxicidad natural o <i>Natural cytotoxicity receptors</i>	SEM: Error estándar de la media o <i>Standard error of the mean</i>
NK: <i>Natural Killer</i>	SF: Solución fisiológica
NKG2D: <i>Natural killer group 2 member D</i>	SFB: Suero fetal bovino
NKG2DL: Ligando(s) de NKG2D	SHP-1: <i>Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-1</i>
NK-te: <i>NKtumor-experienced</i>	TA: Temperatura ambiente
NLR: Receptores de tipo NOD o <i>NOD-like receptors</i>	TAM: Macrófagos asociados a tumor o <i>Tumor-associated macrophages</i>
NOS: Óxido nítrico sintetasa	TCGA: <i>The Cancer Genome Atlas</i>
PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos o <i>Pathogen-associated molecular patterns</i>	TGF: Factor de crecimiento transformante o <i>Transforming growth factor</i>
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica	Th: <i>T helper</i>
PBNK: Células NK de sangre periférica	TIGIT: <i>T cell immunoglobulin and ITIM domain</i>
PCNA: <i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	TIM-3: <i>T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3</i>
PD-1: <i>Programmed death 1</i>	TINK: Células NK infiltrantes de tumor
PD-L1/2: <i>Programmed death-ligand 1/2</i>	TLR: Receptores de tipo Toll o <i>Toll like receptors</i>
PFA: Paraformaldehído	

TMB: Tetra-metil bencidina

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

TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*

Tw: *Transwell*

ULBP: *UL16 binding proteins*

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

VEGFR: Receptor de VEGF

VISTA: *V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*



# INTRODUCCIÓN

---

## CÉLULAS NK

### 1. GENERALIDADES

Las células citotóxicas naturales o *Natural Killer* (NK) forman parte de la familia de células linfoides innatas (*Innate Lymphoid Cells*, ILC). Esta familia de células se considera la contraparte innata de los linfocitos T (LT) y puede dividirse en dos ramas, la rama integrada por las ILC1, ILC2 e ILC3 que refleja funcionalmente a los LT CD4<sup>+</sup> colaboradores o *helper* (Th)1, Th2 y Th17 respectivamente; y la rama citotóxica cuyo único representante son las células NK y reflejan las funciones de los LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos (1,2). Sin embargo, a diferencia de los LT, las ILC no expresan receptores específicos de antígenos como el TCR, codificados por reordenamiento de genes (3), ni experimentan una expansión clonal para volverse operativas y desarrollar una memoria antígeno específica, sino que actúan de manera temprana en la respuesta inmune al reaccionar rápidamente a las señales o citoquinas, expresadas por las células residentes en los tejidos (2).

Las células NK fueron identificadas originalmente por su capacidad de eliminar células tumorales incluso en ausencia de activación previa. En este sentido, se ha asociado una mayor actividad citotóxica de las células NK en sangre periférica con una menor incidencia de tumores (4). Estas células desempeñan un rol clave en la inmunidad innata, y son actores fundamentales de la inmunovigilancia contra tumores y células infectadas con virus, la prevención de metástasis y la eliminación de células estresadas (3,5). Pero su relevancia no se debe sólo a su actividad citotóxica, sino también a su capacidad de secretar citoquinas proinflamatorias como el Interferón (IFN)- $\gamma$  y factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*, TNF)- $\alpha$ , y a la secreción de quemoquinas (6–8). Además, las células NK son claves como nexo entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa debido a su facultad para interactuar con otras células del sistema inmune y establecer un diálogo recíproco con macrófagos, células dendríticas (CD) y LT (3,9,10).

Las células NK humanas se definen como células que expresan el marcador de superficie CD56 y carecen de la expresión de CD3 (células CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>) (8). A su vez, dada la importancia de los modelos murinos como herramienta en el campo de la

inmunología, resulta importante mencionar que las células NK de ratón carecen de la expresión de CD56, por lo que fenotípicamente se definen como células CD3<sup>-</sup>CD49b<sup>+</sup> o CD3<sup>-</sup>NK1.1<sup>+</sup>, según la cepa de ratón utilizada (11). En ambas especies las células NK están ampliamente distribuidas en el organismo, estando presentes tanto en órganos linfáticos como no linfáticos. La mayoría de las células NK humanas se encuentra circulando en sangre periférica, donde constituyen del 5 al 15% de las células linfoides, pero también se encuentran en médula ósea, hígado, útero, bazo, hueso y pulmón, y en una menor proporción en órganos linfáticos secundarios y timo (12,13). Si bien las células NK humanas y murinas presentan una distribución similar, otra diferencia notable es que las células NK murinas 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 (14).

Entre las células NK humanas pueden distinguirse dos subpoblaciones de acuerdo a los niveles de expresión de los marcadores CD56 y CD16 (receptor FcγIII, que reconoce la porción Fc de la inmunoglobulina (Ig) G). Una de las poblaciones presenta una expresión intermedia del marcador CD56 y alta de CD16 (células CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>), la otra presenta una alta expresión de CD56 y baja o nula de CD16 (células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup>). Aproximadamente el 90% de las células NK que circula en sangre periférica (PBNK) y bazo son células NK CD56<sup>dim</sup>, esta subpoblación expresa altos niveles de granzimas y perforinas (Pfp), mediadores de citotoxicidad (3). Sin embargo, más allá de que estas células producen citoquinas luego del reconocimiento de las células blanco, se considera que la función efectora principal de las células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> es la citotoxicidad natural y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) (15). Por el contrario, la mayoría de las células NK en los ganglios linfáticos y amígdalas son células NK CD56<sup>bright</sup>, esta subpoblación secreta grandes cantidades de IFN-γ, TNF-α y GM-CSF (*Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) en respuesta a la estimulación con diversas citoquinas proinflamatorias (16) pero posee escasa capacidad citotóxica debido a que expresan bajos niveles de granzimas y Pfp, sin embargo, pueden adquirir esta función luego de una activación prolongada (17).

Diferentes evidencias experimentales respaldan la hipótesis de que las células NK CD56<sup>bright</sup> representan una etapa temprana en la maduración de las células NK, progresando a células NK CD56<sup>dim</sup>. Se ha demostrado que las células NK CD56<sup>bright</sup> presentan telómeros más largos que las células NK CD56<sup>dim</sup>, y a su vez, pueden adquirir características de las células NK CD56<sup>dim</sup> luego de la activación con citoquinas (18). Por otro lado, también se ha observado que luego del trasplante de células hematopoyéticas las células NK CD56<sup>bright</sup> son las células predominantes, y su frecuencia disminuye post-trasplante junto con un aumento de la frecuencia de células NK CD56<sup>dim</sup> (19). Además, 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> (20–22).

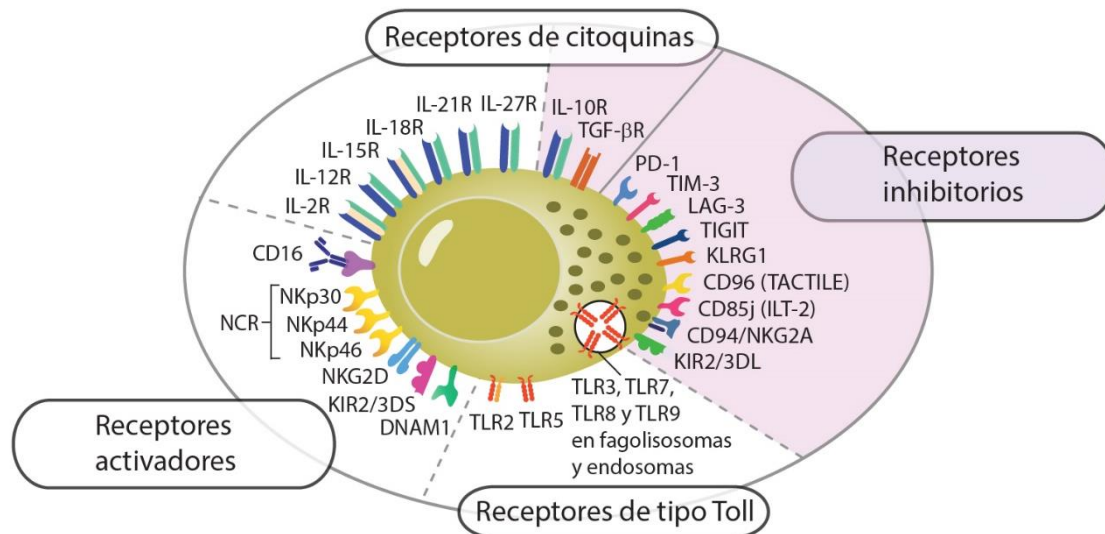
Durante procesos inflamatorios, infecciones virales y el crecimiento tumoral, las células NK son rápidamente reclutadas desde sangre periférica a los tejidos afectados por medio de factores quimiotácticos y moléculas de adhesión (7). Las células NK CD56<sup>dim</sup> expresan en su superficie los receptores CXCR1 y CX3CR1 que responden a interleuquina (IL)-8 y fraktalquina (CX3CL1) los cuales intervienen en el reclutamiento en los sitios inflamatorios periféricos (3). Mientras que las células NK CD56<sup>bright</sup> expresan CCR5, CXCR3 y CXCR4, lo que les permite migrar en respuesta a las quemoquinas RANTES (CCL5), MIP-1b (CCL4), ITAC (CXCL11) e IP-10 (CXCL10) (23), además, expresan el receptor CCR7 que las direcciona a ganglios linfáticos en respuesta a CCL19 y CCL21 (3). Como mencionamos, además de los factores quimiotácticos son necesarias las moléculas de adhesión para el reclutamiento de las células NK a los tejidos, entre ellas se destacan las integrinas  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , y los ligandos de E y P-selectinas en las células NK CD56<sup>dim</sup> y L-selectina (CD62L) en las células NK CD56<sup>bright</sup> (7,12).

Las células NK derivan de las células madre hematopoyéticas (*Haemopoietic Stem Cells*, HSC), su desarrollo se produce principalmente en la médula ósea, y al igual que ocurre con otras células hematopoyéticas, la diferenciación de las células NK es inducida por citoquinas, la activación de factores de transcripción e interacciones celulares. El precursor linfoide común (CLP) expresa el factor de transcripción ID2,

mientras que la diferenciación hacia las células NK está guiada principalmente por Eomesodermina (Eomes) y T-bet (3). En cuanto a las citoquinas involucradas, se ha demostrado que la IL-15 juega un rol central promoviendo la diferenciación de células NK, su maduración funcional y sobrevivencia (24), durante el desarrollo de las células NK esta citoquina actúa en combinación con IL-7, Flt3-L (ligando de Flt3) y SCF (*Stem Cell Factor*) (25). A su vez, se demostró que IL-21 en sinergia con Flt3L e IL-15 promueve la expansión y diferenciación de las células NK (26). Aunque el desarrollo de las células NK se produce principalmente en médula ósea, 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 (27), timo (28) e hígado (29), lo que sugiere que algunos subconjuntos de células NK humanas se desarrollan en compartimentos extramedulares.

## 2. RECEPTORES

Las células NK presentan un amplio panel de receptores que incluyen receptores de citoquinas, receptores de quemoquinas, receptores de reconocimiento de patrones y receptores que funcionalmente se dividen en activadores e inhibitorios (**Figura 1**). Esta variedad de receptores permite a las células NK sensor tanto factores solubles como estructuras expresadas en la superficie de la célula blanco. La integración de las señales de activación e inhibición que reciben a través de dichos receptores permite regular la actividad de las células NK (23).



**Figura 1: Principales receptores expresados en la superficie de las células NK.** Se muestran los principales receptores activadores e inhibitorios, receptores de citoquinas y receptores de tipo Toll. Figura tomada y modificada de (23).

Normalmente la actividad de las células NK se encuentra restringida por receptores que imparten señales inhibitorias. Cuando estos receptores inhibitorios reconocen a sus ligandos, se produce el reclutamiento y activación de las fosfatasa SHP-1 (*Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase-1*) y SHP-2 a través de secuencias denominadas ITIM (*Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) presentes en sus dominios citosólicos, dando lugar a cascadas de señalización que evitan la activación de las células NK (30–32). Entre los receptores inhibitorios más estudiados en humanos se encuentran los KIR (*Killer cell immunoglobulin-like receptors*), ILT (*Immunoglobulin-like transcript*)-2 (denominado también CD85j) y los heterodímeros CD94/NKG2A, que reconocen principalmente moléculas clásicas y no clásicas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH), que en humanos se denominan antígenos leucocitarios humanos (HLA o *Human leukocyte antigen*), y están presentes constitutivamente en la mayoría de las células normales (23,33,34).

La familia altamente polimórfica de receptores KIR está conformada por glicoproteínas transmembrana que contienen dos o tres dominios extracelulares de tipo Ig de tipo C2 y en humanos reconocen las moléculas de clase I clásicas del HLA: HLA-A, -

B y -C (35). Por otro lado, el receptor inhibitorio ILT-2 puede reconocer moléculas de clase I clásicas del HLA, sin embargo, se unen con mayor afinidad a la molécula no clásica HLA-G (36). Mientras que el heterodímero CD94/NKG2A, reconoce a la molécula no clásica HLA-E, caracterizadas por un polimorfismo limitado (37,38).

A su vez, las células NK expresan otros receptores inhibitorios que contienen secuencias ITIM pero no reconocen moléculas del CMH, como NKR-P1 (CD161), KLRG1, Siglec-7 (CD328), LAIR-1 (CD305), CEACAM-1, PILR $\alpha$ , TACTILE (CD96) y TIGIT. (39).

Por otro lado, las células NK también expresan receptores activadores, entre ellos se destacan la molécula CD16, el receptor NKG2D (*Natural killer group 2 member D*), el receptor DNAM-1 y los receptores de citotoxicidad natural (*Natural Cytotoxicity Receptors*, NCR) integrados por las moléculas NKp30, NKp44 y NKp46 (40). La mayoría de los receptores activadores interactúan con proteínas adaptadoras como CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ Rly y DAP12 (*DNAX-activation protein 12*) que poseen motivos ITAM (*Immunoreceptor tyrosin-based activating motif*), mientras que NKG2D se asocia a la proteína adaptadora DAP10 que posee un motivo YxxM y son las que transducen las señales de activación. La unión de estos receptores a sus ligandos resulta en la activación de una cascada de fosforilación, mediada por tirosin-quinazas intracelulares, que llevan a la activación y degranulación de las células NK (39,40).

El receptor CD16, como se mencionó previamente, es un receptor Fc $\gamma$ III, que reconoce la porción Fc de la Ig G y es el responsable de la CCDA mediada por células NK (41). Por otra parte, entre los receptores activadores NKG2D es el mejor caracterizado y probablemente el más importante. Este receptor no se expresa sólo en células NK sino también en células NKT, LT CD8<sup>+</sup>, subconjuntos de LT CD4<sup>+</sup> y en LT  $\gamma\delta$  (42) y reconoce como ligandos (NKG2DL) a las moléculas MICA (*MHC class I chain-related protein A*), MICB y a los miembros de la familia de ULBP (*UL16 binding proteins*) ULBP1, ULBP2, ULBP3, ULBP4, ULBP5 y ULBP6 en humanos (42–45). Aunque los NKG2DL no están presentes en las células de la mayoría de los tejidos sanos, pueden expresarse en células infectadas con virus, en células transformadas o como consecuencia de la activación celular (46,47). La expresión de NKG2DL en la superficie de las células tumorales y su unión a NKG2D promueve la citotoxicidad de las células NK contra ellas, sin embargo,

muchas células tumorales liberan NKG2DL solubles mediante diversos mecanismos tales como la secreción de exosomas o el clivado de la superficie celular por acción de las proteasas ADAM10 y ADAM17. Las formas solubles de MICA y de los ULBP pueden inducir una disminución en la expresión de NKG2D en las células NK lo que resulta en una menor actividad citotóxica, por tal motivo, los NKG2DL solubles liberados por células tumorales constituyen un mecanismo de escape tumoral (48).

Otro de los receptores activadores importantes en el reconocimiento de las células tumorales es DNAM-1, cuyos ligandos son nectina-2 (CD112) y PVR (receptor del virus de la polio, CD155) (49) y se expresan frecuentemente en muchos tipos de tumores malignos sólidos y hematológicos, el bloqueo de las interacciones de este receptor con sus ligandos reduce la capacidad de las células NK para destruir células tumorales (50). Con respecto a la familia de NCR, tanto NKp30 como NKp46 se expresan en todas las células NK humanas independientemente de su estado de activación, mientras que NKp44 se expresa en células NK activadas (51). Aunque muchos ligandos de esta familia de receptores aún permanecen desconocidos, se han identificado ligandos de NCR de origen tanto celular como viral, bacteriano y parásito; algunos de los ligandos celulares conocidos son B7-H6 y BAT3 para NKp30, NKp44L para NKp44, y vimentina para NKp46 (39)

Las células NK expresan adicionalmente receptores de reconocimiento de patrones, 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 (PAMP) (52). Sin embargo, la respuesta a los agonistas de TLR parecería requerir de la presencia simultánea de citoquinas pro-inflamatorias (52,53).

Como mencionamos anteriormente, las células NK también expresan receptores para diversas citoquinas, entre ellas: IL-1, IL-2, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, IFN de tipo I y el factor de crecimiento transformante (*Transforming growth factor, TGF*)- $\beta$  que juegan un rol crucial en la regulación de sus funciones efectoras. Mientras que los IFN de tipo I, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 e IL-21 cumplen un papel fundamental en la activación



de las células NK contra agentes infecciosos y células tumorales, TGF- $\beta$  regula negativamente su activación. Entre las citoquinas claves en la activación de las células NK se destacan IL-12, IL-15 e IL-18, que pueden ser secretadas por monocitos, macrófagos y CD (23).

Por su parte, IL-12 fue identificada por su capacidad de inducir la producción de IFN- $\gamma$  y la citotoxicidad de las células NK. Mientras que IL-12 sola es un estímulo relativamente débil para la secreción de IFN- $\gamma$ , constituye un estímulo potente para desencadenar la citotoxicidad de las células NK contra diferentes células blanco (23). Por otro lado, también se ha observado que esta citoquina puede afectar la proliferación de las células NK (54,55).

En cuanto a IL-15, además del rol en la diferenciación de las células NK mencionado previamente, regula la activación, proliferación, la citotoxicidad al aumentar los niveles de Pfp, y estimula la sobrevivencia de estas células a través de un aumento en la expresión de Bcl-2 (24,56). A diferencia de otras citoquinas que ejercen sus efectos como proteínas solubles, IL-15 es transpresentada unida a la subunidad  $\alpha$  del receptor de IL-15 (IL-15R $\alpha$ ) en la superficie de monocitos activados y CD (57).

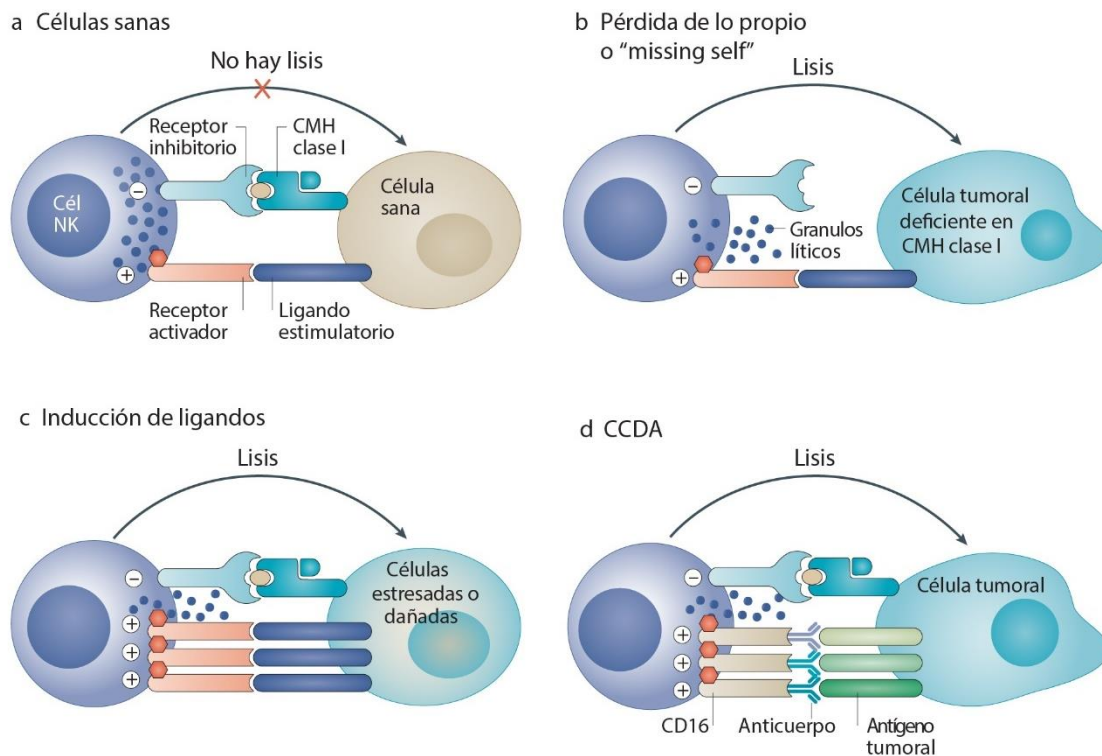
Por último, IL-18 es miembro de la familia de citoquinas de IL-1, es sintetizada como una pro-citoquina y su forma activa se produce por el clivaje de pro-IL-18 por acción de caspasa-1, de forma similar a lo que ocurre con IL-1 $\beta$  (58,59). Además, se la ha encontrado como proteína de membrana, pero esta forma también requiere de caspasa-1 para adquirir su forma activa (60). IL-18 exhibe características proinflamatorias de la familia de IL-1, como inducir aumentos en la expresión de moléculas de adhesión, síntesis de óxido nítrico y producción de quemoquinas (60), a su vez, aumenta la secreción de IFN- $\gamma$ , la citotoxicidad y la sobrevivencia de las células NK (61–63). La actividad de IL-18 se equilibra con la presencia de una proteína de unión a IL-18 de alta afinidad (IL-18BP) que al unirse a IL-18 regula negativamente su actividad. Por otra parte, IFN- $\gamma$  aumenta la expresión génica y la síntesis de IL-18BP, impulsando un bucle de retroalimentación negativa (64).

IL-18 por sí sola no es capaz de inducir IFN- $\gamma$  (60), pero posee un efecto sinérgico con IL-12 para su producción (65), debido a un efecto de “*priming*” de IL-18 para IL-12

(66). También se demostró que el estímulo combinado de IL-18 e IL-12 induce la proliferación de las células NK (55).

### 3. REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN Y FUNCIONES EFECTORAS

Las funciones de las células NK se encuentran finamente reguladas por un equilibrio entre las señales de activación e inhibición. En condiciones normales prevalecen las señales desencadenadas por receptores inhibitorios, lo que evita la eliminación de las células sanas (**Figura 2A**), mientras que para iniciar una respuesta inmune contra células infectadas o células tumorales necesitan señales de activación potentes (67). Durante situaciones patológicas tales como la infección por patógenos intracelulares o transformaciones malignas puede disminuir o desaparecer la expresión de moléculas de clase I del CMH en la superficie de las células afectadas, lo que las hace susceptibles al reconocimiento por las células NK (**Figura 2B**). Este fenómeno es conocido como “reconocimiento por pérdida de lo propio” (*missing self*) (68). Por otra parte, como se mencionó anteriormente, en células tumorales o infectadas con virus frecuentemente se produce un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores de células NK, lo que genera un balance en favor del desarrollo de sus funciones efectoras, superando las señales inhibitorias (**Figura 2C**) (67). Otra forma de activación es a través del reconocimiento de Ig G mediado por CD16 (**Figura 2D**), lo que induce la CCDA (67), que es relevante para el efecto de terapias antitumorales basadas en anticuerpos monoclonales (AcMo) (69).



**Figura 2: Balance de señales en la activación o inhibición de células NK.** (A) Las células normales expresan altos niveles de moléculas de clase I del CMH, prevalecen las señales inhibitorias por sobre las señales activadoras y las células NK se mantienen inhibidas. (B) En células tumorales puede producirse la pérdida de expresión de moléculas de clase I del CMH, este fenómeno conocido como reconocimiento por pérdida de lo propio (*"missing self"*) junto con otras señales activadoras promueve la activación de las células NK. (C) Células estresadas aumentan la expresión de ligandos de receptores activadores cuyas señales superan a las señales generadas por los receptores inhibitorios activando las células NK. (D) Los anticuerpos contra antígenos específicos se unen a CD16 en las células NK a través de su región Fc y desencadenan la CCDA. Figura tomada y modificada de (67).

Como se mencionó previamente, además de la actividad citotóxica espontánea y la producción de citoquinas proinflamatorias, las células NK adquieren relevancia por su capacidad de modular la respuesta inmune adaptativa a través de la interacción con otras células del sistema inmune. 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 (70,71).

Las células NK son la principal fuente de IFN- $\gamma$  durante las primeras fases de la respuesta inmune (72) y su producción depende de la presencia de otras células del sistema inmune o de citoquinas accesorias (como IL-12, IFN de tipo I o IL-18) en el sitio

de inflamación (73,74), tal como se observó en diversos estudios donde la estimulación de células NK con la combinación de diferentes citoquinas fue suficiente para inducir la secreción de citoquinas y quemoquinas (75–77).

Las células NK pueden utilizar dos mecanismos distintos de citotoxicidad, uno involucra la vía secretoria y el otro la vía de receptores de muerte celular (78). En la vía secretoria, las células NK movilizan gránulos citotóxicos hacia el sitio de contacto con la célula blanco, estableciendo una sinapsis inmunológica entre ambas células. Los gránulos citotóxicos se encuentran preformados y contienen un núcleo proteico formado por diferentes granzimas, incluida granzima B (una serinproteasa capaz de activar caspasas) y Pfp. Una vez producida la liberación del contenido de los gránulos citotóxicos al espacio sináptico entre ambas células (proceso denominado “degranulación”), en el pH neutro del espacio extracelular la Pfp puede unirse a la célula blanco formando poros en la membrana con una estructura similar a un canal transmembrana, permitiendo el ingreso de la granzima B. Adicionalmente, el contenido de los gránulos citotóxicos puede ser endocitado por la célula blanco, donde la granzima B accede al citoplasma a través de poros formados por la Pfp en la membrana de las vacuolas y provoca la activación de una cascada de caspasas que inducirán la degradación del ADN y la muerte por apoptosis (78–80). Los gránulos citotóxicos también contienen la proteína LAMP-1 (*Lysosome-associated membrane protein* o CD107a) (78), que en estado de reposo se encuentra recubriendo la superficie interior de los gránulos y no se expresa en la superficie celular, pero tras la activación, al fusionarse los gránulos citotóxicos con la membrana plasmática y liberar su contenido al exterior celular, se induce su movilización transitoria hacia la superficie celular, permitiendo su detección por citometría de flujo con Ac específicos, por lo que usualmente se utiliza como marcador de degranulación (81,82).

En el segundo mecanismo de citotoxicidad, la vía de receptores de muerte celular, participan miembros de la familia del TNF tales como el ligando de Fas (FasL) y TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (78). Las células NK en reposo almacenan FasL en lisosomas secretores especializados que, cuando son activadas, se translocan a la superficie celular como resultado del proceso de degranulación (83); sin embargo, el

almacenamiento de FasL parece ocurrir mayormente en gránulos secretores distintos a los gránulos que contienen granzimas y Pfp (84). La unión de FasL a su receptor Fas (CD95) 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 (85). No obstante, FasL unido a la superficie celular puede ser clivado por metaloproteasas liberando FasL soluble (86) que posee menor capacidad citotóxica (87). De forma similar a lo descrito para FasL, las células NK pueden conducir a la apoptosis a través de TRAIL. La expresión de TRAIL es inducible y, mediante experimentos *in vivo*, se demostró que su inducción mediada por IFN- $\gamma$  en las células NK contribuye a la prevención del crecimiento de tumores primarios y de la diseminación de metástasis experimentales (88). A su vez, TRAIL también puede ser clivado pero, contrariamente a lo que ocurre con FasL, la forma soluble de TRAIL conserva su actividad citotóxica (89). En humanos TRAIL es capaz de unirse a cuatro receptores de membrana TRAIL-R1 (DR-4), TRAIL-R2 (DR-5), TRAIL-R3 (DCR1), TRAIL-R4 (DCR2) y al receptor soluble TRAIL-R5 (*osteoprotegerin*); pero únicamente los dos primeros pueden inducir la apoptosis y se expresan más ampliamente (90).

#### 4. DIÁLOGO RECÍPROCO ENTRE CÉLULAS MIELOIDES Y CÉLULAS NK

Los monocitos, macrófagos y CD pertenecen al subgrupo de leucocitos denominado células mieloides. Durante la respuesta inmune se establece una interacción entre estas células y las células NK, la cual resulta de gran trascendencia para el desarrollo de una respuesta adaptativa eficiente, contra las infecciones y contra células tumorales. Estas células mieloides son las principales productoras de IL-12, IL-15 e IL-18 (91), que potencian la activación de las células NK y la producción de IFN- $\gamma$ , además las células mieloides también son capaces de estimular a las células NK a través del contacto directo de célula a célula (92–95).

Los monocitos humanos pueden dividirse en 3 poblaciones de acuerdo a los niveles de expresión de CD14 y CD16: monocitos clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>), intermedios

(CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup>) (96). Los monocitos intermedios y no clásicos representan un porcentaje menor, alrededor del 5-10 % en ambos casos, los primeros están especializados en la presentación de antígenos y juegan un papel importante en infecciones virales, mientras los segundos se consideran anti-inflamatorios ya que mantienen la homeostasis vascular (97,98), por otro lado, los monocitos clásicos constituyen la población más abundante (cerca del 85%) y son críticos para la respuesta inflamatoria ya que se reclutan rápidamente al sitio de infección y pueden diferenciarse a macrófagos inflamatorios o CD (96,99). Diversos estudios han identificado macrófagos y CD derivados de monocitos también en tejidos como intestino (100,101), piel (102), pulmón (103,104), hígado (105) y corazón (106). Estas células tienen capacidad fagocítica (107) y producen eficientemente TNF- $\alpha$ , especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (99). En particular, en el contexto del cáncer, pueden reconocer a las células tumorales debido a diferencias en la composición de las membranas celulares, como mayor contenido de fosfatidilserina, glicosilación alterada, expresión de antígenos tumorales (como el antígeno carcinoembrionario y el antígeno Tn) o de CD47 (108). Por medio de funciones que incluyen la fagocitosis, la secreción de factores solubles, la promoción de la angiogénesis, la remodelación de la matriz extracelular y el reclutamiento de linfocitos pueden contribuir tanto a la inmunidad protumoral como antitumoral, ya que pueden desempeñar funciones opuestas debido a las diferencias en el tipo de cáncer, al microambiente tumoral y la etapa de crecimiento del tumor (109).

Las células NK inducen la diferenciación de monocitos a CD en sitios de infección (110). La interacción entre CD y células NK puede ocurrir tanto en los sitios de inflamación como en los ganglios linfáticos, y el desarrollo de funciones efectoras por parte de las células NK está finamente regulado por su interacción con CD, y el resultado de esta interacción es bidireccional ya que puede a su vez conducir tanto a la maduración, a la activación o a la apoptosis de las CD, dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares (111,112). Se ha sugerido que la eliminación de CD mediada por células NK, proceso denominado “edición de CD” y que involucra a los receptores NKp30 y DNAM-1, contribuye a mantener la calidad de la maduración de CD, ya que si estas células migran a ganglios linfáticos secundarios con una maduración

incompleta (baja expresión de moléculas de clase I del CMH o moléculas co-estimuladoras como CD80, CD83 y CD86) pueden inducir una respuesta inmune adaptativa deficiente o tolerogénica (7,113). Además, las células NK pueden contribuir en el perfilado de la respuesta inmune adaptativa, tanto contra tumores como contra patógenos, por medio de la secreción de citoquinas producidas durante la interacción con las CD (114). En este sentido, se observó que el IFN- $\gamma$  secretado por las células NK estimula la producción de IL-12 por las CD, lo que induce la diferenciación de los LT CD4<sup>+</sup> *naive* hacia un perfil Th1. A su vez, la IL-12 secretada por CD potencia la secreción de IFN- $\gamma$  y la capacidad citotóxica de las células NK, contribuyendo aún más al perfil Th1 (115). En conjunto, la interacción de estas células con las células NK da como resultado el desarrollo de una respuesta innata eficiente, a través de la activación de células NK, y una potente respuesta inmune adaptativa, a través de la edición y maduración de CD mediada por NK (93).

Mientras que la interacción entre células NK y CD se encuentra bien descrita, la interacción con monocitos/macrófagos permanece menos estudiada. Se conoce que la interacción de las células NK con los macrófagos estimula en las primeras la proliferación, secreción de citoquinas, aumento en la expresión de receptores activadores y la citotoxicidad contra células blanco (116). Se ha demostrado, por ejemplo, que macrófagos humanos previamente estimulados con LPS inducen tanto un aumento en la expresión de CD25 y CD69 en las células NK como la citotoxicidad contra células tumorales y CD inmaduras, mediante factores solubles, dado que el aumento en dichos marcadores también ocurre al impedir el contacto entre macrófagos y células NK mediante *transwells* (117); mientras que la interacción dependiente del contacto celular entre células NK y macrófagos estimulados con LPS o bacterias gram positivas es crítica para desencadenar la producción de IFN- $\gamma$  y la proliferación en las células NK, por ejemplo mediante 2B4 expresado en las células NK y CD48 expresado en macrófagos (94,116,117).

## 5. FUNCIONES REGULATORIAS

Más allá de la función clásica citotóxica de las células NK, en los últimos años se ha descrito que estas células también pueden ejercer un rol regulatorio sobre LT y CD (118) en diversos modelos de infecciones virales (119–122), trasplante (123) y autoinmunidad (124). En relación a infecciones virales, se ha demostrado en modelos de infección con citomegalovirus murino (MCMV) que las células NK pueden eliminar LT CD4<sup>+</sup> activados en glándulas salivales mediante TRAIL (120), así como regular la magnitud de la respuesta de los LT CD8<sup>+</sup> a través de la producción de IL-10 (125). En ratones infectados con el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) las células NK median la eliminación de LT CD8<sup>+</sup> activados de manera dependiente de Pfp (121,122). En forma indirecta, la activación de los LT puede verse afectada como consecuencia de la eliminación de CD por parte de las células NK por mecanismos que involucran Pfp o mediante TRAIL, tal como se demostró en modelos de MCMV y LCMV (119,126,127). En humanos, se observó en muestras de pacientes con infección crónica con el virus de hepatitis B (HBV) que las células NK pueden rápidamente eliminar LT específicos contra HBV a través de TRAIL (128). A su vez, también se demostró *in vitro* que mediante la secreción de IL-10 las células NK humanas pueden suprimir la proliferación de LT antígeno-específicos (129). Otros ensayos *in vitro* demostraron que la lisis mediada por células NK tanto de LT CD4<sup>+</sup> como de LT CD8<sup>+</sup> activados involucra interacciones entre NKG2D y NKG2DL expresados en los LT (130).

En el contexto de infecciones virales crónicas y otras condiciones inmunopatológicas, la actividad regulatoria de las células NK puede contribuir a la homeostasis y la prevención del daño tisular asociado a la actividad de LT. En consecuencia, algunos pacientes con trastornos autoinmunes muestran un número reducido de células NK, que además presentan una capacidad citotóxica alterada (131).

Sin embargo, la participación de células NK con capacidad inmunoregulatoria durante una respuesta inmune antitumoral ha sido menos explorada. En modelos tumorales de ratón se observó que las células NK pueden inhibir la presentación cruzada de antígenos por las CD a través de TRAIL (132). Las células NK también pueden inducir



la lisis de LT CD8<sup>+</sup> activados y afectar la diferenciación de LT de memoria central, y en este contexto, la eliminación transitoria de células NK en ratones lleva a un control más eficaz de tumores (133). Por otro lado, un estudio reciente demostró que las células NK infiltrantes de tumor (TINK) de pacientes con sarcoma y tumor de mama expresan altos niveles de CD73 (y otros puntos de control inmunológicos) y a través de la secreción de IL-10 inhiben la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y la producción de IFN- $\gamma$ , y su presencia se asocia con tumores de mayor tamaño (134). Además, en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas una mayor frecuencia de células NKp46<sup>+</sup> circulantes se asoció con una disminución de la supervivencia, y ensayos *in vitro* demostraron que el bloqueo de NKp46 mejora la producción de IFN- $\gamma$  en LT CD4<sup>+</sup> específicos contra antígenos tumorales (135).

En este contexto, resultados obtenidos en nuestro laboratorio, también contribuyen al estudio del rol regulatorio de las células NK de ratones portadores de tumor (136). En este trabajo demostramos que en los ratones desafiados con el tumor MC57, la depleción de células NK induce un aumento de LT CD8<sup>+</sup> efectores específicos contra antígenos tumorales y de LT CD8<sup>+</sup> de memoria. Además, en ausencia de células NK, las CD muestran un fenotipo más maduro que en los ratones no depletados. Llamativamente, se observó que las células NK de ratones portadores de tumor mostraban un incremento en la expresión de la molécula inhibitoria PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*, CD274), y que eran capaces de controlar la maduración de CD *in vivo* e *in vitro* a través de PD-L1. En resumen, según estos resultados, el reconocimiento de las células tumorales induce un aumento en la expresión de la molécula inhibitoria PD-L1 en las células NK, que al interactuar con el receptor PD-1 (*Programmed death 1*, CD279) expresado en las CD limitan su maduración y consecuentemente inhiben la activación de LT CD8<sup>+</sup> específicos contra antígenos tumorales (136).

## INMUNOLOGÍA ANTITUMORAL

### 1. TEORÍA DE LA INMUNOEDICIÓN

La respuesta inmune antitumoral es el resultado de un complejo proceso dinámico que se establece entre las células tumorales, las células del sistema inmune y las células del estroma que conforman el microambiente tumoral. Sabemos que el sistema inmune es capaz de montar respuestas antitumorales y que todas las lesiones neoplásicas presentan en menor o mayor medida un infiltrado inflamatorio compuesto por células tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa (137). El crecimiento de tumores en pacientes inmunocompetentes, por lo tanto, evidencia la existencia de mecanismos de evasión de la respuesta inmune (138). Esto es debido a que durante el proceso de inmunovigilancia, por el cual las células tumorales son reconocidas y eliminadas exitosamente por el sistema inmune, previniendo el desarrollo del tumor maligno y la progresión a las fases siguientes, también se genera una presión evolutiva sobre las células tumorales que termina seleccionando aquellas células que presentan ventajas adaptativas para sobrevivir en el huésped inmunocompetente. Teniendo en cuenta la acción protectora del sistema inmune y la acción modeladora sobre el tumor en desarrollo, R. Schreiber postuló la teoría de inmunoedición del cáncer denominada también “teoría de las tres E”, según la cual el proceso de inmunoedición puede dividirse en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (139). Estas etapas comprenden un complejo proceso dinámico donde los distintos mecanismos pueden ocurrir en forma secuencial o simultánea.

Durante la fase de eliminación ocurre la inmunovigilancia del cáncer, donde las células tumorales son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune innato y adaptativo. Si bien este proceso no ha sido visualizado *in vivo* en humanos, existen 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. Se observó, por ejemplo, un aumento en la incidencia de tumores en pacientes trasplantados inmunosuprimidos (140), en pacientes con

inmunodeficiencias primarias (141) y en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (142).

La fase de equilibrio se produce cuando las células tumorales no logran ser eliminadas en su totalidad por el sistema inmune, y pueden ser mantenidas en estado latente por largos períodos de tiempo, generándose un equilibrio dinámico entre la proliferación de las células tumorales y la eliminación de algunas de ellas. La existencia de esta fase se observó en experimentos en los cuáles ratones inmunocompetentes tratados con un carcinógeno en dosis bajas albergaron células tumorales latentes durante un período de tiempo prolongado, y al depletar LT se indujo la rápida aparición de los tumores en el sitio de inyección original del carcinógeno, demostrando el papel crítico de la inmunidad adaptativa en el mantenimiento de latencia del tumor (143).

Sin embargo, la inestabilidad genética de las células tumorales junto con la presión del sistema inmune puede seleccionar clones tumorales menos inmunogénicos, capaces de evadir el reconocimiento y la eliminación por parte del sistema inmune (144). Los mecanismos de escape pueden incluir la adquisición de defectos en el procesamiento y presentación de antígenos o la pérdida de antígenos tumorales inmunogénicos, adicionalmente, las células tumorales pueden adquirir otras propiedades inmunosupresoras, tales como la expresión de PD-L1 o la secreción de citoquinas regulatorias, como IL-10 o TGF- $\beta$ , y orquestar un microambiente tumoral inmunosupresor (145). Estos tumores inmunoeditados pueden entrar en la fase de escape, en la que pueden proliferar sin control y la enfermedad se vuelve clínicamente evidente (144).

## 2. PD-L1 Y ESCAPE TUMORAL

El receptor inhibitorio PD-1 y sus ligandos PD-L1 (CD274) y PD-L2 (CD273) son claves en la regulación de la respuesta inmune, desempeñando un rol fundamental en la inducción de tolerancia, lo que previene la aparición de fenómenos de

autoinmunidad, pero también contribuyen a inhibir la respuesta inmune antitumoral (146).

PD-L1 y PD-L2, son glicoproteínas transmembrana de tipo I, y presentan diferentes patrones de expresión. Mientras que la expresión de PD-L2 se encuentra restringida a CD activadas, macrófagos, mastocitos derivados de la médula ósea y linfocitos B (LB) B1 peritoneales, la molécula PD-L1 se expresa constitutivamente en bajos niveles en LT, LB, CD, macrófagos, células madre mesenquimales y mastocitos, así como en células no hematopoyéticas (por ejemplo células madre pulmonares, células endoteliales, islotes pancreáticos o neuronas) y su expresión puede aumentar por activación (147). Las citoquinas son fuertes estímulos para la expresión de ambos ligandos. Particularmente, PD-L1 puede ser inducido por IFN de tipo I (IFN- $\alpha$  y  $\beta$ ) y II (IFN- $\gamma$ ) y por TNF- $\alpha$  en LT, LB, células endoteliales y epiteliales; por IL-2, IL-7 e IL-15 en LT, por IL-21 en LB y por IL-10 en monocitos (148).

PD-1 se expresa principalmente en LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> activados (149). Es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las Ig, y en su dominio citosólico presenta secuencias ITIM e ITSM (*Immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) (148). Al unirse a sus ligandos se induce el reclutamiento y activación de la fosfatasa SHP-2, que desfosforila moléculas clave de la transducción de señales del receptor de antígeno en LT, proporcionando una señal inhibitoria la cuál conduce a la inactivación de las vías de señalización río abajo, como las vías PI3K-AKT y Ras-MEK-ERK, dando como resultado la apoptosis, anergia y agotamiento celular, y de esta manera contribuye a mantener la homeostasis y regula la duración y la amplitud de la respuesta inmune, lo que minimiza el daño tisular circundante a un foco inflamatorio y evita la autoinmunidad (40,150). Así, el eje PD-1/PD-L1 actúa como un “reóstato” del umbral de activación de los LT en la periferia (151,152) y es por eso que se lo considera uno de los puntos de control inmunológico más relevantes de la respuesta inmune adaptativa.

Esta vía inhibitoria adquiere relevancia en la respuesta inmune contra el cáncer debido a que PD-L1 se expresa diferencialmente durante la progresión tumoral principalmente en células tumorales (150). Si bien también se ha descrito la expresión

de PD-L1 en células del sistema inmune infiltrantes de tumor (153–156), su expresión en células NK humanas no ha sido estudiada en profundidad.

La expresión de PD-L1 se ha demostrado en una amplia variedad de tumores, tanto sólidos, tales como cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer gástrico, angiosarcoma, cáncer de próstata, carcinoma colorectal, carcinoma de células renales (RCC), entre otros; así como en neoplasias malignas hematológicas como leucemia, mieloma múltiple y linfoma (157). Se ha descrito que la expresión de PD-1 en los linfocitos infiltrantes de tumor se correlaciona con características agresivas y peor pronóstico para el paciente (158), ya que la unión de este receptor a las células tumorales que expresan PD-L1 en su superficie da como resultado la anergia y apoptosis de los LT CD8<sup>+</sup> (150). Por otra parte, PD-L2, de expresión más restringida, se encuentra elevado en ciertos linfomas de células B (159).

Dado que PD-1 también puede expresarse en LB, células mieloides y células NK (149) el eje PD-1/PD-L1 no sólo es capaz de inhibir las respuestas de LT, sino que también actúa sobre estas células del sistema inmune. En este contexto se describió que la expresión de PD-1 en CD regula la maduración/activación de estas células durante la respuesta inmune antitumoral (160,161) y se demostró que las células NK también pueden expresar altos niveles de PD-1, en pacientes con sarcoma de Kaposi, linfoma de Hodgkin o tumores de ovario, lo que inhibe sus funciones efectoras (162–164).

La inducción de la expresión de PD-L1 en las células tumorales está asociada por un lado a la activación de distintas vías de señalización oncogénicas (165,166), pero también se ve incrementada por citoquinas inflamatorias como IFN de tipo I y II, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-7, IL-15, IL-21 e IL-27 (40,167,168), siendo el IFN- $\gamma$  considerado uno de los inductores más potentes de la expresión de PD-L1 (150). A su vez, recientemente se ha descrito que la señalización intrínseca de PD-L1 en las células tumorales, a través de motivos de señalización conservados, les otorga protección contra la citotoxicidad del IFN y contribuye con la progresión tumoral (169).

### 3. INMUNOTERAPIAS

La inmunoterapia busca estimular ciertos blancos terapéuticos o inhibir otros durante la respuesta inmune antitumoral. La utilización de distintos AcMo para lograr la inhibición de puntos de control inmunológicos (ICI o *immune checkpoint inhibitors*) como CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, Ipilimumab y Tremelimumab) (170) y el eje PD-1 (Nivolumab y Pembrolizumab)/PD-L1 (Atezolizumab, Avelumab y Durvalumab) (171) ha revolucionado el campo de la inmunoterapia y está demostrando un gran éxito clínico como inmunoterapia del cáncer (159). Actualmente también están siendo evaluados nuevos ICI dirigidos contra otras moléculas como TIM-3 (*T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3*), TIGIT (*T cell immunoglobulin and ITIM domain*), LAG-3 (*Lymphocyte activation gene-3*), VISTA (*V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation*), ICOS (*Inducible T cell costimulatory*) y BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*) (172).

CTLA-4 es un receptor inhibitorio expresado en los LT, que al igual que CD28 reconoce a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Sin embargo, CTLA-4 reconoce a ambas moléculas con mayor afinidad que CD28, desplazando su unión y de esta manera inhibe la activación de los LT, además, es capaz de inducir la trans-endocitosis de CD80 y CD86, afectando la capacidad estimuladora de las CD (173). CTLA-4 actúa principalmente en la fase inicial de la activación de los LT en los ganglios linfáticos y cumple una función primordial limitando la autoinmunidad, mientras que la vía de PD-1/PD-L1 actúa fundamentalmente en la fase efectora, evitando el daño tisular colateral durante la respuesta inmune (174).

La utilización de AcMo bloqueantes de PD-1 fue aprobada por la FDA para el tratamiento de melanoma metastásico en 2014. Desde ese momento, se han aprobado AcMo bloqueantes de PD-1 o PD-L1 para más de 20 tipos distintos de cáncer avanzado, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, RCC, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vejiga, linfoma de Hodgkin, cáncer cervical y endometrial, cáncer de mama triple negativo, entre otros (175). Sin embargo, a pesar de haber demostrado eficacia en el tratamiento para estos diversos tipos de cáncer, aún existen desafíos por sortear, que

incluyen la reducida población que se beneficia de la terapia, la farmacorresistencia, los efectos adversos relacionados con el tratamiento y la falta de biomarcadores predictivos y pronósticos (176).

Actualmente la mayoría de las aprobaciones de ICI están basadas principalmente en la expresión de PD-L1 en las células tumorales (177), sin embargo, aunque el principio subyacente a la administración de estos AcMo surge de contrarrestar el mecanismo de escape tumoral basado en el aumento de expresión de PD-L1 en el tumor, se observó que la expresión de PD-L1 en las células tumorales no representa un biomarcador adecuado como predictor de la eficacia del tratamiento con el AcMo bloqueante. De hecho, uno de los problemas surge de que la expresión de PD-L1 en diferentes sitios del tejido tumoral es variable, incluso si se toman muestras de los mismos sitios en diferentes momentos (178), por lo tanto, es necesario una mejor comprensión del microambiente tumoral y el uso de otros biomarcadores. A su vez, existen reportes que muestran que pacientes con tumores que no expresan PD-L1 también responden a la terapia con AcMo bloqueantes de este punto de control inmunológico y excluirlos del tratamiento implicaría perder potenciales respondedores (179). Por ejemplo, los pacientes con tumores metastásicos de vejiga que presentan infiltrado de células inmunes con alta expresión de PD-L1 tienen particularmente una alta tasa de respuesta al tratamiento con un AcMo bloqueante de PD-L1 (independientemente de la expresión de PD-L1 en las células tumorales) (180). Se observaron resultados similares en pacientes con cáncer de pulmón (181). Sin embargo, se desconoce la importancia relativa de la expresión de PD-L1 en los leucocitos en el microambiente tumoral y de qué manera las células del sistema inmune que expresan PD-L1 contribuyen a la progresión del tumor. En este contexto, resulta importante el estudio de la expresión de PD-L1 en las células NK y su potencial capacidad inmunoregulatoria, ya que podrían estar contribuyendo al escape tumoral, y podrían ser parte del mecanismo de acción terapéutico de los AcMo bloqueantes de la vía PD-1/PD-L1.

## CARCINOMA DE CÉLULAS RENALES

El RCC representa, a nivel mundial, el sexto tipo de cáncer más frecuente en hombres y el décimo en mujeres (182). Según las propiedades morfológicas, citogenéticas y moleculares del tumor se definen cinco tipos de RCC. Entre los más frecuentes se encuentran los derivados de células epiteliales del túbulo proximal, el RCC de células claras (ccRCC) (70–90%) y el carcinoma papilar renal de tipo I y II (PRCC) (10–15%); otros subtipos menos frecuentes incluyen el carcinoma de células renales cromóforas (ChRCC, 3–5%), el oncocitoma renal (RO) benigno (2-5%) y el cáncer de conducto colector (1-2%) cuyo origen se encuentra en las células intercaladas de los conductos colectores del riñón (183,184).

En la mayoría de los casos el RCC ocurre sin un patrón hereditario reconocible (185), y dentro de los diversos factores de riesgo identificados, el tabaquismo, la obesidad y la hipertensión son los más fuertemente asociados con el RCC (182).

Para los pacientes diagnosticados en estadíos tempranos de RCC el pronóstico es bueno, con tasas de supervivencia a cinco años del 81% para el estadio I y del 74% para el estadio II, pero desafortunadamente el pronóstico empeora para los pacientes con estadíos más avanzados (186–188). La intervención quirúrgica es la modalidad de tratamiento primario, sin embargo, alrededor del 20% de los pacientes sometidos a nefrectomía sufren una recaída y desarrollan RCC metastásico durante el seguimiento. Por otra parte, dada la ausencia de síntomas, el diagnóstico erróneo y la falta de herramientas de detección, una proporción de los pacientes con RCC mayor al 17% ya presentan metástasis al momento del diagnóstico. En estos casos, la expectativa de vida después de la detección de metástasis no es superior a los 10 a 13 meses (189,190).

Los pacientes con RCC metastásico pueden ser tratados con inhibidores de tirosina quinasa (como Sunitinib, Axitinib, Sorafenib y Pazopanib) o AcMo que bloquean el factor de crecimiento endotelial vascular (*Vascular endothelial growth factor*, VEGF) o a su receptor (VEGFR), relacionados con la angiogénesis (191); otras alternativas incluyen la inhibición de la proteína mTOR utilizando Everolimus o Temsirolimus, dado que la desregulación de la activación de la vía PI3K-AKT-mTOR a diferentes niveles de la



cascada de señalización impulsa la progresión del RCC (192), sin embargo, casi todos los pacientes finalmente adquieren resistencia a estas terapias, incluso luego de un beneficio inicial (192,193).

En este contexto, en la última década, comenzaron a implementarse ICI dirigidas al eje PD-1/PD-L1 y CTLA-4 (194). Los primeros ensayos clínicos de ICI en RCC utilizaron el AcMo Ipilimumab (anti-CTLA-4) (195), luego se utilizó Nivolumab (anti-PD-1) (196), recientemente se aprobó el uso de Pembrolizumab (anti-PD-1) (197), y el uso de Atezolizumab (anti-PD-L1) está siendo evaluado en diversos ensayos clínicos, como primera línea de tratamiento o en combinación con otras terapias (198–200). Mientras ensayos clínicos informan que el tratamiento en primera línea con ICI o en combinación con inhibidores de tirosina quinasa presentan una respuesta del 39-70% (201–205), el tratamiento de segunda línea presenta una respuesta del 25% (206).

Entre los biomarcadores más utilizados para el tratamiento con ICI se encuentran la expresión de PD-L1 en los tumores y la carga mutacional del tumor, sin embargo, la expresión de PD-L1 como biomarcador es cuestionable dado que se han observado respuestas clínicas al bloqueo de PD-1 en pacientes con baja de expresión de PD-L1 (207). Recientemente, utilizando técnicas inmunohistoquímicas se identificó como potencial biomarcador de la terapia con ICI un alto infiltrado de LT CD8<sup>+</sup> y macrófagos asociados a tumor (*Tumor-associated macrophages*, TAM) CD68<sup>+</sup> con bajo infiltrado de LT CD4<sup>+</sup> que se asociaron con una buena respuesta al tratamiento y sobrevida (208). Sin embargo, aún existen preguntas críticas 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 y los mecanismos de resistencia primaria, entre otras (193,209). Además, la recurrencia y las metástasis siguen siendo un problema importante para los pacientes debido al desarrollo de múltiples estrategias de inmunoevasión tumoral.

En el contexto del estudio de células NK con capacidad regulatoria, el RCC resulta de particular interés dado que un análisis de datos de RNASeq de TGCA (*The Cancer Genome Atlas*) de diversos tipos tumorales revela un alto infiltrado de células NK en

tumores de ccRCC (210), pero llamativamente, se asocia con un peor pronóstico (211), por lo que resulta necesario ahondar en los factores y mecanismos que pueden estar regulando la actividad de las TINK en estos pacientes.

En relación al impacto del microambiente tumoral sobre las TINK se ha demostrado en diferentes tipos de cáncer, incluido el RCC, que las TINK se vuelven disfuncionales y muestran alteraciones fenotípicas (212–215). A su vez, nuestro laboratorio ha demostrado que las TINK de pacientes con ccRCC exhiben una mayor expresión de marcadores de activación pero una menor expresión de los receptores activadores DNAM-1, NKp30, NKp46 y CD16, sugiriendo un fenotipo más inhibitorio (216). Aún más, las TINK de estos pacientes presentan alteraciones en sus funciones efectoras, tanto en degranulación como en la producción de IFN- $\gamma$ , un metabolismo alterado y un aumento en la expresión de TIM-3, lo que sugiere el agotamiento de las células (217). Estos hallazgos motivan a investigar con mayor profundidad el rol de las células NK en la progresión tumoral de pacientes con RCC.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

El estudio de los mecanismos celulares involucrados en la respuesta inmune antitumoral es de suma importancia ya que permite el uso racional de las terapias existentes, representa la base del desarrollo de nuevas inmunoterapias, del estudio de nuevos biomarcadores con utilidad en el diagnóstico, pronóstico y del tratamiento del cáncer.

Si bien está ampliamente reportada la capacidad de las células NK de eliminar células tumorales y producir citoquinas proinflamatorias como parte de la respuesta innata antitumoral, existen evidencias que demuestran un rol regulatorio de estas células en diversos modelos de infecciones virales, trasplantes y autoinmunidad; sin embargo, el impacto de dichas funciones en el contexto tumoral continúa poco explorado. En este sentido, los resultados previos de nuestro laboratorio indican que las células NK de ratones portadores de tumor expresan la molécula inhibitoria PD-L1 y adquieren un fenotipo regulatorio, que les permite limitar la maduración de las CD y consecuentemente inhibir la activación de LT CD8<sup>+</sup> antitumorales *in vivo*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes **hipotetizamos** que las células NK humanas luego de reconocer células tumorales comienzan a expresar la molécula inhibitoria PD-L1 y se polarizan hacia un perfil con capacidad inmunoregulatoria, lo que resulta en una respuesta inmune antitumoral menos eficiente. Por lo tanto, el **objetivo general** de esta tesis fue elucidar los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan la generación de células NK regulatorias en humanos frente al reconocimiento de células tumorales y evaluar su capacidad regulatoria sobre la respuesta inmune antitumoral.

En particular, nos propusimos:

1. Evaluar la expresión de PD-L1 en las células NK de pacientes con ccRCC.
2. Dilucidar los mecanismos celulares y moleculares que regulan la expresión de PD-L1 en células NK.
3. Investigar la capacidad regulatoria de las células NK PD-L1<sup>hi</sup>.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

## 1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Se utilizó la plataforma GEPIA2 [*Gene Expression Profiling Interactive Analysis*, <http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>] (218) para analizar datos de RNASeq de TGCA (*The Cancer Genome Atlas*). Se utilizó el conjunto de datos de carcinoma renal de células claras (KIRC, n=516) para realizar un análisis de *Kaplan-Meier* del efecto del infiltrado de células NK en la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global. El infiltrado de células NK se estimó en función de la expresión de 10 genes asociados a células NK (NCR1, XCL1, XCL2, NCAM1, NCR3, IL18RAP, KIR2DL4, KLRC3, KLRD1 y NCR2) (219–222). Los pacientes se separaron en dos grupos, aquellos con un alto infiltrado de células NK (alta expresión de los genes asociados a células NK, cuartil superior) y aquellos con un bajo infiltrado de células NK (baja expresión de los genes asociados a células NK, cuartil inferior). Las diferencias entre grupos se analizaron con la prueba de rango logarítmico (logrank, Mantel-Cox) y se estimó el cociente de riesgo (*hazard ratio*, HR) utilizando un modelo de riesgos proporcionales de Cox en GEPIA2.

## 2. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Se obtuvieron muestras de sangre periférica y de biopsias tumorales de pacientes con ccRCC sin tratamiento previo. Las biopsias fueron obtenidas a partir de nefrectomías parciales o radicales realizadas en los servicios de urología del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas “Norberto Quirno” (CEMIC) y del Hospital Alemán. Las características de los pacientes se listan en la **Tabla 1**. El volumen tumoral, expresado en cm<sup>3</sup>, se calculó como: ancho x alto x profundidad, agrupando como tumores chicos a los menores a 40 cm<sup>3</sup>, y como tumores grandes a los mayores a dicho volumen. Las muestras de sangre periférica de donantes sanos (DS) fueron provistas por el Servicio de Medicina Transfusional del Complejo Hospitalario Médico “Churrucavisca”. La utilización de las muestras biológicas contó con la aprobación del Comité de

Etica pertinente (IBYME-CONICET), y a su vez, la utilización de las muestras de pacientes contó con el consentimiento informado de los participantes.

Paciente	Género	Edad	Estadio
1*	F	56	ISUP/Fuhrman II
2	M	80	ISUP II
3*	F	71	Fuhrman II
4*	F	82	ISUP/Fuhrman III
5*	M	81	ISUP II
6	F	58	ISUP/Fuhrman III
7	F	65	ISUP II
8	M	74	ISUP II
9	F	81	ISUP II
10*	M	64	ISUP II
11	F	73	ISUP/Fuhrman II
12	M	57	ISUP II
13	M	69	ISUP/Fuhrman II
14	F	42	ISUP III
15	M	67	ISUP II
16	M	73	ISUP III
17	F	57	ISUP II
18	M	66	ISUP II
19	F	70	Fuhrman III
20	F	61	Fuhrman I
21	M	59	Fuhrman I
22	F	86	Fuhrman II

*\*Sólo se utilizaron muestras de sangre periférica*

**Tabla 1:** Pacientes con ccRCC incluidos en este trabajo.

### 3. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE BIOPSIAS TUMORALES

Las muestras de biopsias tumorales se conservaron en solución fisiológica (SF) a 4°C hasta el momento del procesamiento, el cual se realizó el mismo día de la cirugía, en frío y condiciones de esterilidad. Las muestras fueron disgregadas en forma mecánica en placas de Petri de 100 mm conteniendo SF hasta obtener suspensiones homogéneas que fueron filtradas a través de un filtro de nylon con poros de 70 ó 100  $\mu\text{m}$  (Biofil). La suspensión celular obtenida fue lavada exhaustivamente con SF, centrifugada a 500 g y finalmente resuspendida en RPMI completo. Las células viables se contabilizaron en

cámara de Neubauer con el colorante Azul de Tripán. Finalmente, las muestras se marcaron AcMo para su análisis por citometría de flujo.

#### 4. LÍNEAS CELULARES

Se emplearon las siguientes líneas humanas: la línea de ccRCC 786-O (ATCC CRL-1932); la línea celular SN12c de RCC con un fenotipo mixto, entre indiferenciado y de células claras (223), cedida gentilmente por el Dr. Gabriel Fiszman (Instituto de Oncología Angel H. Roffo, Buenos Aires); y la línea celular de leucemia mieloide crónica K562 (ATCC CCL-243), que al no expresar moléculas de clase I del CMH, constituye un blanco universal de células NK. Las mismas fueron cultivadas en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB, Natocor) inactivado previamente por calor, 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina (ambos de Invitrogen) y 40 µg/ml de gentamicina (Bagó) como antibiótico (RPMI completo). Las células se mantuvieron en estufa a 37 °C; con atmósfera humidificada y 5 % CO<sub>2</sub>.

#### 5. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS

##### *5.1. Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)*

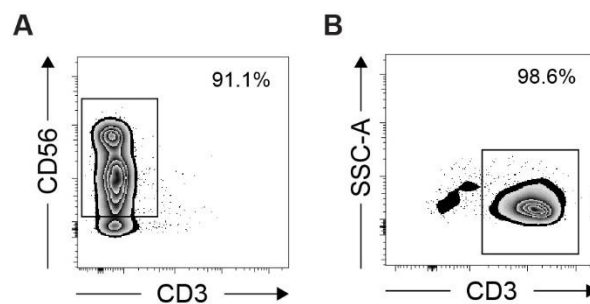
Los PBMC fueron obtenidos por centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Life Sciences) de muestras de sangre periférica de pacientes con ccRCC o de DS. Las muestras de sangre fueron diluidas previamente al medio con SF, luego sembradas sobre un colchón de Ficoll y centrifugadas durante 20 min a 800 g utilizando un programa sin freno ni aceleración. Posteriormente la interfase conteniendo los PBMC fue levantada utilizando una pipeta Pasteur y transferida a un tubo Falcon estéril en el que se realizaron dos lavados con SF. Los PBMC obtenidos fueron resuspendidos en



medio RPMI completo y las células viables fueron contadas en cámara de Neubauer con el colorante Azul de Tripán.

### 5.2. Aislamiento de células NK y LT

Las células NK y los LT fueron aislados a partir de muestras de sangre periférica de DS utilizando el kit comercial de aislamiento por selección negativa RosetteSep™ (StemCell). Como primer paso se aislaron entre  $2 \times 10^7$  y  $4 \times 10^7$  PBMC como se describió anteriormente, y los mismos fueron resuspendidos en 500  $\mu$ l de sangre fresca del mismo donante (con el fin de proveer glóbulos rojos, necesarios para realizar la técnica de roseteo). Se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente (TA) con 50  $\mu$ l del reactivo RosetteSep™ para células NK o LT según corresponda. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 10 ml de SF y sembradas sobre un colchón de Ficoll, luego centrifugadas y lavadas con el mismo programa utilizado para el aislamiento de PBMC. La pureza de las células se evaluó por citometría de flujo mediante marcación con AcMo, células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> para células NK (**Figura 3A**) y células CD3<sup>+</sup> para LT (**Figura 3B**), y en todos los casos fue mayor al 90%.

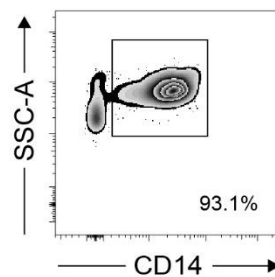


**Figura 3: Pureza de las células linfoides.** Zebra plots representativo de la pureza de las células NK (**A**) y los LT (**B**) aislados luego de eliminar dobletes, mayor al 90%.

### 5.3. Aislamiento de monocitos (Mo)

Se aislaron Mo de sangre periférica de DS por selección positiva inmunomagnética de células CD14<sup>+</sup>. Brevemente, se obtuvieron PBMC como se describió anteriormente, se realizaron dos lavados con SF centrifugando 10 min a 250 g y las células obtenidas fueron resuspendidas en 1 ml de buffer Miltenyi (NaCl 150 mM,

fosfatos 50 mM, (PBS), pH=7,2 con 0,5% de albúmina sérica bovina y 2 mM de EDTA). Se realizó un recuento de PBMC en cámara de Neubauer, se consideró que el 30% de las células correspondía a Mo y se agregó 1  $\mu$ l de microesferas acopladas al AcMo anti-CD14 (Miltenyi Biotec) por cada  $1 \times 10^6$  de Mo calculados. Las células fueron incubadas durante 15 min a 4°C luego de lo cual se realizó un lavado con SF centrifugando durante 10 min a 250 g. El *pellet* fue resuspendido en 2,5 ml de buffer Miltenyi y colocado en un tubo estéril de 5 ml dentro de un magneto durante 7 min. Se descartó el líquido por volcado, sin retirar el tubo del magneto. A continuación, se agregaron nuevamente 2,5 ml de buffer, se repitió la incubación y posterior descarte del líquido. Se retiró el tubo del magneto y el mismo fue lavado con buffer, el volumen total se transfirió a un tubo Falcon estéril y se centrifugó a 300 g durante 10 min. Finalmente, los Mo aislados se resuspendieron en medio RPMI completo. Las células viables fueron contadas en cámara de Neubauer con el colorante Azul de Tripán. La pureza de los Mo se evaluó por citometría de flujo mediante marcación con AcMo (células CD14<sup>+</sup>) y fue mayor al 90% (Figura 4).



**Figura 4: Pureza de los Mo.** Zebra plot representativo de la pureza de los Mo aislados luego de eliminar dobletes, mayor al 90%.

## 6. ENSAYOS DE CO-CULTIVO

Se realizaron cultivos de PBMC ( $5 \times 10^5$  células) o células NK aisladas ( $1 \times 10^5$  células) en ausencia (medio) o presencia de células K562, SN12c o 786-O ( $3 \times 10^5$  células en todos los casos) en placas de 96 pocillos de fondo en “U”, en un volumen final de 200

μl. Luego de 48 hs se evaluó la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo.

En algunos cultivos se evaluó el número de células NK presentes, para ello se consideró el número de eventos adquiridos por el citómetro de flujo, correspondientes a células NK, en un volumen fijo de muestra.

### 6.1. Ensayos de degranulación

Se realizaron cultivos de PBMC en ausencia o presencia de las líneas celulares de RCC SN12c y 786-O. Las células fueron cultivadas durante 5 hs en presencia de Brefeldina A y Monensina (ambas de Biolegend) y AcMo CD107a, y luego evaluamos la degranulación (expresión de CD107a) en las células NK por citometría de flujo.

### 6.2. Ensayos de transwell

A fin de evitar el contacto célula-célula se realizaron cultivos separando las células utilizando dispositivos de *transwell* (Biofil) con poros de 0,4 μm que permiten únicamente el pasaje de factores solubles.

Para ello se sembraron  $1 \times 10^6$  PBMC en placas de 24 pocillos a los que se les colocó un *transwell* donde se sembraron  $6 \times 10^5$  células de la línea K562, SN12c o 786-O.

En otra serie de experimentos se sembraron células con el siguiente esquema:

- 1- En el pocillo  $2 \times 10^5$  células NK aisladas cultivadas en ausencia o presencia de  $6 \times 10^5$  células K562 (como control, sin *transwell*)
- 2- En la parte inferior del pocillo  $2 \times 10^5$  células NK aisladas y dentro del *transwell*  $1 \times 10^6$  PBMC y  $6 \times 10^5$  K562.
- 3- En la parte inferior del pocillo  $2 \times 10^5$  células NK aisladas y  $6 \times 10^5$  K562, y dentro del *transwell*  $1 \times 10^6$  PBMC.
- 4- En la parte inferior del pocillo  $2 \times 10^5$  células NK aisladas y  $6 \times 10^5$  K562, y dentro del *transwell*  $1 \times 10^6$  PBMC y  $6 \times 10^5$  K562.

En todos los casos se utilizó medio para completar un volumen final de 200 μl en la parte inferior del pocillo y el mismo volumen dentro del *transwell*.

### 6.3. Ensayos con medios condicionados (MC)

Se obtuvieron MC libres de células recolectando sobrenadantes de cultivos de PBMC en ausencia o presencia de células K562, los mismos fueron utilizados luego para estimular células NK aisladas en ausencia o presencia de K562. Luego de 48 hs se evaluó la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo.

### 6.4. Ensayos de bloqueo, neutralización y estimulación

En algunos cultivos de PBMC con K562 se realizó el bloqueo del receptor NKG2D y del receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ R) utilizando los AcMo anti-NKG2D (20  $\mu$ g/ml, clon 1D11, BioLegend) y anti-IFN- $\gamma$ R (10  $\mu$ g/ml, clon GIR-208, BioLegend) y la neutralización de IL-12, IL-15, IL-18 e IFN- $\gamma$  utilizando los AcMo anti-IL-12 (10  $\mu$ g/ml, clon QS-12p70, Abcam), anti-IL-15 (10  $\mu$ g/ml, clon ct2nu, eBioscience), anti-IL-18 (10  $\mu$ g/ml, clon 125-2H, MBL) y anti-IFN- $\gamma$  (10  $\mu$ g/ml, clon NIB42, BioLegend). En otros cultivos de PBMC con células SN12c y 786-O se realizó la neutralización de IL-18. En algunos cultivos con K562, a fin de bloquear la señalización a través del receptor de IL-1, se utilizó un antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) en distintas concentraciones (1, 10, 100 o 1000 ng/ml, Tonbo Biosciences). Los PBMC fueron preincubados con el AcMo neutralizante o con el antagonista durante 30 min luego de lo cual se agregaron las células tumorales.

Por otra parte, se realizaron cultivos de células NK aisladas en ausencia o presencia de células K562, y a su vez, en ausencia o presencia de la citoquina recombinante IL-18 (10 ng/ml, MBL). Adicionalmente, se realizaron cultivos de PBMC en presencia de diferentes concentraciones de la citoquina recombinante IL-1 $\beta$  (0,1, 1, 10 o 100 ng/ml, Tonbo Biosciences).

Luego de 48 hs las células fueron cosechadas y se analizó a la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo.

### 6.5. Ensayos con monocitos

Se realizaron cultivos de células NK aisladas en presencia de Mo autólogos aislados ( $1 \times 10^5$  células) con células K562, y en ausencia o presencia del AcMo

neutralizante anti-IL-18 (10 µg/ml). Luego de 48 hs se evaluó la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo.

### *6.6. Ensayos con inhibidores*

En otros cultivos de PBMC con células K562, a fin de inhibir distintos procesos intracelulares se utilizó catalasa (1000 U/ml, Sigma-Aldrich), L-NAME (100 µM, Sigma-Aldrich), A740003 (1 µM, Sigma-Aldrich), cloroquina (10 µM, Sigma-Aldrich), bafilomicina (100 nM, Enzo Life Sciences) y citocalasina D (10 µM, Sigma-Aldrich). Los PBMC fueron incubados con las distintas drogas durante 30 min a 37 °C, y posteriormente se agregaron las células K562. Luego de 48 hs las células fueron cosechadas, la expresión de PD-L1 en las células NK fue evaluada la por citometría de flujo y la concentración de IL-18 en los sobrenadantes de cultivo fue cuantificada por ELISA.

### *6.7. Ensayo de fagocitosis*

Se preincubaron Mo aislados ( $7,5 \times 10^4$  células) en ausencia o presencia de citocalasina D (10 µM) durante 30 min a 37 °C, posteriormente se agregaron células K562 ( $2,25 \times 10^5$  células) previamente marcadas con eFluorDye 670 (Invitrogen), en un volumen final de 150 µl. Luego de 30 min de cultivo las células fueron cosechadas, las mismas fueron marcadas con AcMo anti-CD14 con el fin de identificar a los Mo y se evaluó el porcentaje de fagocitosis por citometría de flujo, medido como el porcentaje de Mo (células CD14<sup>+</sup>) que eran positivas para eFluorDye 670.

## 7. CITOMETRÍA DE FLUJO

### *7.1. Anticuerpos*

Los AcMo utilizados se listan en la **Tabla 2**.

Reactividad	Clon	Fluorocromo	Empresa
anti-CD56	N901	APC	Beckman Coulter
anti-CD8	RPA-T8	PE/Cy7	Tonbo Biosciences
anti-CD3	UCHT1	APC	Tonbo Biosciences
		VioletFluor 450	Tonbo Biosciences
		PE	BioLegend
		FITC	BioLegend
anti-CD14	M5E2	FITC	BioLegend
anti-PD-L1	29E.2A3	PE/Cy7	BioLegend
anti-CD25	BC96	PE	BioLegend
anti-IL-18R $\alpha$	H44	PE	BioLegend
anti-CD69	FN50	FITC	BioLegend
anti-IFN- $\gamma$	4S.B3	PE	BioLegend
anti-CD107a	H4A3	Brilliant Violet 421	BioLegend
anti-FasL	NOK-1	PE	BioLegend
anti-CD34	581	PerCP/Cy5-5	BioLegend
anti-CD45	H130	APC/Cy7	BioLegend
anti-TRAIL	75402	AlexaFluor 488	R&D Systems

**Tabla 2:** AcMo contra moléculas humanas utilizados para las inmunomarcaciones.

### 7.2. Inmunomarcación de superficie

Las inmunomarcaciones directas de superficie se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en "V". Las células fueron lavadas con SF y luego resuspendidas en 20  $\mu$ l de la dilución correspondiente de AcMo conjugados a fluorocromo. Las diluciones de los AcMo se realizaron en SF con 10% de suero normal de ratón con el objetivo de bloquear las uniones inespecíficas. Luego de una incubación de 30 min a 4 °C en oscuridad, se lavaron con 100  $\mu$ l de SF y se fijaron con 10  $\mu$ l de una solución de paraformaldehído (PFA) 4% durante 15 min en oscuridad a TA. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en SF y se mantuvieron a 4 °C y oscuridad hasta el momento en que fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

### 7.3. Inmunomarcación intracitoplasmática

La inmunomarcación intracitoplasmática de IFN- $\gamma$  se realizó a continuación de la inmunomarcación de superficie directa con AcMo anti-CD3 y anti-CD56. Para ello, las células se lavaron e incubaron con 80  $\mu$ l del reactivo FOXP3 Fix/Perm (BioLegend)

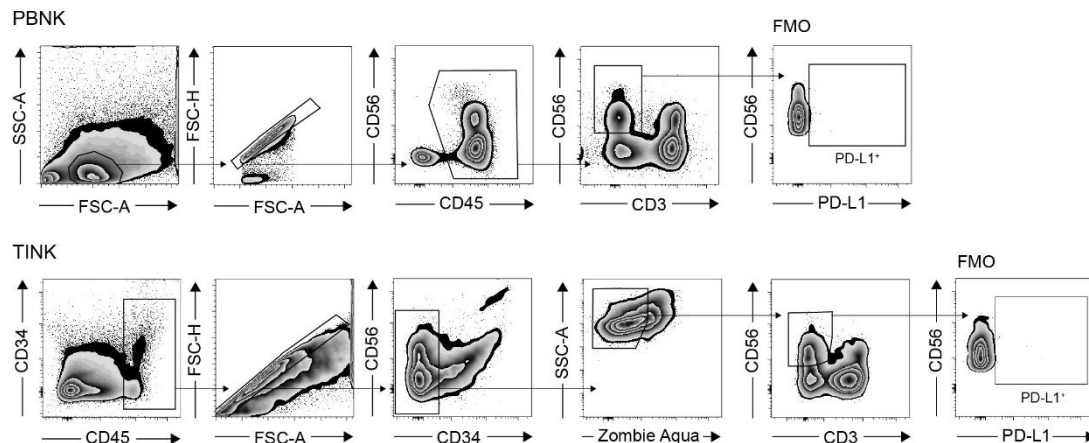
durante 20 min a TA. Posteriormente, las células fueron lavadas con SF y permeabilizadas utilizando 80 µl del reactivo FOXP3 Perm (BioLegend) durante 15 min a TA en oscuridad. Las células fueron nuevamente lavadas con SF e incubadas con el AcMo anti-IFN-γ durante 30 min a TA en oscuridad. La dilución del AcMo se realizó utilizando el reactivo FOXP3 Perm. Al término de la incubación, se realizó un lavado con SF y una nueva fijación con el fin de preservar la marcación intracitoplasmática. Finalmente, las células fueron lavadas y resuspendidas en SF y se mantuvieron a 4 °C y oscuridad hasta el momento en que fueron adquiridas en el citómetro de flujo.

#### 7.4. Evaluación de activación y funciones efectoras de las células NK

En algunos cultivos de PBMC con células K562 se evaluó a las 48 hs la expresión de distintos marcadores relacionados con la activación (CD25), *homing* (CD69) y funciones efectoras (TRAIL, FasL, CD107a e IFN-γ) de las células NK por citometría de flujo. Para evaluar la degranulación (expresión de CD107a) y la producción de IFN-γ las células fueron cultivadas durante las últimas 5 hs en presencia de Brefeldina A y Monensina.

#### 7.5. Expresión de PD-L1 en muestras de pacientes con ccRCC

Las muestras de los pacientes con ccRCC fueron marcadas siguiendo el protocolo descrito en la sección 7.2. Las muestras de sangre periférica se marcaron para CD45, CD3, CD56 y PD-L1. Las células NK de sangre periférica (PBNK) se definieron como CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>, dentro de las cuales se evaluó la expresión de PD-L1. Por otro lado, las suspensiones celulares obtenidas a partir de las biopsias tumorales fueron marcadas para CD34, CD45, CD3, CD56, PD-L1 y ZombieAqua (dil 1/600, BioLegend) para evaluar viabilidad celular. La expresión de PD-L1 se evaluó en las células NK intratumorales (TINK) vivas (células ZombieAqua<sup>low</sup>CD45<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>). En ambos casos se utilizó el FMO (*Fluorescence Minus One*) para determinar las poblaciones PD-L1<sup>-</sup> y PD-L1<sup>+</sup>, siguiendo la estrategia de *gating* de la **Figura 5**.

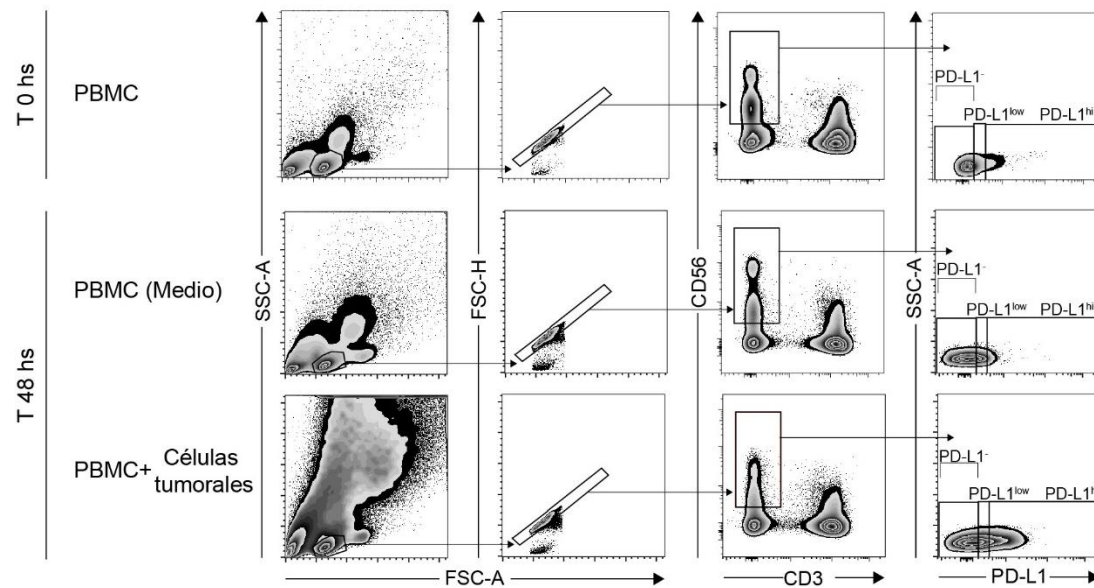


**Figura 5: Estrategia de *gating* para la expresión de PD-L1 en pacientes con ccRCC.** Estrategia empleada para analizar la expresión de PD-L1 en PBNK y TINK de pacientes con ccRCC. Las PBNK se definieron como  $CD45^+CD3^-CD56^+$  y las TINK como  $ZombieAqua^{low}CD45^+CD34^-CD3^-CD56^+$ . En ambos casos se utilizó el FMO para determinar las poblaciones  $PD-L1^-$  y  $PD-L1^+$ .

### 7.6. Expresión de PD-L1 en células NK estimuladas *in vitro*

Las células NK aisladas o los PBMC fueron marcados para CD3, CD56 y PD-L1 luego de los cultivos, y se analizó la expresión de PD-L1 en las células NK (células  $CD3^-CD56^+$ ). Se realizó la misma marcación para las muestras a tiempo 0 hs y se fijaron tres regiones o *gates* en función de la expresión basal de PD-L1 en las células NK. Se establecieron de esta manera tres poblaciones, una que no expresa PD-L1 ( $PD-L1^-$ ), otra con baja expresión de PD-L1 ( $PD-L1^{low}$ ) y otra con alta expresión de PD-L1 ( $PD-L1^{hi}$ ), estos *gates* fueron los utilizados para analizar las células luego del cultivo. La estrategia de *gating* se muestra en la **Figura 6**.





**Figura 6: Estrategia de *gating* para la expresión de PD-L1 *in vitro*.** Estrategia empleada para analizar la expresión de PD-L1 *in vitro* en las células NK. Se seleccionaron las células linfoides de acuerdo a su tamaño y granularidad, se eliminaron los dobletes, y se seleccionaron las células NK (CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>). Se fijaron dos *gates* en función de la expresión basal de PD-L1 en las células NK a tiempo 0 hs. Se establecieron de esta manera dos poblaciones, una con baja expresión de PD-L1 (PD-L1<sup>low</sup>) y otra con alta expresión de PD-L1 (PD-L1<sup>hi</sup>), estos *gates* fueron los utilizados para analizar las células luego de los cultivos.

Las muestras fueron adquiridas utilizando el equipo FACSCanto II (BD, Bioscience), MACSQuant Analyzer 10 o MACSQuant Analyzer 16 (Miltenyi Biotec) y los datos obtenidos se analizaron con el programa FlowJo (v10 Tree Star). Los resultados se expresaron en algunos casos como porcentaje de células positivas y en otros casos como intensidad de fluorescencia media (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*).

## 8. ELISA

Con el objeto de cuantificar IL-18 secretada durante algunos de los cultivos se analizaron los sobrenadantes por medio de ensayos de ELISA *sandwich*. Para ello se incubaron las placas de ELISA (COSTAR 3590 de alto pegado) con un AcMo anti-IL-18 (5 µg/ml, clon 125-2H, MBL) como Ac de captura durante 18 hs a 4 °C en cámara húmeda.

Luego de cuatro lavados con PBS-0,05% Tween 20 (Buffer de lavado, BL) las placas se bloquearon con PBS-BSA 1% durante 1 h a 37 °C. Se realizaron cuatro lavados con BL y se sembraron 50 µl/pocillo de los sobrenadantes de cultivo o el estándar de IL-18 recombinante (MBL) para trazar la curva de calibración. Las placas se incubaron durante 18 hs a 4 °C y luego se realizaron cuatro lavados con BL. A continuación, se agregó a cada pocillo el AcMo anti-IL-18 biotinilado (0,5 µg/ml, clon 159-12B, MBL) y se incubó durante 2 hs a TA, luego de lo cual se lavó cuatro veces con BL, se incubó con avidina marcada con HRP (BioLegend) durante 30 min a TA y se lavó cinco veces con BL. El revelado se realizó con una dilución de tetra-metil bencidina (TMB, Sigma-Aldrich) en buffer citrato fosfato (pH=5) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se frenó luego de 10-15 min con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N y se realizó la lectura en un lector de ELISA Multiskan FC (Thermo Fisher) utilizando los filtros de 450 nm y de 550 nm.

## 9. MARCACIÓN DE POBLACIONES CELULARES CON TRAZADORES FLUORESCENTES

Para las marcaciones con CFSE (*Carboxyfluorescein succinimidyl ester*, Invitrogen) las células se lavaron y resuspendieron en SF a una concentración de 20x10<sup>6</sup> células/ml, luego se diluyeron al medio con una solución de CFSE (10 µM en la marcación de Mo para microscopía, y 3 µM en la marcación de LT para proliferación), se incubaron durante 6 min a TA y se lavaron tres veces en frío con SF-SFB 10% a 600 g durante 5 min.

Para las marcaciones con eFluorDye 670 las células K562 se lavaron y resuspendieron en SF a una concentración de 5x10<sup>6</sup> células/ml, se diluyeron al medio con una solución 2 µM de eFluorDye 670, se incubaron durante 6 min a 37 °C y se lavaron tres veces en frío con SF-SFB 10% a 600 g durante 5 min, estas células fueron utilizadas en el ensayo de fagocitosis por citometría de flujo.

Para la tinción con Vybrant DiD (Invitrogen) las células K562 se lavaron y resuspendieron en SF a una concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml y se agregaron 5 µl de Vybrant DiD por cada ml de células, se incubaron durante 15 min a 37 °C y se lavaron

tres veces en frío con SF-SFB 10% a 600 g durante 5 min, estas células fueron utilizadas para evaluar la fagocitosis por microscopía.

En todos los casos al finalizar los lavados las células se resuspendieron en RPMI completo, se contaron y se utilizaron para los correspondientes experimentos.

## 10. MICROSCOPÍA

Para evaluar la fagocitosis por microscopía de fluorescencia se trataron cubreobjetos redondos de 12 mm con poly-L-lisina 0,02% (Sigma-Aldrich) durante 2 min, luego fueron lavados con agua y colocados en placas de 24 pocillos. Sobre los cubreobjetos se sembraron Mo aislados ( $1,25 \times 10^5$  células) previamente marcados con CFSE y se incubaron durante 30 min a 37 °C en medio de cultivo sin suero para favorecer la adhesión de los Mo al vidrio. Luego fueron cultivados en ausencia o presencia de células K562 ( $3,75 \times 10^5$  células) marcadas con Vybrant DiD en un volumen final de 250  $\mu$ l durante 2 hs a 37 °C. Posteriormente los vidrios fueron lavados dos veces con SF y fijados con PFA 4% durante 20 min a TA y oscuridad. Las células fueron permeabilizadas con buffer saponina frío (SF, 10% SFB, saponina 0,5%) durante 30 min a TA y en oscuridad. Finalmente, los vidrios fueron montados sobre portaobjetos con VectaShield (Vector Laboratories). Las imágenes fueron obtenidas con el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 880- Airyscan- Elyra P1 y procesadas con los programas ImageJ y ZEN (*blue edition*).

## 11. CELL SORTING Y ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T

Con el fin de evaluar la capacidad inmunosupresora de las células NK PD-L1<sup>hi</sup> se realizaron cultivos de PBMC ( $5 \times 10^5$  células) en ausencia o presencia de células K562 ( $3 \times 10^5$  células) en placa de 96 pocillos con fondo en “U” durante 48 hs. Posteriormente se cosecharon juntas las células de los pocillos pertenecientes a la misma condición de cultivo. Las células fueron marcadas con AcMo anti-CD3 y anti-CD56 tal como se detalla

anteriormente en la sección de citometría de flujo, pero en condiciones asépticas en buffer Miltenyi, y se realizó un *cell sorting* de las células NK (células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>) utilizando el equipo FACSAria II-plus (BD Bioscience). Las células aisladas fueron recolectadas en tubos estériles conteniendo RPMI completo suplementado con 20% de SFB. Las células NK provenientes de los cultivos en ausencia de células tumorales se denominaron células NKcontrol, y las provenientes de los cultivos con K562 se denominaron células NK*tumor-experienced* (NK-te).

Por otro lado, LT autólogos ( $5 \times 10^4$  células) previamente marcados con CFSE fueron cultivados en placas de 96 pocillos con fondo en "U" en ausencia o presencia de AcMo anti-CD3 (1,5 µg/ml, clon OKT3, BioLegend), previamente adsorbido a placa con SF durante 2 hs a 37°C, y de AcMo anti-CD28 soluble (1,5 µg/ml, clon CD28.2, BioLegend), con el fin de inducir su activación. A su vez, los LT que fueron estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 fueron cultivados en ausencia o presencia de células NKcontrol ( $10^4$ ;  $2,5 \times 10^4$  ó  $5 \times 10^4$  células) o NK-te ( $10^4$ ;  $2,5 \times 10^4$  ó  $5 \times 10^4$  células), y en ausencia o presencia de un AcMo bloqueante anti-PD-L1 (20 µg/ml, clon 29E.2A3, BioLegend). Luego de 5 días evaluamos la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> como dilución de CFSE por citometría de flujo. La proliferación fue normalizada con la proliferación de los LT en ausencia de células NK para cada donante.

Se calculó el porcentaje de proliferación relativa para LT CD4<sup>+</sup> o LT CD8<sup>+</sup> de la siguiente manera:

$$\frac{\% \text{ LT CFSE}^{\text{diluido}} \text{ (con células NKcontrol o NK-te)}}{\% \text{ LT CFSE}^{\text{diluido}} \text{ (sin células NK)}} \times 100$$

Adicionalmente se evaluó en los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> la frecuencia de expresión del marcador de activación CD25 y la frecuencia de células muertas (células ZombieAqua<sup>+</sup>).

## 12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

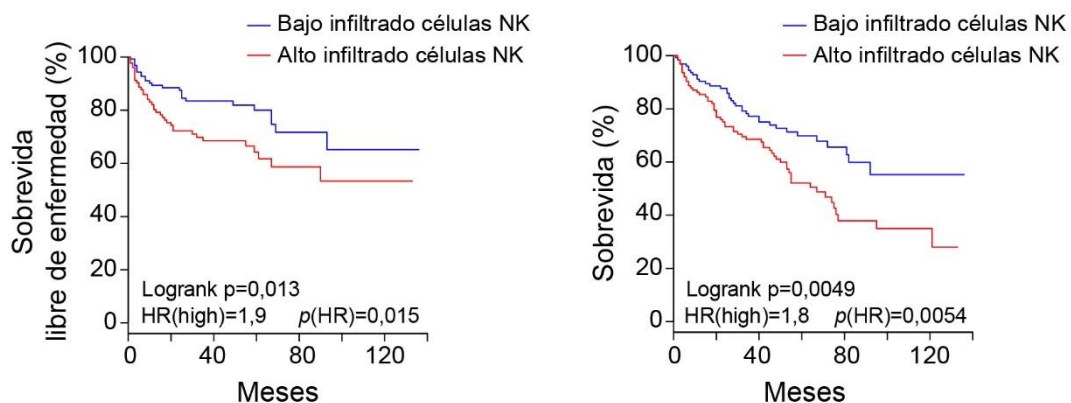
Las diferencias entre los conjuntos de datos se calcularon realizando un ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey para comparaciones múltiples o test post-hoc Dunnett para comparaciones contra una única condición. En otros conjuntos de datos se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc Sidak para comparaciones múltiples. Para comparación de dos grupos experimentales se utilizó el test estadístico *t* de Student y para evaluar correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Para el análisis se utilizó el programa GraphPad Prism 6 y se consideró  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

---

## 1. ROL DE LAS CÉLULAS NK EN LA PROGRESIÓN TUMORAL DE PACIENTES CON ccRCC

Con el objetivo de comenzar a estudiar el rol de las células NK en la progresión tumoral de pacientes con ccRCC y complementar los hallazgos de nuestro laboratorio acerca de las alteraciones fenotípicas y funcionales de las TINK en pacientes con ccRCC (216,217), realizamos un análisis de la base de datos TCGA utilizando la plataforma GEPIA2. Para estimar el infiltrado de células NK en dichas muestras a partir de los datos de RNAseq disponibles, utilizamos una firma de expresión genética que incluye 10 genes que se encuentran altamente expresados en células NK y que no se expresan o lo hacen débilmente en otras células (NCR1, XCL1, XCL2, NCAM1, NCR3, IL18RAP, KIR2DL4, KLRC3, KLRD1 y NCR2) (219–222). El análisis de sobrevida de Kaplan-Meier mostró que un alto infiltrado de células NK se asociaba con una menor sobrevida libre de enfermedad y una menor sobrevida en general (**Figura 7**). Estos resultados nos sugieren que la presencia de las células NK en el tumor puede tener un impacto negativo en la sobrevida de pacientes con ccRCC.

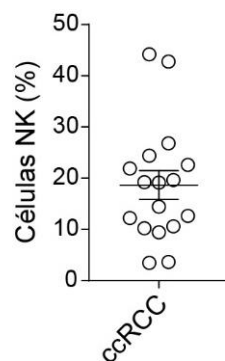


**Figura 7: Impacto del infiltrado de células NK en la sobrevida de pacientes con ccRCC.** Se realizó un análisis de sobrevida para pacientes con ccRCC (KIRC, n=516) a partir de datos disponibles en TCGA. La sobrevida libre de enfermedad (izquierda) y la sobrevida (derecha) de pacientes con alto (línea roja) y bajo (línea azul) infiltrado de células NK se estableció de acuerdo a la expresión de 10 genes asociados a células NK. Se muestran los gráficos de *Kaplan-Meier*, para los cuartiles superior (alto) e inferior (bajo infiltrado de células NK). El cociente de riesgo (*Hazard Ratio*, HR) y los valores de  $p$  se muestran en la parte inferior izquierda de cada curva.

Un mayor infiltrado de células NK en tumores se asocia con una disminución de la supervivencia de pacientes con ccRCC.

## 2. EXPRESIÓN DE PD-L1 EN CÉLULAS NK DE PACIENTES CON ccRCC

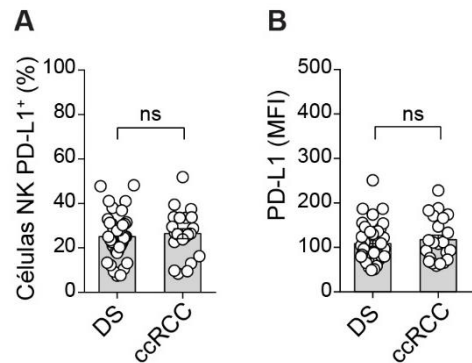
Resultados previos de nuestro laboratorio demuestran que en modelos de ratones portadores de tumor la presencia de células NK que expresan altos niveles de PD-L1 puede tener un rol inhibitorio sobre la respuesta inmune antitumoral. (136). Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos investigar si las células NK de pacientes con ccRCC también presentan un aumento en la expresión de PD-L1. Para ello, en primer lugar, analizamos la frecuencia de TINK dentro de los leucocitos (células CD45<sup>+</sup>) en muestras frescas de tumor de pacientes con ccRCC mediante citometría de flujo y observamos que dichos tumores se encuentran infiltrados por células NK, con frecuencias que oscilan entre el 3,46 % y el 44,19 %. (**Figura 8**).



**Figura 8: Infiltrado de células NK en pacientes con ccRCC.** Frecuencia de células NK infiltrantes de tumor (TINK) en pacientes con ccRCC (n=17).

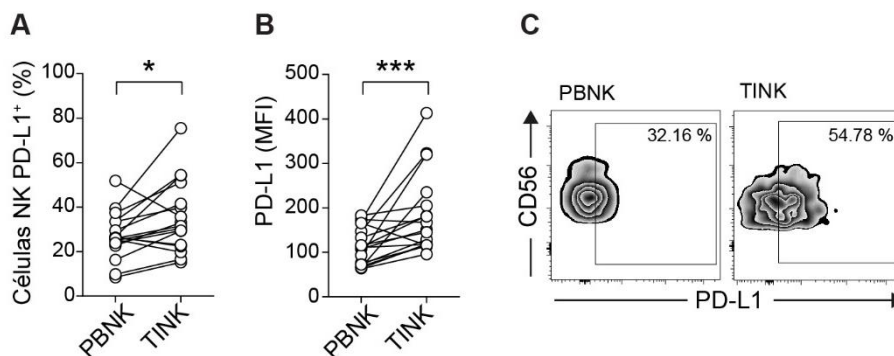
A continuación, evaluamos la expresión de PD-L1 en PBNK de los pacientes con ccRCC y de DS y observamos que la frecuencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> y la intensidad de expresión de PD-L1 fue similar en ambos grupos (**Figura 9A y B**).





**Figura 9: Análisis de PBNK de DS y pacientes con ccRCC.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> (A) e Intensidad de fluorescencia media (MFI) de PD-L1 (B) en PBNK de DS (n=41) y de pacientes con ccRCC (n=22), evaluado por citometría de flujo. Se realizó el test estadístico *t* de Student (A y B no pareado). ns: no significativo.

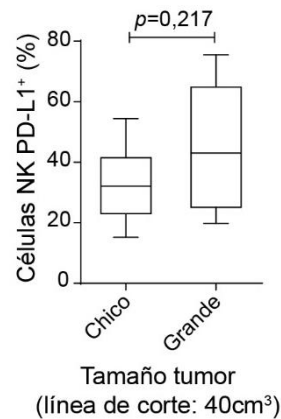
Sin embargo, cuando evaluamos la expresión de PD-L1 en las TINK observamos un aumento significativo en la frecuencia de células NK que expresan PD-L1 y en la intensidad de expresión de PD-L1 en comparación con las PBNK de los mismos pacientes (Figura 10A, B y C).



**Figura 10: Análisis de PBNK y TINK de pacientes con ccRCC.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> (A) e Intensidad de fluorescencia media (MFI) de PD-L1 (B), en PBNK y TINK pareados de pacientes con ccRCC, evaluado por citometría de flujo (n=17). (C) Zebra plots representativos de CD56 vs PD-L1 en PBNK y TINK de un paciente con ccRCC. Se realizó el test estadístico *t* de Student (A y B pareado). \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Además, observamos una tendencia a una mayor acumulación de células NK que expresan PD-L1 en los tumores de mayor tamaño (Figura 11). En conjunto, estos resultados sugieren que las células NK cambian su fenotipo y comienzan a expresar PD-

L1 en el microambiente tumoral, pero no en la periferia, y que la presencia de esta población podría estar asociada con un mayor tamaño tumoral.

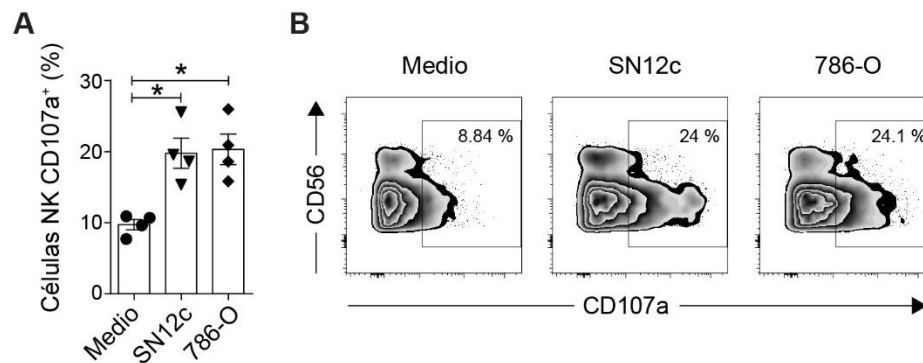


**Figura 11: Tamaño tumoral y expresión de PD-L1 en TINK.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> en TINK de pacientes con ccRCC agrupados según tamaño tumoral (chico < 40cm<sup>3</sup>, grande > 40cm<sup>3</sup>) evaluado por citometría de flujo (n=5-11). Se realizó el test estadístico t de Student (no pareado), p=0,217.

Los tumores de pacientes con ccRCC exhiben una acumulación de células NK que expresan altos niveles de PD-L1.

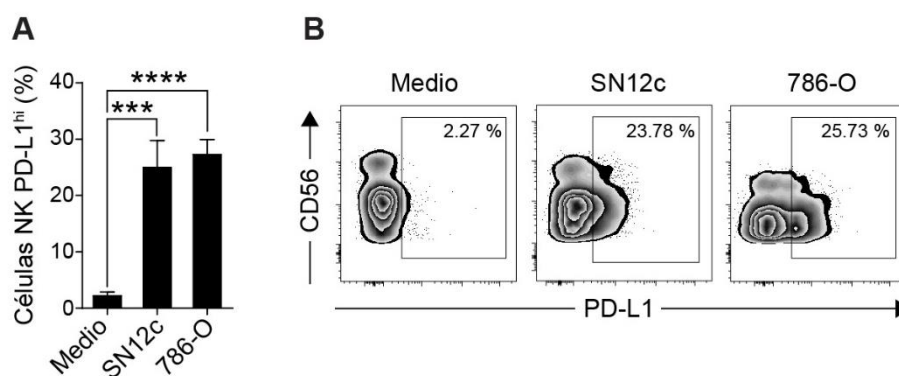
### 3. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1 EN CÉLULAS NK *IN VITRO*

A continuación, con la finalidad de estudiar en detalle los mecanismos que gobiernan la aparición de células NK que expresan PD-L1 frente al reconocimiento tumoral, nos propusimos generar un sistema *in vitro* que nos permita inducir la expresión de PD-L1 en PBNK de DS. En primera instancia evaluamos si las células NK pueden reconocer y activarse frente a distintas líneas celulares de RCC, para ello realizamos cultivos de PBMC de DS con las líneas celulares de RCC SN12c y 786-O y luego de 5 hs evaluamos por citometría de flujo la expresión de CD107a en las células NK. Observamos que las células NK son capaces de degranular contra ambas líneas de RCC (**Figura 12A y B**).



**Figura 12: Capacidad de reconocimiento de líneas de RCC. (A)** Frecuencia de células NK CD107a<sup>+</sup> luego de 5 hs de cultivo de PBMC de DS con las líneas de RCC SN12c y 786-O, evaluado por citometría de flujo (n=4). **(B)** Zebra plots representativos de los datos mostrados en A. Los datos en A corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett. \*p<0,05.

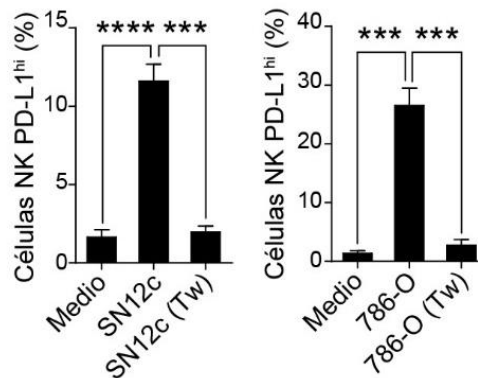
Luego, con el fin de evaluar la capacidad de las líneas de RCC de inducir PD-L1 en las células NK repetimos los co-cultivos de PBMC de DS con las líneas celulares SN12c y 786-O y luego de 48 hs evaluamos la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo. Observamos que ambas líneas celulares fueron capaces de inducir una elevada expresión de PD-L1 en las células NK (**Figuras 13A, B**).



**Figura 13: Capacidad de inducción de PD-L1 con líneas de RCC. (A)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC de DS en ausencia (Medio) o presencia de las líneas de RCC SN12c y 786-O, evaluado por citometría de flujo (n=12). **(B)** Zebra plots representativos de los datos mostrados en A. Los datos en A corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett. \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

A su vez, el contacto celular con las células tumorales fue esencial para la inducción de la expresión de PD-L1, ya que la separación de los PBMC de las células

tumorales mediante el uso de *transwells* impidió la inducción de PD-L1 (**Figura 14**). Por lo tanto, la interacción directa con las células tumorales de RCC promueve la expresión de PD-L1 en las células NK, que se asemejan a las células NK detectadas en el microambiente tumoral.



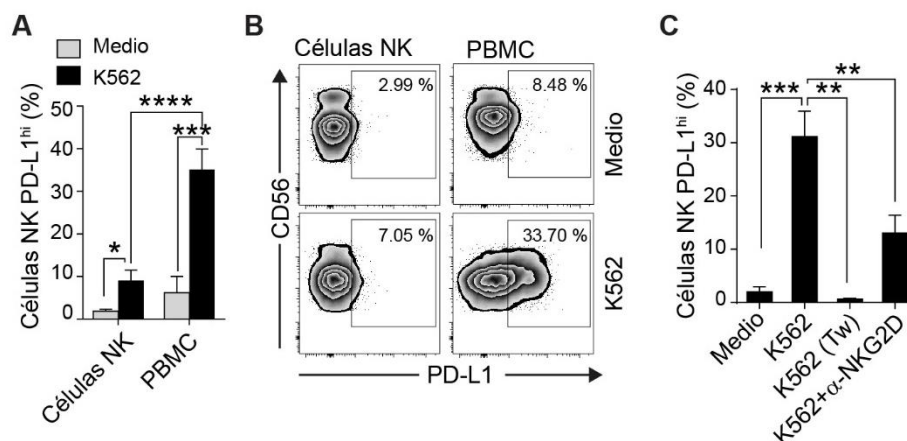
**Figura 14: Rol del contacto directo con líneas de RCC.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC de DS en ausencia (Medio) o presencia de las líneas de RCC SN12c (izquierda) y 786-O (derecha) en contacto directo o separadas por *transwells* (Tw), evaluada por citometría de flujo (n=7). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

La expresión de PD-L1 en las células NK puede inducirse mediante la interacción directa con las células tumorales de RCC.

A diferencia de las líneas celulares utilizadas ampliamente para el estudio de las células NK (como la línea celular K562), estas líneas de RCC expresan niveles normales de moléculas de HLA de clase I, lo que genera una mayor variabilidad en la respuesta de distintos donantes. Este fenómeno se debe a principalmente a diferencias en los haplotipos de receptores KIR expresados por dichos donantes y su capacidad diferencial de reconocer a las moléculas de HLA expresadas por las líneas celulares. Con el fin de minimizar esta dispersión, y teniendo en cuenta resultados previos de mi Tesis de Licenciatura, decidimos utilizar principalmente la línea celular K562 para estudiar en detalle los mecanismos involucrados en la inducción de la expresión de PD-L1 en células

NK *in vitro*, y utilizar las líneas de RCC SN12c y 786-O para corroborar los hallazgos más relevantes.

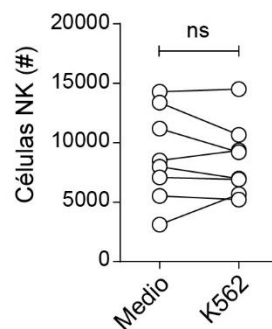
Previamente demostramos que en cultivos de células NK o PBMC de DS con la línea celular K562, estas células tumorales son capaces de inducir la expresión de PD-L1 en las células NK, y que dicha expresión es aún mayor en las células NK en presencia de otras células que forman parte de los PBMC (**Figura 15A, B**). A su vez, demostramos que es necesario el contacto entre las células NK y las células K562 para inducir la expresión de PD-L1, ya que la utilización de *transwells* impidió la inducción de PD-L1 (**Figura 15C**). Además, teniendo en cuenta la relevancia del receptor NKG2D en el reconocimiento de células tumorales y sabiendo que las células K562 expresan NKG2DL (224), utilizamos un AcMo bloqueante contra dicho receptor, y observamos que la expresión de PD-L1 en las células NK se debe parcialmente al reconocimiento de las células tumorales a través del receptor NKG2D (**Figura 15C**).



**Figura 15: Participación de otras células y rol del contacto directo con células K562.** (A) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de células NK aisladas o PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células K562, evaluado por citometría de flujo (n=7-11). (B) *Zebra plots* representativos de los datos mostrados en A. (C) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células K562, en contacto o separadas por un Tw, o en presencia de un AcMo bloqueante anti-NKG2D, evaluado por citometría de flujo (n=4). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc de Sidak (A), y ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett (C). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. *Estos resultados forman parte de mi tesis de Licenciatura.*

Por otra parte, con el fin de discernir si el aumento observado en la frecuencia de células NK que expresan PD-L1 era debido a una inducción en la expresión de PD-L1

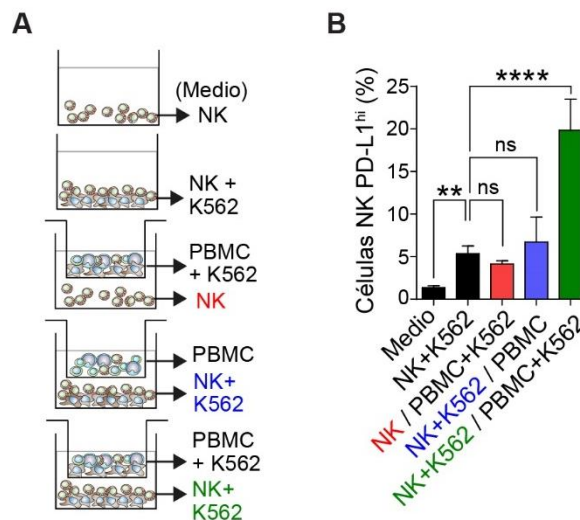
en células NK que eran previamente negativas o a una proliferación preferencial de las células NK que expresan basalmente esta molécula, evaluamos el número de células NK presentes en los cultivos de PBMC en ausencia o presencia de células K562 luego de 48 hs. Observamos que el número de células NK se mantuvo estable y no mostró diferencias significativas entre ambos cultivos (**Figura 16**). Resultados similares fueron obtenidos utilizando las líneas de RCC (*no mostrado*). Esto sugiere que en los cultivos con células K562 no se produce una proliferación de las células NK y, por lo tanto, el aumento en la frecuencia de células NK que expresan PD-L1 se debe al aumento de la expresión de PD-L1 en las células NK y no a una proliferación diferencial.



**Figura 16: Número de células NK presentes en cultivo.** Número de células NK en cultivos de PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células K562 luego de 48 hs, evaluado por citometría de flujo (n=8). Se realizó el test estadístico *t* de Student, pareado. ns: no significativo.

Posteriormente, con el fin de evaluar la participación diferencial de factores solubles y del contacto celular en la inducción de PD-L1, realizamos cultivos de células NK solas o células NK en contacto con células K562 (compartimiento inferior) separadas por *transwells* de PBMC o células K562 y PBMC (compartimiento superior), tal como se representa en el esquema de la **Figura 17A**. Luego de 48 hs evaluamos la expresión de PD-L1 en las células NK del compartimiento inferior. Observamos que las células NK que únicamente recibieron la estimulación de factores solubles derivados de PBMC y células K562 no mostraron un aumento en la expresión de PD-L1 (**Figura 17B**, barra roja), mientras que las células NK que experimentaron el contacto directo con las células K562 y recibieron los factores solubles derivados de PBMC mostraron un ligero aumento en la expresión de esta molécula (**Figura 17B**, barra azul). Sin embargo, la mayor expresión

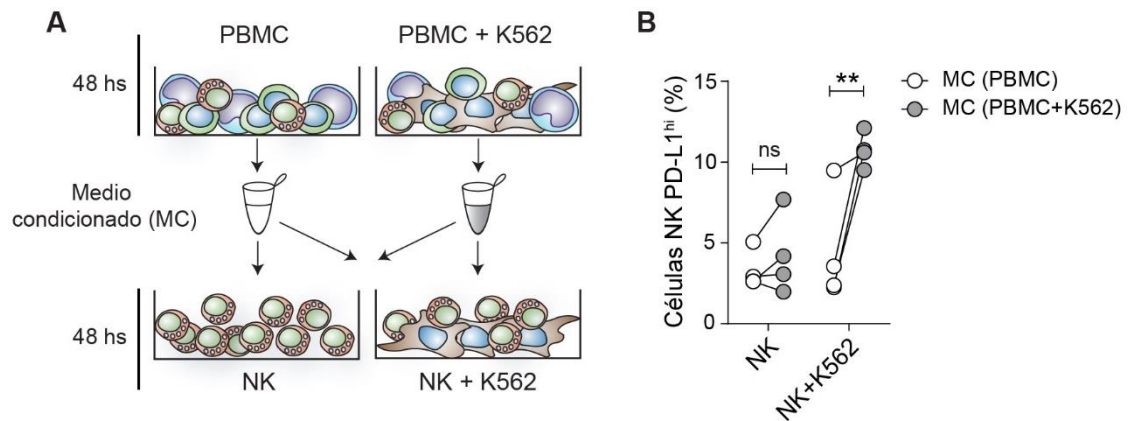
de PD-L1 se observó en las células NK que experimentaron el contacto directo con las células K562 y recibieron a su vez los factores solubles derivados de PBMC en contacto con células K562 (**Figura 17B**, barra verde).



**Figura 17: Requerimientos para la expresión de PD-L1. (A)** Diseño experimental utilizado para evaluar los requerimientos para la inducción de PD-L1 en las células NK. Se cultivaron células NK aisladas, PBMC y células K562 separadas por Tw como se indica en la figura. **(B)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de células NK aisladas en ausencia (Medio) o presencia de células K562 o PBMC en contacto o separadas por un Tw, siguiendo el esquema de (A), evaluado por citometría de flujo en las células NK presentes en el compartimiento inferior (n=3). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey. ns: no significativo, \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

Estos resultados fueron confirmados utilizando MC libres de células obtenidos recolectando sobrenadantes de cultivos de PBMC en ausencia o presencia de células K562 que fueron luego utilizados para estimular células NK en ausencia o presencia de células K562 (**Figura 18A**). Luego de 48 hs observamos que en los cultivos de células NK con células K562 estimuladas con el MC proveniente de PBMC con K562 (**Figura 18B**, círculos grises) se produjo un aumento en la expresión de PD-L1 comparado con el mismo cultivo estimulado con el MC proveniente de PBMC solos (**Figura 18B**, círculos blancos), mientras que en los cultivos de células NK en ausencia de células tumorales no se indujo la expresión de PD-L1 independientemente del MC utilizado para estimularlas. En conjunto, demostramos que el contacto entre las células NK y las células tumorales

en cooperación con factores solubles derivados de PBMC que estuvieron en contacto con células K562 induce fuertemente la expresión de PD-L1 en las células NK.



**Figura 18: Estímulo con medios condicionados. (A)** Diseño experimental utilizado para generar los medios condicionados (MC) y posteriores cultivos. Se cultivaron PBMC en ausencia o presencia de células K562, luego de 48 hs se recolectaron los sobrenadantes y los MC obtenidos se utilizaron para estimular células NK en ausencia o presencia de células K562 durante 48 hs. **(B)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de células NK en ausencia o presencia de células K562 estimuladas con MC de PBMC (círculos blancos) o PBMC con células K562 (círculos grises), evaluado por citometría de flujo (n=4). Se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc de Sidak. ns: no significativo, \*\*p<0,01.

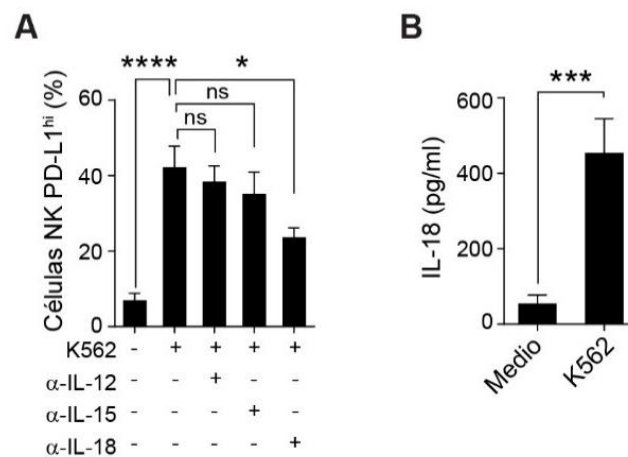
El reconocimiento tumoral a través del receptor NKG2D y los factores solubles derivados de PBMC que reconocieron células tumorales inducen la expresión de PD-L1 en las células NK.

#### 4. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES SOLUBLES INVOLUCRADOS EN LA EXPRESIÓN DE PD-L1

A raíz de los resultados obtenidos buscamos identificar el o los factores solubles involucrados en la inducción de la expresión de PD-L1. Teniendo en cuenta que las citoquinas IL-12, IL-15 e IL-18, producidas por células mieloides, pueden actuar como un potente estímulo para activar a las células NK (23), decidimos analizar su posible participación en la inducción de PD-L1 en estas células. Para ello realizamos cultivos de



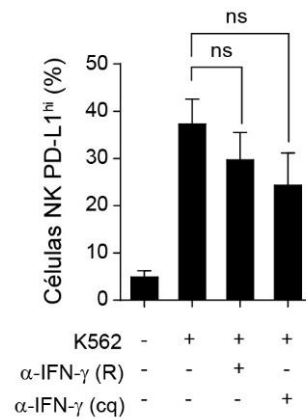
PBMC con células K562 en presencia de AcMo neutralizantes de cada una de estas citoquinas, y observamos que la neutralización de IL-18, pero no de IL-12 o IL-15, inhibió significativamente el aumento en la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 19A**). Además, comprobamos que el agregado de células K562 a cultivos de PBMC induce la secreción de IL-18 en dichos cultivos (**Figura 19B**). La presencia de IL-18 en esos cultivos no se debe a una producción por parte de las células K562, ya que confirmamos que estas células no producen dicha citoquina (no mostrado). Estos resultados demuestran la participación de IL-18 en la inducción de PD-L1 en las células NK.



**Figura 19: Factores solubles involucrados en la expresión de PD-L1.** (A) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia (Medio) o en presencia de células K562 y AcMo neutralizantes de distintas citoquinas, evaluada por citometría de flujo (n=5). (B) Concentración de IL-18 en los sobrenadantes de cultivos de PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células K562, medido mediante ELISA (n=13). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett (A), y el test estadístico t de Student (B). ns: no significativo, \*p<0,05; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001. *Estos resultados forman parte de mi tesis de Licenciatura.*

Teniendo en cuenta que IL-18 aumenta la producción de IFN- $\gamma$  en las células NK y que esta citoquina es un potente estímulo para la expresión de PD-L1 en otros tipos celulares, nos preguntamos si el efecto de IL-18 sobre la expresión de PD-L1 es indirecto, y está mediado por IFN- $\gamma$ . Para responder este interrogante cultivamos PBMC con células K562 en ausencia o presencia de un AcMo bloqueante del receptor de IFN- $\gamma$  o de un AcMo neutralizante de dicha citoquina. Al evaluar la expresión de PD-L1 en las células NK luego de 48 hs no observamos diferencias significativas en su expresión en ausencia

o presencia de los AcMo, demostrando que la inducción de PD-L1 en las células NK no involucra la participación de IFN- $\gamma$  (**Figura 20**).

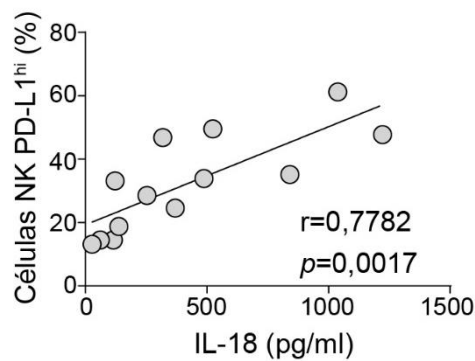


**Figura 20: Rol de IFN- $\gamma$  en la expresión de PD-L1.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia o en presencia de células K562 y en ausencia o presencia de AcMo bloqueante del receptor de IFN- $\gamma$  ( $\alpha$ -IFN- $\gamma$ (R)) o AcMo neutralizante de IFN- $\gamma$  ( $\alpha$ -IFN- $\gamma$ (cq)), evaluada por citometría de flujo (n=9). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett. ns: no significativo. *Estos resultados forman parte de mi tesis de Licenciatura.*

La citoquina IL-18 producida durante la estimulación tumoral de PBMC contribuye al aumento en la expresión de PD-L1 en células NK.

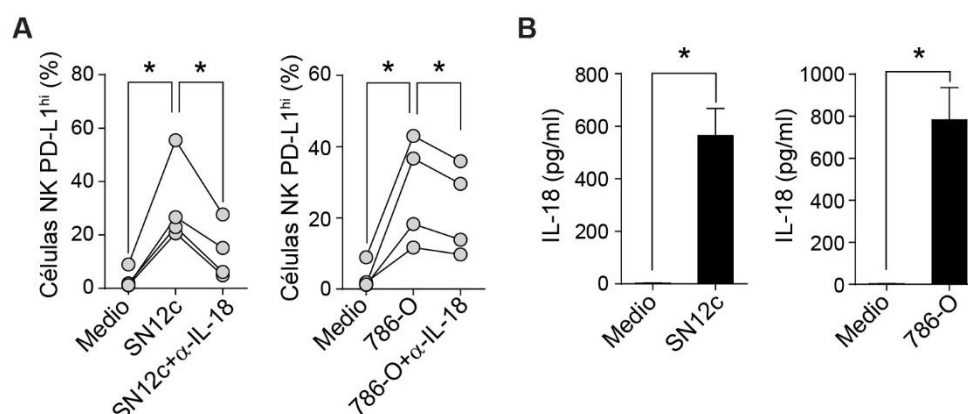
## 5. ROL DE IL-18

Demostramos que la citoquina IL-18 se produce durante la estimulación de PBMC con células tumorales y contribuye al aumento de la expresión de PD-L1 en las células NK, en concordancia con estos resultados, observamos una correlación positiva entre la concentración de IL-18 en los sobrenadantes de PBMC estimulados con células K562 y la frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> de dichos cultivos (**Figura 21**).



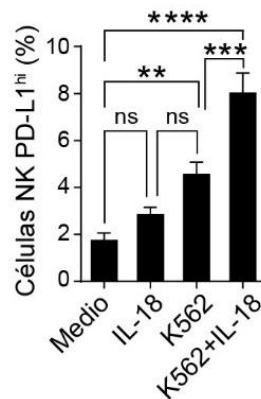
**Figura 21: Correlación entre los niveles de IL-18 y la expresión de PD-L1 en las células NK.** Correlación entre la concentración de IL-18 detectada en los sobrenadantes de cultivos de PBMC estimulados con células K562, medida mediante ELISA, y la frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup>, evaluada por citometría de flujo (n=13). Se realizó coeficiente de correlación de Pearson (r), el valor de p se muestra en la parte inferior derecha.

A continuación, con el fin de evaluar si IL-18 está involucrada en el mecanismo de inducción de PD-L1 también con las líneas de RCC, repetimos los cultivos de PBMC con las líneas SN12c y 786-O en presencia de un AcMo neutralizante de IL-18. Observamos que en ambos casos la neutralización de IL-18 inhibió significativamente el aumento de la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 22A**). Consistentemente, corroboramos que los PBMC en reposo no producen IL-18, pero cuando son cultivados en presencia de las líneas de RCC es posible detectar IL-18 en los sobrenadantes de cultivo, evaluados por ELISA (**Figura 22B**). Estos resultados demuestran que IL-18 participa también en la inducción de la expresión de PD-L1 en células NK por líneas tumorales de RCC.



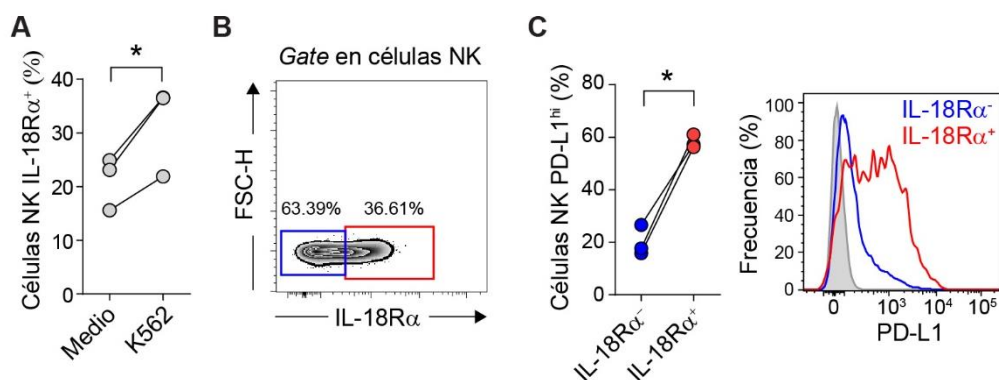
**Figura 22: Participación de IL-18 en la expresión de PD-L1 con líneas de RCC. (A)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia (Medio) o en presencia de las líneas de RCC SN12c (izquierda) y 786-O (derecha) y en ausencia o presencia de un AcMo neutralizante anti-IL-18, evaluada por citometría de flujo (n=4). **(B)** Concentración de IL-18 en los sobrenadantes de cultivos de PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células SN12c (izquierda, n=4) o células 786-O (derecha, n=4), medido mediante ELISA. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett **(A)**, y el test estadístico *t* de Student **(B)**. \**p*<0,05.

Adicionalmente, buscando evaluar si la participación de IL-18 en la expresión de PD-L1 se debía a un efecto directo sobre las células NK, estimulamos células NK aisladas en ausencia o presencia de IL-18 recombinante, en ausencia o presencia de células K562 o en presencia de ambas. Observamos que mientras que el estímulo con IL-18 no indujo por sí mismo un aumento en la expresión de PD-L1 en las células NK, el estímulo con las células tumorales fue suficiente para inducir un aumento significativo en dicha expresión, sin embargo, las células NK alcanzaron una mayor expresión de PD-L1 cuando recibieron el estímulo tumoral junto con el estímulo de IL-18 (**Figura 23**). Estos resultados nos indican que la expresión de PD-L1 en las células NK requiere como primera señal el reconocimiento tumoral, y que la IL-18 es capaz de potenciar la expresión de esta molécula, actuando como segunda señal.



**Figura 23: Efecto de IL-18 sobre células NK aisladas.** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de células NK aisladas en ausencia (Medio) o en presencia de IL-18 recombinante, células K562 o ambas (K562+IL-18), evaluada por citometría de flujo (n=10). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey. ns: no significativo, \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

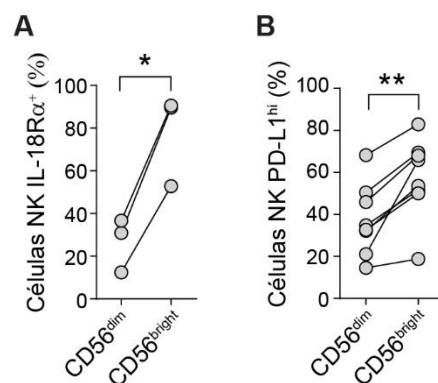
A continuación, analizamos la expresión de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-18 (IL-18R $\alpha$ ) y observamos que la presencia de células tumorales induce un aumento de IL-18R $\alpha$  en las células NK (**Figura 24A**), y que dicha expresión es heterogénea (**Figura 24B**). En línea con estos resultados, observamos una mayor frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en las células que expresan IL-18R $\alpha$  comparado con las células NK que no lo expresan (**Figura 24C**). Estos resultados confirman que el efecto de IL-18 en la inducción de la expresión de PD-L1, es directo sobre las células NK.



**Figura 24: Expresión de PD-L1 en función de la expresión del receptor de IL-18.** (A) Frecuencia de células NK IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia (Medio) o presencia de células K562, evaluada por citometría de flujo (n=3). (B) *Zebra plot* representativo de la expresión del receptor de IL-18 (IL-18R $\alpha$ ), para determinar las poblaciones IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> e IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup>. (C) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> detectada en las células NK IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> (rojo) y células NK IL-18R $\alpha$ <sup>-</sup> (azul) luego de 48 hs de cultivo de PBMC con células K562, evaluada por citometría de flujo (n=3). Se muestra un histograma representativo. Se realizó el test estadístico *t* de Student. \*p<0,05.

A su vez, analizamos la expresión diferencial de IL-18R $\alpha$  y de PD-L1 en las dos subpoblaciones de células NK. Para ello, estimulamos PBMC con células K562 y luego evaluamos la expresión de IL-18R $\alpha$  en las células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup>. En consistencia con la literatura (8), observamos una mayor frecuencia de células IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> dentro de las células NK CD56<sup>bright</sup> (**Figura 25A**). En concordancia, también se observó una mayor frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> dentro de las células NK CD56<sup>bright</sup> (**Figura 25B**). Estos resultados sugieren que PD-L1 se expresa preferentemente en células NK sensibles a IL-18.

En conjunto, estos resultados identifican a IL-18 como una citoquina crítica que contribuye al aumento de la expresión de PD-L1 en las células NK estimuladas con células tumorales.

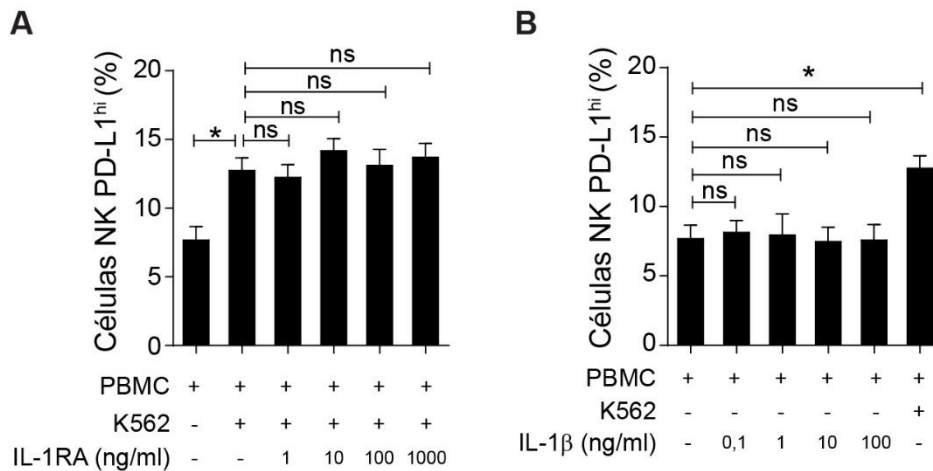


**Figura 25: Expresión de IL-18R $\alpha$  y PD-L1 en función de la expresión de CD56. (A)** Frecuencia de células NK IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup> en las células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en presencia de células K562, evaluada por citometría de flujo (n=3). **(B)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en las células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en presencia de células K562, evaluada por citometría de flujo (n=8). Se realizó el test estadístico *t* de Student **(A, B y C)**. \**p*<0,05; \*\**p*<0,01.

La citoquina IL-18 potencia la expresión de PD-L1 en células NK en contacto con células tumorales. En concordancia, dicha molécula se expresa preferentemente en células NK sensibles a IL-18.

## 6. ROL DE IL-1 $\beta$

Demostramos que en cultivos de PBMC con líneas celulares se produce IL-18 y que esta citoquina resulta clave para incrementar la expresión de PD-L1 en las células NK. Teniendo en cuenta que el clivaje de pro-IL-18 para dar su forma activa se produce por acción de caspasa-1, que también es responsable del clivaje de pro-IL-1 $\beta$  para generar su forma activa (58,59), quisimos evaluar si IL-1 $\beta$  también participa en la modulación de la expresión de PD-L1. Con este objetivo realizamos cultivos de PBMC con células K562 en ausencia o presencia de diferentes dosis de un antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  (IL-1RA) con el fin de bloquear la posible señalización intracelular a través del receptor de IL-1, sin embargo, observamos que la expresión de PD-L1 en las células NK no se vio modificada (**Figura 26A**). Adicionalmente, estimulamos PBMC con dosis crecientes de IL-1 $\beta$  recombinante y tampoco observamos diferencias significativas en la expresión de PD-L1 (**Figura 26B**). Podemos concluir que IL-1 $\beta$  no es capaz de modular la expresión de PD-L1 en las células NK.



**Figura 26: Efecto de IL-1 $\beta$  en la inducción de PD-L1.** (A) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia o presencia de células K562 y en ausencia o presencia de dosis crecientes de un antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA), evaluada por citometría de flujo (n=4). (B) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de estímulo de PBMC con dosis crecientes de IL-1 $\beta$  recombinante en ausencia o presencia de células K562, evaluada por citometría de flujo (n=4). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett (A, B). ns: no significativo, \*p<0,05.

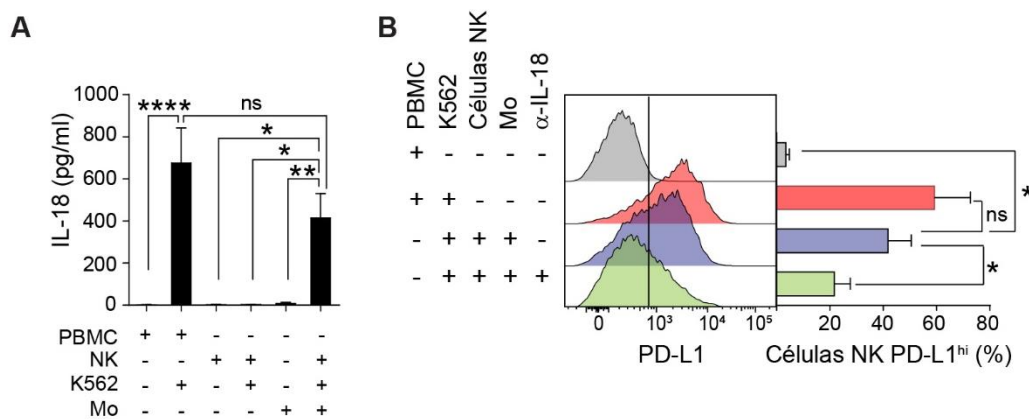
La citoquina IL-1 $\beta$  no modula la expresión de PD-L1 en las células NK.

## 7. ROL DE LOS MONOCITOS

A continuación, nos propusimos identificar la población celular responsable de la producción de IL-18 en los cultivos de PBMC con células tumorales. Teniendo en cuenta que IL-18 es principalmente producida por células mieloides, decidimos investigar si los Mo presentes en los PBMC son capaces de producir IL-18 cuando son cultivados en presencia de células tumorales y células NK. Para ello aislamos células CD14<sup>+</sup> (Mo) y las cultivamos en ausencia o en presencia de células NK autólogas y células K562, luego de 48 hs recolectamos el sobrenadante de estos cultivos y evaluamos la concentración de IL-18 mediante ELISA. A modo de control también recolectamos el sobrenadante de cultivos de células NK aisladas o PBMC en ausencia o en presencia de células K562. Pudimos detectar la presencia de IL-18 en los cultivos de Mo con células



K562 y células NK, y a su vez, hallamos que los niveles de esta citoquina en los sobrenadantes de dichos cultivos no diferían de los hallados en los cultivos de PBMC con células K562 (**Figura 27A**). A continuación, decidimos analizar si la IL-18 producida por los Mo era responsable de la regulación de la expresión de PD-L1 en las células NK. Para esto realizamos cultivos de células NK en presencia de Mo autólogos y células K562 y observamos un aumento significativo en la frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup>, similar a la frecuencia alcanzada en los cultivos de PBMC con células K562 (**Figura 27B**), y la neutralización de IL-18 en esos cultivos inhibió el aumento en la expresión de PD-L1 (**Figura 27B**). Estos resultados nos permiten demostrar que los Mo colaboran en la inducción de la expresión de PD-L1 en las células NK en contacto con células tumorales, a través de la producción de IL-18.

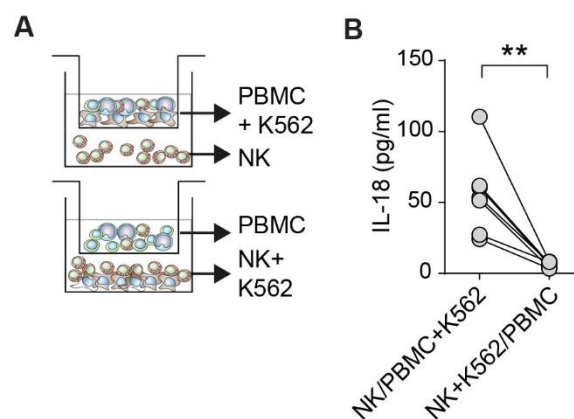


**Figura 27: Rol de los Mo en la expresión de PD-L1. (A)** Concentración de IL-18 en los sobrenadantes luego de 48 hs de cultivo de células NK o PBMC (como control) en ausencia o presencia de células K562 y de cultivos de Mo en ausencia o presencia de células K562 y células NK, medido mediante ELISA (n=4). **(B)** Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia o presencia de células K562, y de células NK en presencia de células K562 y Mo autólogos, y en ausencia o presencia de un AcMo neutralizante anti-IL-18, evaluada por citometría de flujo (n=4). Se muestra un histograma representativo para cada condición de cultivo. Los datos corresponden a la media ± SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett **(A, B)**. ns: no significativo, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*\*p<0,0001.

La IL-18 producida por monocitos estimula la expresión de PD-L1 en células NK en contacto con células tumorales.

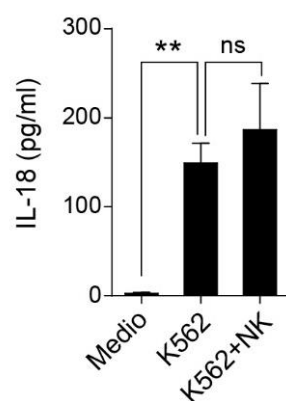
## 8. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA INDUCCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-18 Y DE LA EXPRESIÓN DE PD-L1

A partir de los resultados obtenidos hasta el momento, que demuestran la participación de IL-18 secretada por Mo en la inducción de PD-L1 en las células NK, comenzamos a estudiar los posibles mecanismos que estimulan la producción de esta citoquina. Para ello, en primer lugar, decidimos evaluar si la producción de IL-18 depende del contacto con las células tumorales o de factores solubles liberados como resultado de la interacción de células NK con células K562. Para ello comparamos los niveles de IL-18 producida en cultivos de PBMC con células K562 separados de células NK por un dispositivo de *transwell*, o PBMC solos separados por un *transwell* de células NK y células K562, como muestra el esquema de la **Figura 28A**. Luego de 48hs recolectamos los sobrenadantes y medimos la concentración de IL-18 por ELISA. Observamos que en los cultivos donde los PBMC no estaban en contacto con las células K562 no se produjo IL-18 (**Figura 28B**), lo que nos sugiere que la producción de esta citoquina por parte de los Mo presentes en los PBMC requiere del contacto directo con las células tumorales.



**Figura 28: Requerimientos para la producción de IL-18. (A)** Diseño experimental utilizado para evaluar el efecto del contacto directo con células tumorales en la producción de IL-18. Se cultivaron células NK aisladas, PBMC y células K562 separadas por Tw como se indica en la figura. **(B)** Concentración de IL-18 en los sobrenadantes luego de 48 hs de cultivo de células NK aisladas separadas por un Tw de PBMC estimuladas con células K562, y de células NK aisladas en presencia de células K562 separadas por un Tw de PBMC, siguiendo el esquema de (A), medido mediante ELISA (n=7). Se realizó el test estadístico *t* de Student. \*\* $p < 0,01$ .

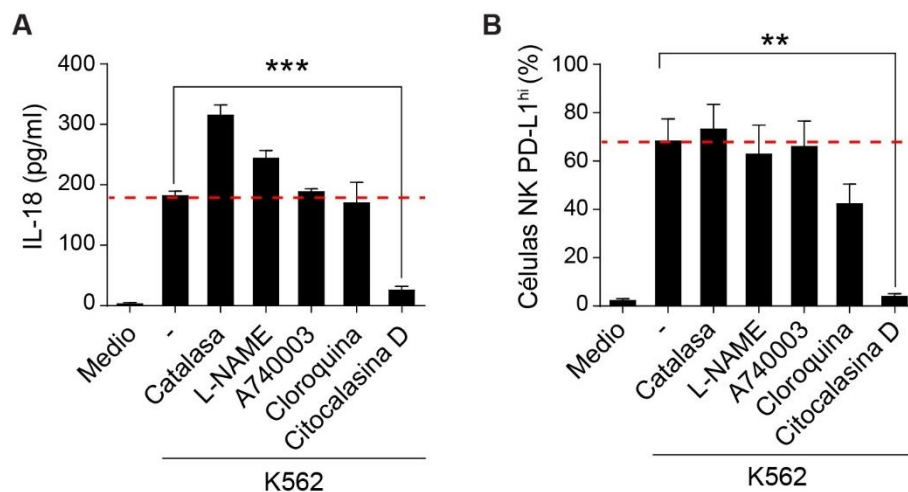
A fin de corroborar estos resultados realizamos cultivos de Mo en ausencia o presencia de células K562 y en ausencia o presencia de células NK, luego de 48 hs recolectamos los sobrenadantes de dichos cultivos y evaluamos la producción de IL-18 por ELISA. Observamos que el cultivo de Mo con células K562 fue suficiente para inducir la producción de IL-18, mientras que el agregado de células NK a los cultivos no indujo una mayor producción de esta citoquina (**Figura 29**). Por lo tanto, demostramos que la producción de IL-18 por parte de los Mo requiere del contacto directo con las células tumorales y no involucra a otras poblaciones celulares.



**Figura 29: Producción de IL-18 y contacto directo con células tumorales.** Concentración de IL-18 en los sobrenadantes luego de 48 hs de cultivo de Mo aislados en ausencia (Medio) o presencia de células K562 y en ausencia o presencia de células NK aisladas, medido mediante ELISA (n=5). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett. ns: no significativo, \*\*p<0,01.

Entre los mecanismos responsables de las funciones efectoras de los Mo se destacan la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno, su capacidad fagocítica, la activación de enzimas lisosomales y la activación de inflammasomas. A continuación, nos propusimos ahondar en los mecanismos involucrados en la inducción de la producción de IL-18 luego del reconocimiento de las células tumorales. Para ello cultivamos PBMC con células K562 en presencia de drogas que bloquean diferentes procesos intracelulares en los Mo, y luego de 48 hs evaluamos la presencia de IL-18 en los sobrenadantes de dichos cultivos por ELISA y la expresión de PD-L1 en las células NK por citometría de flujo. Utilizamos catalasa para eliminar ROS, L-

NAME como inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (NOS), un antagonista del receptor de ATP P2X7 (A740003), cloroquina para inhibir el proceso de autofagia y citocalasina D para inhibir la fagocitosis. Pudimos observar que únicamente la inhibición de la fagocitosis restringió la producción de IL-18 en los cultivos (**Figura 30A**) y a su vez restringió la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 30B**). Estos resultados sugieren que la fagocitosis se encuentra involucrada en la producción de IL-18 y en la expresión de PD-L1 en las células NK. Por otra parte, observamos también que la inhibición del proceso de autofagia restringió ligeramente la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 30B**), pero no así la producción de IL-18 (**Figura 30A**), lo que nos sugiere que pueden existir otros mecanismos de inducción de esta molécula inhibitoria independientes del circuito que involucra IL-18.

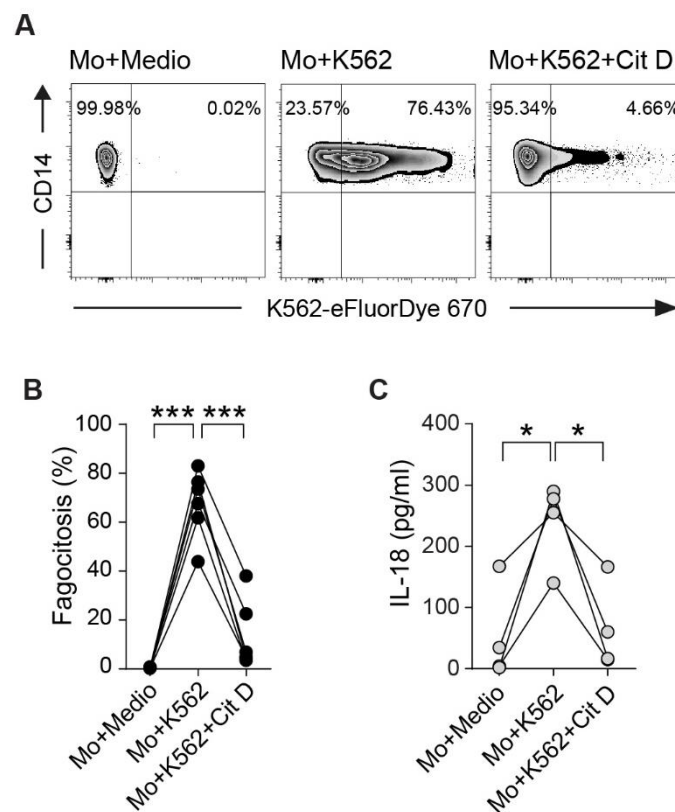


**Figura 30: Mecanismos involucrados en la inducción de la producción de IL-18 y de la expresión de PD-L1.** (A) Concentración de IL-18 en los sobrenadantes luego de 48 hs de cultivo de PBMC en ausencia o presencia de células K562, y en ausencia o presencia de catalasa, L-NAME, A740003, cloroquina y citocalasina D, medido mediante ELISA (n=3). (B) Frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en los mismos cultivos de (A), evaluada por citometría de flujo (n=4). Las líneas rojas punteadas indican los niveles de IL-18 y la expresión de PD-L1 en los cultivos en ausencia de los inhibidores. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett (A, B). \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

La inhibición de la fagocitosis en cultivos con células tumorales afecta la producción de IL-18 y restringe la expresión de PD-L1 en las células NK.

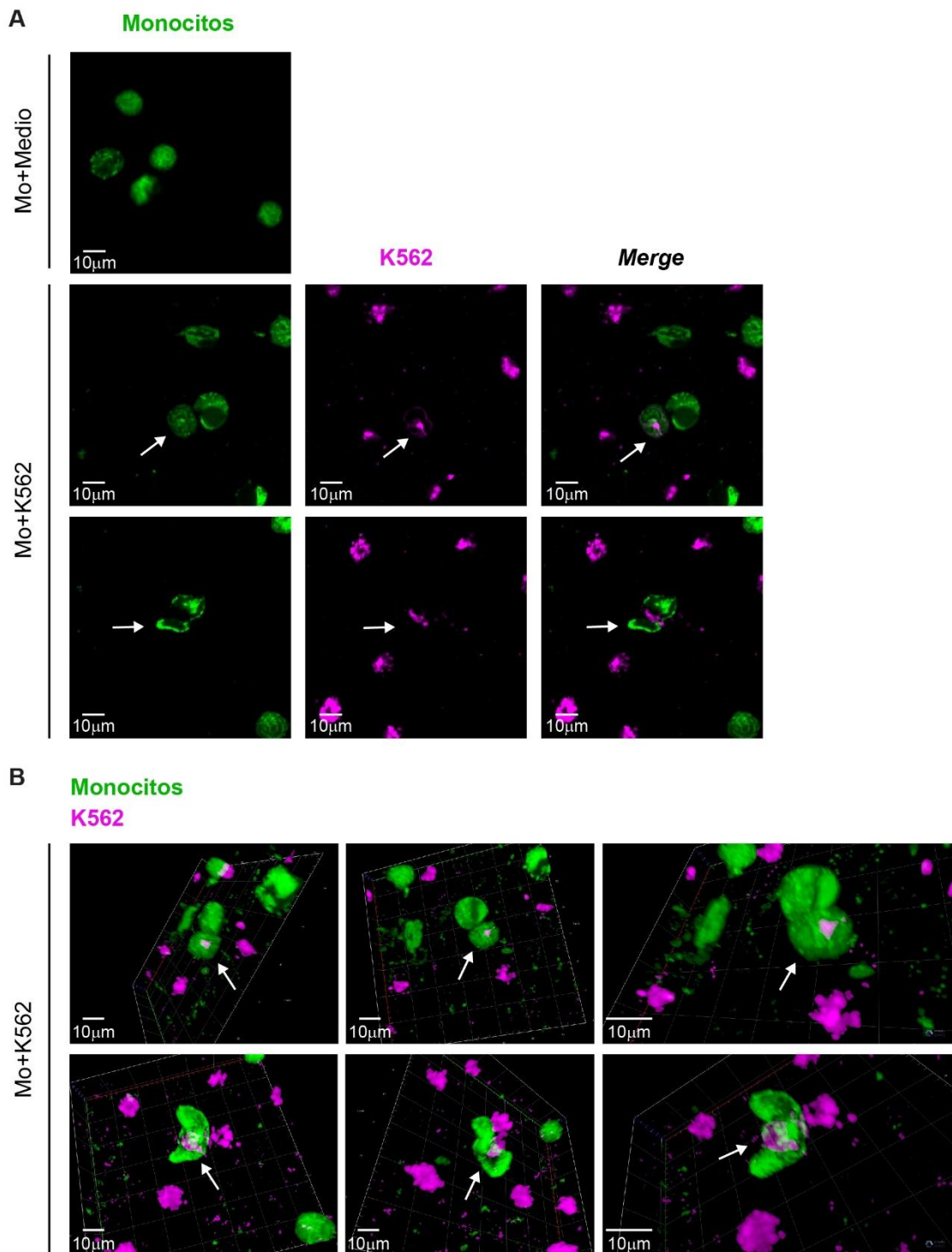
## 9. ROL DE LA FAGOCITOSIS

A continuación, decidimos evaluar si efectivamente los Mo eran capaces de fagocitar a las células tumorales. Para ello, cultivamos durante 30 min Mo en ausencia o presencia de células K562 previamente marcadas fluorescentemente con eFluorDye 670. Evaluamos el porcentaje de fagocitosis como el porcentaje de Mo (células CD14<sup>+</sup>) que eran positivas para eFluorDye 670 por citometría de flujo (**Figura 31A**). Los Mo mostraron una alta capacidad fagocítica, que fue inhibida al ser previamente tratados con citocalasina D (**Figura 31B**). Adicionalmente, repetimos estos cultivos y luego de 48hs evaluamos la concentración de IL-18 en los sobrenadantes por ELISA. Nuevamente observamos que en presencia de células tumorales se induce la secreción de IL-18 por los Mo, pero este efecto se pierde al inhibir la fagocitosis con citocalasina D (**Figura 31C**). Estos resultados nos sugieren que la fagocitosis de las células tumorales induce la producción y secreción de IL-18 por Mo.



**Figura 31: Fagocitosis y producción de IL-18 por Mo.** Mo aislados fueron cultivados en ausencia (Medio) o presencia de células K562 previamente marcadas con eFluorDye 670, y en ausencia o presencia de citocalasina D (Cit D). **(A)** Zebra plot representativo de la fagocitosis, determinada como el porcentaje de Mo (células CD14<sup>+</sup>) a su vez positivas para eFluorDye 670. **(B)** Porcentaje Mo que fagocitaron células K562 luego de 30 min de cultivo, evaluado por citometría de flujo (n=6). **(C)** Concentración de IL-18 en los sobrenadantes luego de 48 hs de cultivo de Mo aislados en ausencia (Medio) o presencia de células K562 y en ausencia o presencia de Cit D, medido mediante ELISA (n=4). Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Dunnett **(B, C)**. \*p<0,05; \*\*\*p<0,001.

Por último, nos propusimos corroborar la fagocitosis de las células tumorales por parte de los Mo a través de microscopía confocal. Para ello, cultivamos Mo marcados con CFSE con células K562 previamente marcadas con Vybrant DiD y pudimos observar células K562 (magenta) localizadas dentro de Mo (verdes), lo que indica que fueron fagocitados (**Figura 32A**). A su vez, la reconstrucción 3D de las imágenes obtenidas nos permitió corroborar la presencia de las células K562 dentro de Mo o siendo rodeadas por estos para ser fagocitados (**Figura 32B**). En conjunto, los resultados obtenidos por microscopía y citometría de flujo demuestran que los Mo fagocitan a las células tumorales.



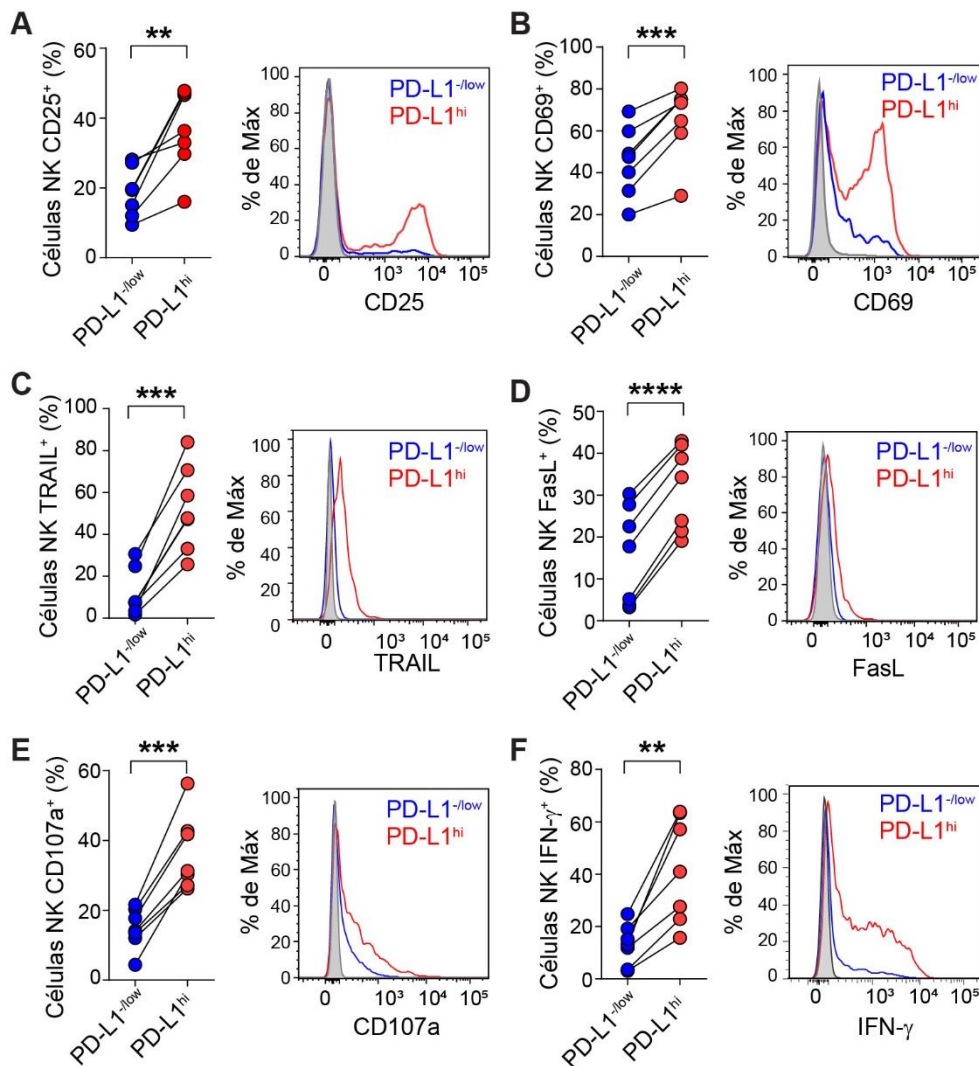
**Figura 32: Fagocitosis por microscopía.** Mo aislados fueron marcados con CFSE, y cultivados con células K562 previamente marcadas con Vybrant DiD. **(A)** Imágenes obtenidas para los cultivos de Mo (verde) con medio, como control (panel superior), y con células K562 (magenta) (panel inferior). Se muestran dos campos distintos para el co-cultivo de Mo con células K562. **(B)** Reconstrucción 3D de las imágenes mostradas en (A) para los cultivos de Mo con células K562. Las flechas indican Mo fagocitando células K562.

Los Mo fagocitan a las células tumorales, lo que induce la producción de IL-18.

## 10. CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS NK PD-L1<sup>HI</sup>

Una vez identificados los mecanismos subyacentes a la expresión de PD-L1 decidimos enfocarnos en investigar las características fenotípicas y funcionales de la población de células NK que expresan altos niveles de PD-L1. Para ello, repetimos los cultivos de PBMC con células K562 durante 48 hs con el fin de obtener dos poblaciones de células NK de acuerdo a su expresión de PD-L1 (células NK PD-L1<sup>-/low</sup> y células NK PD-L1<sup>hi</sup>) y poder analizar la expresión de distintos marcadores asociados al fenotipo y funciones efectoras. Observamos que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> presentaron una mayor frecuencia de los marcadores de activación CD25 (**Figura 33A**) y CD69 (**Figura 33B**), y a su vez, una mayor expresión de los ligandos de receptores de muerte celular TRAIL (**Figura 33C**) y FasL (**Figura 33D**) en comparación con las células NK PD-L1<sup>-/low</sup>, lo que sugiere que PD-L1 se expresa preferentemente en las células NK que se activaron y adquirieron moléculas efectoras de citotoxicidad. Además, las células NK PD-L1<sup>hi</sup> también exhibieron una mayor degranulación (medida como expresión de CD107a) (**Figura 33E**) y capacidad de producción de IFN- $\gamma$  (**Figura 33F**) que las células NK PD-L1<sup>-/low</sup>. Estos resultados nos indican que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> muestran un fenotipo activado y son altamente funcionales.

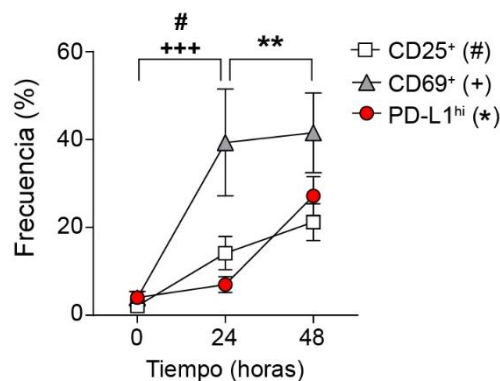




**Figura 33: Características de las células NK PD-L1<sup>hi</sup>.** Frecuencia de células CD25<sup>+</sup> (A), células CD69<sup>+</sup> (B), células TRAIL<sup>+</sup> (C), células FasL<sup>+</sup> (D), células CD107a<sup>+</sup> (E) y células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (F) detectadas dentro de las células NK PD-L1<sup>hi</sup> (rojo) y PD-L1<sup>-low</sup> (azul) luego de 48 hs de cultivo de PBMC estimuladas con células K562, evaluado por citometría de flujo (n=7). Se muestra un histograma representativo para cada marcador analizado. Se realizó el test estadístico *t* de Student. \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.

Estos resultados podrían indicar que las células NK se activan y adquieren una mayor capacidad efectora como consecuencia de la expresión de PD-L1 o, por el contrario, que aquellas células que se activaron y muestran mayor capacidad efectora comienzan a expresar PD-L1 posteriormente. Con el fin de discernir entre ambas posibilidades, realizamos un ensayo cinético y evaluamos por citometría de flujo la expresión de PD-L1, y de los marcadores de activación CD25 y CD69 en las células NK

luego de 0, 24 y 48 hs de cultivo de PBMC con células K562. Pudimos observar que a las 24 hs se produce un marcado aumento en la expresión de CD69 y un poco menor en la expresión de CD25, y dicha expresión no se modifica significativamente a las 48 hs (Figura 34). Mientras que el aumento en la expresión de PD-L1 se produce recién a las 48 hs (Figura 34). Estos resultados nos indican que las células NK se activan y posteriormente comienzan a expresar PD-L1.



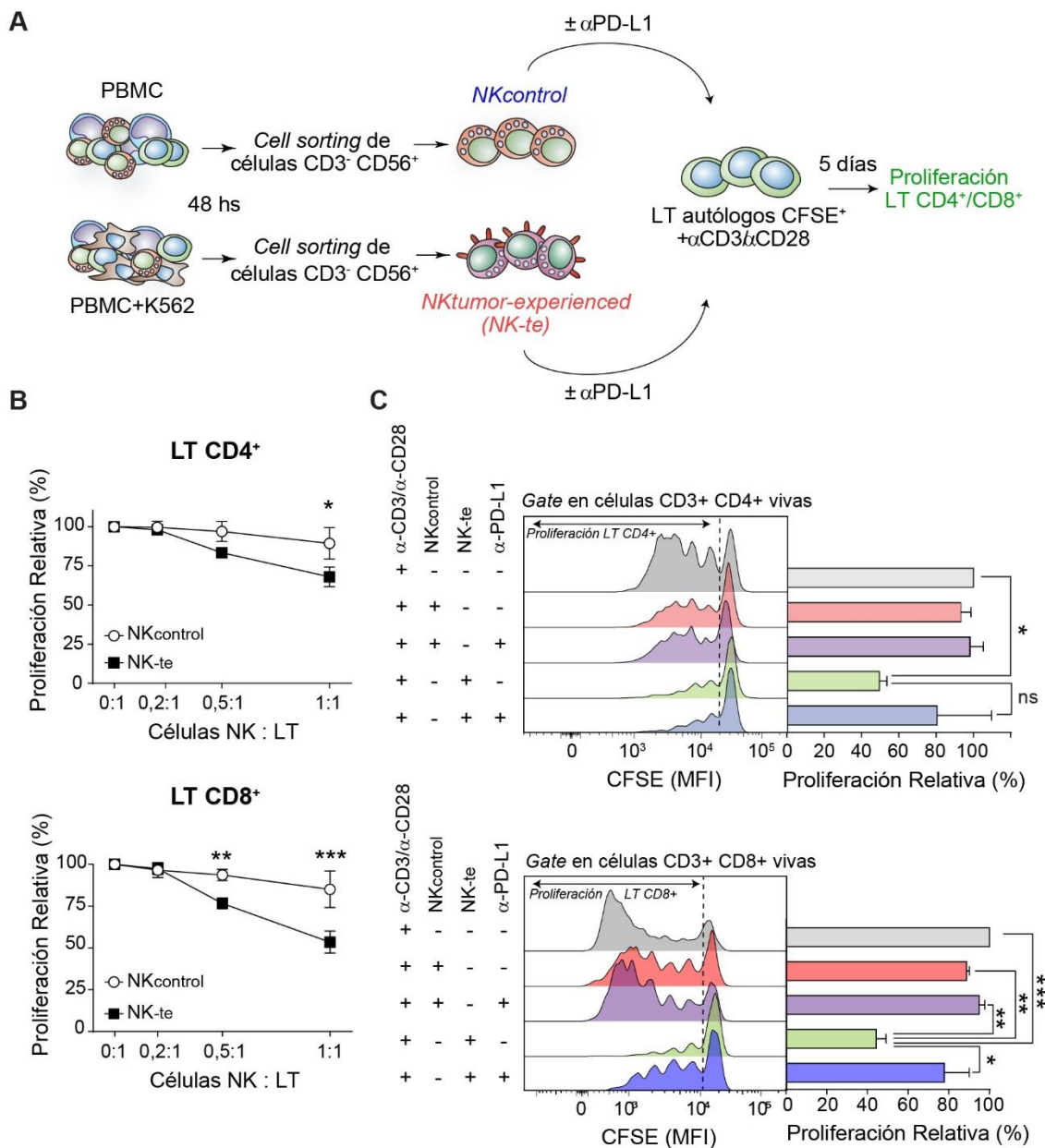
**Figura 34: Cinética de activación y expresión de PD-L1 en las células NK.** Frecuencia de células CD25<sup>+</sup> (cuadrados blancos), células CD69<sup>+</sup> (triángulos grises) y células PD-L1<sup>hi</sup> (círculos rojos) detectadas en las células NK luego de 0, 24 y 48 hs de cultivo de PBMC con células K562, evaluado por citometría de flujo (n=3). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc de Tukey. #p<0,05 para células CD25<sup>+</sup>; \*\*p<0,01 para células PD-L1<sup>hi</sup>; +++p<0,001 para células CD69<sup>+</sup>.

Las células NK PD-L1<sup>hi</sup> exhiben un fenotipo activado y muestran una mayor capacidad efectora.

## 11. CAPACIDAD REGULATORIA DE LAS CÉLULAS NK PD-L1<sup>HI</sup>

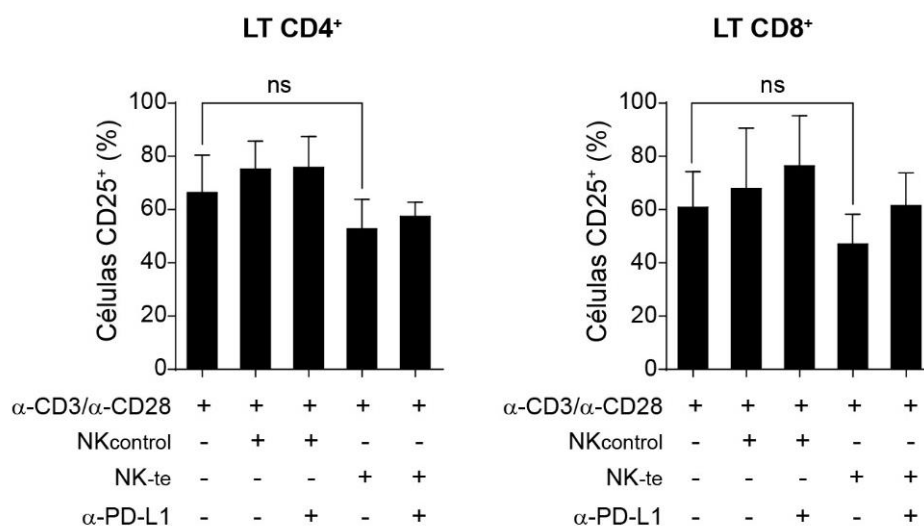
Finalmente, teniendo en cuenta que la expresión de PD-L1 en otros tipos celulares puede inhibir la proliferación, reducir la activación o conducir a la apoptosis de los LT (150), nos propusimos evaluar la capacidad regulatoria de las células NK PD-L1<sup>hi</sup> sobre LT. Para ello cultivamos PBMC en ausencia o presencia de células K562 y luego de 48 hs aislamos a las células NK por *cell sorting*. Las células NK provenientes de los cultivos

en ausencia de células tumorales se denominaron células NKcontrol y presentaban niveles basales de expresión de PD-L1, mientras que las células NK provenientes de los cultivos con células tumorales se denominaron células NK*tumor-experienced* (NK-te) y se encontraban enriquecidas en células NK PD-L1<sup>hi</sup>. Con el fin de evaluar si las células NK, luego de reconocer células tumorales, son capaces de inhibir la proliferación de LT, estimulamos LT con AcMo anti-CD3 y anti-CD28, los cultivamos en presencia de cantidades crecientes de células NK autólogas y al cabo de 5 días evaluamos la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> como dilución de CFSE por citometría de flujo. El esquema de trabajo utilizado se muestra en la **Figura 35A**. Observamos que la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> (**Figura 35B**, panel superior) y LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 35B**, panel inferior) se vio mínimamente afectada por la presencia de células NKcontrol, independientemente de la relación de células utilizada, pero disminuyó significativamente a medida que aumentaba la proporción de células NK-te en los cultivos. Sin embargo, la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> requirió una mayor proporción de células NK-te para verse afectada, comparada con la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 35B**). Posteriormente, con el fin de evaluar la participación de PD-L1 en la supresión observada, repetimos los cultivos, pero incluyendo un AcMo bloqueante de PD-L1. Observamos que la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> no se vio afectada por la presencia del AcMo anti-PD-L1 en los cultivos con células NKcontrol, y tampoco fue capaz de restaurar la proliferación de los LT CD4<sup>+</sup> en presencia de células NK-te (**Figura 35C**, panel superior). Mientras que, al analizar los LT CD8<sup>+</sup> en los cultivos con células NKcontrol no se observaron diferencias en la proliferación en presencia del AcMo anti-PD-L1, en los cultivos con células NK-te el bloqueo de PD-L1 restauró la proliferación de los LT (**Figura 35C**, panel inferior). Estos resultados nos indican que las células NK que estuvieron en contacto con células tumorales son capaces de limitar la expansión de los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, y demuestran que sobre los LT CD8<sup>+</sup> dicha inhibición es a través de PD-L1.



**Figura 35: Capacidad regulatoria de las células NK PD-L1<sup>hi</sup>.** (A) Diseño experimental empleado para generar las células NK control (NKcontrol), y las células NKtumor-experienced (NK-te) enriquecidas en células NK PD-L1<sup>hi</sup>, para evaluar el efecto de estas células sobre la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>. (B) Proliferación relativa de LT CD4<sup>+</sup> (panel superior) LT CD8<sup>+</sup> (panel inferior) analizada por citometría de flujo como dilución de CFSE luego de la estimulación con AcMo anti-CD3/anti-CD28 cultivados con números crecientes de células NKcontrol o células NK-te autólogas (n=3). (C) Proliferación relativa de LT CD4<sup>+</sup> (panel superior, relación 1:1) y LT CD8<sup>+</sup> (panel inferior, relación 0,5:1) analizada por citometría de flujo como dilución de CFSE luego de la estimulación con AcMo anti-CD3/anti-CD28 en ausencia o presencia de células NKcontrol o células NK-te y en ausencia o presencia de un AcMo bloqueante anti-PD-L1. Se muestran histogramas representativos para la dilución de CFSE en las células CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> vivas para cada condición de cultivo. Los datos corresponden a la media ± SEM. Se realizó ANOVA de dos vías con test post-hoc de Sidak (B), y ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey (C). ns: no significativo, \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

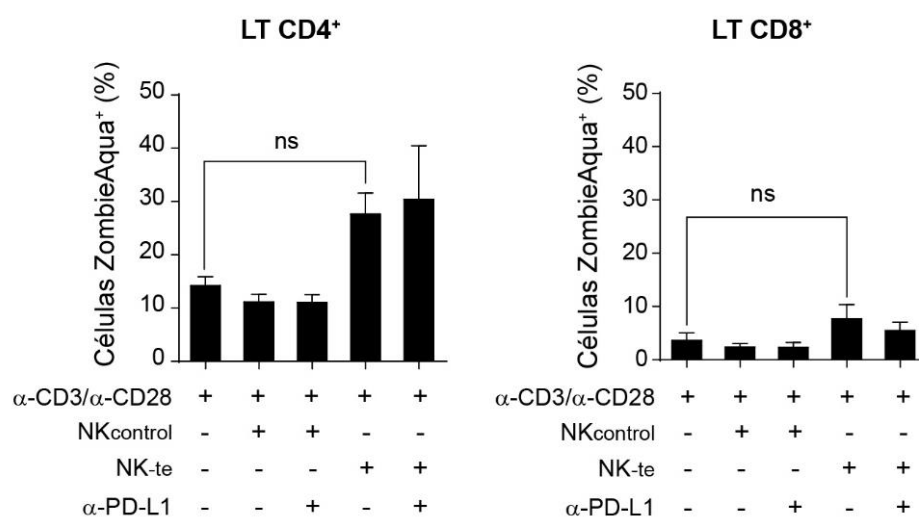
A continuación, evaluamos si las células NK que fueron estimuladas con células tumorales tenían la capacidad de limitar la activación de los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>. Para ello, repetimos los cultivos de LT con células NKcontrol y células NK-te en ausencia o presencia del AcMo bloqueante anti-PD-L1 y luego de 5 días evaluamos por citometría de flujo la expresión del marcador de activación CD25. A diferencia de lo observado en la proliferación, encontramos que tanto la activación de los LT CD4<sup>+</sup> (**Figura 36**, panel izquierdo) como de los LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 36**, panel derecho) no se vio modulada por la presencia de células NK-te, así como tampoco por el bloqueo de PD-L1.



**Figura 36: Regulación de la activación de LT por células NK PD-L1<sup>hi</sup>.** Frecuencia de células CD25<sup>+</sup> detectadas dentro de los LT CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo, n=3) y LT CD8<sup>+</sup> (panel derecho, n=3) analizada por citometría de flujo luego de la estimulación con AcMo anti-CD3/anti-CD28 cultivados en ausencia o presencia de células NKcontrol o células NK-te autólogas (relación 1:1 para LT CD4<sup>+</sup>; relación 0.5:1 para LT CD8<sup>+</sup>) y en ausencia o presencia de un AcMo bloqueante anti-PD-L1. Los datos corresponden a la media ± SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey. ns: no significativo.

Finalmente, con el objetivo de evaluar la capacidad de las células NK-te de inducir la muerte de los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, repetimos los cultivos siguiendo el esquema detallado en la **Figura 35A** y evaluamos la frecuencia de células muertas, medido como LT CD4<sup>+</sup>ZombieAqua<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>ZombieAqua<sup>+</sup>. Observamos que las células NKcontrol no indujeron la muerte de los LT CD4<sup>+</sup> (**Figura 37**, panel izquierdo) o de los LT CD8<sup>+</sup> (**Figura**

37, panel derecho). Por otra parte, en presencia de células NK-te se observa un ligero aumento en la frecuencia de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> muertos, sin embargo, el mismo no es estadísticamente significativo, y no es revertido por el bloqueo de PD-L1. En conjunto, estos resultados demuestran que las células NK que fueron cultivadas con células tumorales no son capaces de limitar la activación ni inducir la muerte de los LT CD4<sup>+</sup> ni LT CD8<sup>+</sup>, pero adquieren la capacidad de inhibir la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de PD-L1.



**Figura 37: Muerte de LT por células NK PD-L1<sup>hi</sup>.** Frecuencia de células ZombieAqua<sup>+</sup> detectadas dentro de los LT CD4<sup>+</sup> (panel izquierdo, n=3) y LT CD8<sup>+</sup> (panel derecho, n=3) analizada por citometría de flujo luego de la estimulación con AcMo anti-CD3/anti-CD28 cultivados en ausencia o presencia de células NKcontrol o células NK-te autólogas (relación 1:1 para LT CD4<sup>+</sup>; relación 0,5:1 para LT CD8<sup>+</sup>) y en ausencia o presencia de un AcMo bloqueante anti-PD-L1. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. Se realizó ANOVA de una vía con test post-hoc de Tukey. ns: no significativo.

Las células NK expuestas a células tumorales adquieren la capacidad de inhibir la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de PD-L1.

## DISCUSIÓN

---

Las células NK poseen actividad anti-viral y antitumoral y se ha asociado una mayor actividad citotóxica natural en sangre periférica con una menor incidencia de tumores (4). Sin embargo, se ha descrito que las células NK también pueden ejercer funciones inmunosupresoras durante infecciones virales (119–122), trasplante (123) y autoinmunidad (124). Previamente nuestro grupo demostró que las células NK de ratones portadores de tumor también pueden adquirir un fenotipo inmunosupresor caracterizado por un aumento en la expresión de PD-L1 (136). Por lo tanto, aunque en los últimos años está emergiendo un rol dual para las células NK, su impacto en la progresión tumoral permanece poco estudiado, es por este motivo que en este trabajo hipotetizamos que las células NK humanas luego de reconocer células tumorales podrían adquirir capacidades inmunoregulatorias, a través de PD-L1, lo que resultaría en una respuesta inmune menos eficiente.

En primer lugar, con el fin de comenzar a estudiar el rol de las células NK humanas en la progresión tumoral, analizamos datos de RNAseq y de supervivencia de pacientes con ccRCC a partir de la base de datos TCGA. Como una estimación del infiltrado de células NK utilizamos una firma de expresión genética basada en firmas de células NK publicadas previamente (219–222) que incluye 10 genes que se encuentran altamente expresados en células NK y que no se expresan o lo hacen débilmente en LT CD8<sup>+</sup> (NCR1, NCR2, NCR3, NCAM1, XCL1, XCL2, KLRD1, KLRC3, IL18RAP y KIR2DL4). NCR1, NCR2 y NCR3 codifican para los receptores de células NK NKp46, NKp44 y NKp30, respectivamente. NCAM1 codifica para CD56; XCL1 y XCL2 codifican para las citoquinas homónimas, producidas preferencialmente por células NK. KLRD1 codifica para CD94 y KLRC3 para NKG2E. IL18RAP codifica para el correceptor de IL18 y KIR2DL4 codifica para un KIR activador. No existe una firma genética “consenso” para la detección de células NK, sino que distintos grupos han utilizado distintas combinaciones de genes para la estimación de la frecuencia de células NK a partir de datos de RNAseq de mezclas de células. Para la confección de la firma genética utilizada en esta Tesis, combinamos los genes más utilizados en publicaciones previas, y excluimos genes relacionados con la actividad citotóxica (como los que codifican para granzimas y Prf), ya que presentan un alto grado de expresión en LT CD8<sup>+</sup>. Llamativamente, los pacientes con un alto infiltrado



de células NK exhibieron una menor sobrevida libre de enfermedad y menor sobrevida en general que los pacientes con un bajo infiltrado de células NK (**Figura 7**), lo cual, aunque parece paradójico, está de acuerdo con un reporte previo (211). Una posible explicación para este hallazgo, coincidente con nuestra hipótesis, es que las TINK faciliten el crecimiento tumoral en ccRCC al inhibir la actividad de otras células con capacidad antitumoral. Sin embargo, no podemos descartar que los tumores que hayan desarrollado mecanismos de escape que les permitan evadir las funciones efectoras de las células NK presenten un mayor crecimiento tumoral, resultando en una menor sobrevida.

Se ha demostrado que las TINK a menudo se vuelven disfuncionales y muestran alteraciones fenotípicas, en comparación con las PBNK o las células NK del tejido peritumoral en diferentes tipos de cáncer (212,213,215), incluido el RCC (214,216,225). Entre tales alteraciones se destacan una menor expresión de receptores activadores, como NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM-1 o CD16, y el aumento de la expresión de receptores inhibitorios como CD85j o PD-1, que en conjunto afectan la capacidad de estas células de reconocer, activarse y eliminar células tumorales, así como la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  (212–216,225). Sin embargo, la posibilidad de que las TINK de RCC presenten un fenotipo compatible con una actividad inmunosupresora, no había sido evaluado hasta el momento. Por lo tanto, en primer lugar, decidimos evaluar si era posible detectar y analizar TINK en muestras frescas de tumor de pacientes con ccRCC por citometría de flujo (**Figura 8**). Si bien la frecuencia de TINK fue variable, fue suficiente como para permitir su análisis. Teniendo presentes nuestros resultados previos en un modelo murino, en el cuál demostramos que las TINK expresan PD-L1 e inhiben la respuesta de LT antitumorales, a continuación, evaluamos la expresión de PD-L1 en las células NK de esos pacientes. Si bien un bajo porcentaje de las PBNK, tanto de DS como de los pacientes con ccRCC expresan PD-L1 (**Figura 9**), las TINK presentan una mayor frecuencia de células PD-L1<sup>+</sup> que además muestran un mayor nivel de expresión de PD-L1 en comparación con PBNK (**Figura 10**). Adicionalmente, observamos una mayor acumulación de células NK PD-L1<sup>+</sup> en tumores de mayor tamaño (**Figura 11**), lo que sugiere que la presencia de células NK que expresan altos niveles de PD-L1 favorece el

crecimiento del tumor. Un meta-análisis de 10 estudios mostró que la expresión de PD-L1 en células tumorales de ccRCC se asocia con una peor supervivencia (226), y la expresión de PD-L1 en células inmunes infiltrantes de tumor también se asocia con un peor pronóstico (227), sin embargo en este estudio, realizado por inmunohistoquímica no se analizó la identidad de las células inmunes PD-L1<sup>+</sup>.

A continuación, con el fin de establecer un sistema que nos permita estudiar *in vitro* los mecanismos subyacentes a la aparición de TINK PD-L1<sup>hi</sup> en tumores renales, analizamos la capacidad de las células NK de reconocer y activarse en respuesta a líneas celulares de RCC. Ambas líneas celulares de RCC utilizadas en esta Tesis, SN12c y 786-O, indujeron la degranulación de las células NK (**Figura 12**) y promovieron la aparición de células NK PD-L1<sup>hi</sup> en PBMC de DS (**Figura 13**). Mediante el uso de dispositivos *transwells* demostramos que la inducción de PD-L1 es dependiente del contacto celular (**Figura 14**). Estos hallazgos están en concordancia con resultados de mi Tesis de Licenciatura (que fueron incluidos en esta Tesis para aportar claridad), donde demostramos que, a través de un contacto directo, parcialmente dependiente de NKG2D, las células K562 son capaces de inducir un aumento la expresión de PD-L1 en células NK, y este aumento es aún mayor en presencia de otras células de los PBMC (**Figura 15**). Tanto la línea celular K562 como SN12c y 786-O, constituyen buenos modelos para estudiar la inducción de PD-L1 *in vitro*, sin embargo, las líneas de RCC expresan niveles normales de moléculas de HLA de clase I mientras que la línea celular K562 carece de la expresión de estas moléculas. Tal como se mencionó anteriormente, las moléculas de HLA de clase I son reconocidas por las células NK a través de los receptores polimórficos KIR (35) que median señales inhibitorias y evitan la activación de las mismas. Las diferencias en los alelos de KIR de los donantes introduce un alto grado de variabilidad en la capacidad de sus células NK de reconocer a las líneas celulares que expresan moléculas de HLA de clase I. Por ello, para eventualmente prevenir una mayor variabilidad en la respuesta de los donantes que podrían enmascarar los resultados, continuamos realizando los experimentos con la línea celular K562 y corroborando los hallazgos más relevantes con las líneas de RCC SN12c y 786-O.

El aumento en la frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> observado en los cultivos podría deberse a una proliferación preferencial de las células NK que expresaban basalmente PD-L1 al comienzo del cultivo. Sin embargo, el número de células NK se mantuvo estable en ausencia o presencia de células tumorales (**Figura 16**), lo que descarta la proliferación diferencial y sugiere que el aumento en la expresión de PD-L1 en las células NK se debe a que células que no expresaban dicha molécula comienzan a hacerlo durante el co-cultivo. Otra posibilidad para considerar es que las células NK capten PD-L1 de las células tumorales a través de un fenómeno de trogocitosis (228,229), sin embargo, este fenómeno ocurre de manera muy rápida una vez que las células entran en contacto y la cinética de aparición de PD-L1 es más lenta (comienza a aumentar a las 24 hs y llega a un pico a las 48 hs, **Figura 34**).

Con respecto a la participación de PBMC, a través de distintos esquemas utilizando *transwells* observamos que los factores solubles derivados de PBMC que estuvieron en contacto con células tumorales inducen la mayor expresión de PD-L1 en las células NK cuando éstas también experimentaron el contacto directo con las células tumorales (**Figura 17**). Confirmamos estas observaciones utilizando MC provenientes de cultivos de PBMC en ausencia o presencia de células tumorales para estimular células NK aisladas o en contacto con las células tumorales (**Figura 18**). En conjunto, estos resultados nos sugieren que para potenciar la expresión de PD-L1 las células NK requieren tanto del reconocimiento directo de las células tumorales como de los factores solubles producidos por los PBMC como consecuencia del contacto con las células tumorales. Más precisamente, por medio de ensayos de neutralización con AcMo, identificamos a IL-18 como uno de los factores necesarios para la expresión de PD-L1, y comprobamos su presencia en los cultivos de PBMC con células tumorales (**Figura 19**). Sin embargo, también destacamos que debido a que la neutralización de IL-18 con AcMo solo bloqueó parcialmente la expresión de PD-L1 en las células NK no descartamos la participación de otros factores solubles (**Figura 19A**).

El reconocimiento de células tumorales (15) o la estimulación con IL-12 e IL-18 inducen fuertemente la producción de IFN- $\gamma$  por células NK (65), que a su vez es un potente inductor de la expresión de PD-L1 en células tumorales y otras células del

sistema inmune (152,230–232). Por este motivo, quisimos evaluar si el IFN- $\gamma$  era el responsable directo del aumento de expresión de PD-L1 en las células NK. Sin embargo, la expresión de PD-L1 en las células NK permaneció sin cambios cuando los PBMC se estimularon con células K562 en presencia de un AcMo bloqueante del receptor de IFN- $\gamma$  o de un AcMo neutralizante anti-IFN- $\gamma$  (**Figura 20**). Estos hallazgos indican que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> podrían generarse incluso cuando la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK y LT disminuye debido a diferentes mecanismos de escape tumoral.

En línea con nuestros resultados sobre la participación de IL-18, también observamos una correlación positiva entre la concentración de IL-18 en los sobrenadantes de PBMC estimulados con células tumorales K562 y la frecuencia de células NK que expresan PD-L1 (**Figura 21**), sugiriendo una relación de dosis-respuesta. A su vez, también detectamos la presencia de IL-18 en cultivos de PBMC con las líneas celulares de RCC, SN12c y 786-O, y su neutralización también restringió la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 22**). Adicionalmente, los experimentos con células NK aisladas estimuladas sólo con IL-18 recombinante, sólo con células K562 o ambas permitieron comprobar que el reconocimiento de las células tumorales actúa como primera señal para generar un incremento en la expresión de PD-L1 en las células NK, el cual puede ser potenciado por la acción de IL-18, actuando como segunda señal (**Figura 23**). Aún más, observamos que la presencia de células tumorales induce un aumento en la expresión de IL-18R $\alpha$  en las células NK (**Figura 24A**), lo que puede explicar por qué IL-18 no es capaz de inducir PD-L1 en las células NK en reposo, pero si potencia su expresión cuando las células NK fueron expuestas a células tumorales (**Figura 23**), dado que las células NK se vuelven más sensibles a IL-18.

La expresión preferencial de PD-L1 en células NK sensibles a IL-18 (IL-18R $\alpha$ <sup>+</sup>) respalda nuestras conclusiones (**Figura 24C**). Por otro lado, en línea con la bibliografía (233), observamos una mayor expresión del receptor de IL-18 en las células NK CD56<sup>bright</sup> comparado con las células NK CD56<sup>dim</sup> (**Figura 25A**). Concordantemente, hallamos una mayor frecuencia de células NK PD-L1<sup>hi</sup> dentro de las células NK CD56<sup>bright</sup> (**Figura 25B**). A pesar de lo interesante de este hallazgo, en las muestras de pacientes con ccRCC no fue posible realizar el mismo análisis en ambas poblaciones de células NK debido a que

el estado de activación de las TINK no permite distinguir entre células NK CD56<sup>dim</sup> y CD56<sup>bright</sup> dentro del tumor.

Por otra parte, IL-18 es sintetizada como una pro-citoquina y su forma activa se produce por el clivaje de pro-IL-18 por acción de caspasa-1, como consecuencia de la acción de esta caspasa también se produce el clivaje de pro-IL-1 $\beta$  que genera su forma activa (58,59). Existen evidencias que demuestran que IL-1 $\beta$  puede modular la actividad de las células NK, promoviendo la producción de IFN- $\gamma$  (75) o el aumento en la expresión del receptor NKp44 (9), por lo tanto decidimos evaluar la participación de esta citoquina en la modulación de la expresión de PD-L1 en células NK. No obstante, los experimentos utilizando un antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  durante el co-cultivo con células tumorales o estimulando PBMC con IL-1 $\beta$  recombinante evidenciaron que la expresión de PD-L1 no se encuentra modulada por la misma (**Figura 26**).

En conjunto, nuestros resultados indican que IL-18 representa el factor principal que potencia la expresión de PD-L1 en las células NK estimuladas por tumores. IL-18 es una citoquina con propiedades proinflamatorias, involucrada en la estimulación de las células NK y las respuestas inmunitarias de tipo Th1, cruciales para la inmunidad antitumoral (234). También puede inducir la secreción de quemoquinas por parte de las células NK que reclutan CD y promueven, a su vez, el reclutamiento de LT CD8<sup>+</sup> al microambiente tumoral (235). Debido a su actividad antitumoral se ha estudiado la posible utilización de esta citoquina en combinación con otros fármacos como tratamiento del cáncer (236,237). Sin embargo, IL-18 tiene un efecto dual y puede ejercer también funciones protumorales favoreciendo tanto la angiogénesis al estimular la producción de VEGF, como la migración celular en melanoma y cáncer gástrico o la metástasis en cáncer de pulmón (238). Se ha demostrado también en modelos murinos que IL-18 producida por células tumorales induce un aumento en la expresión de PD-1 en las células NK, lo que limita su actividad y promueve la aparición de metástasis (239). Por otra parte, la presencia de altas concentraciones de IL-18 en el suero de pacientes con tumores de diferente etiología, incluido el RCC, se asocia con la progresión y agresividad de la enfermedad, y se correlaciona con un estadio tumoral avanzado y una

sobrevida general más corta (240–243). En este contexto, la aparición de células NK PD-L1<sup>hi</sup> impulsada por IL-18 podría ser parte de los efectos protumorales de esta citoquina.

Las células mieloides son las principales productoras de IL-18 (91), por este motivo evaluamos si los Mo presentes en los PBMC constituyen la fuente de IL-18 durante los cultivos con células tumorales. Si bien no es posible detectar IL-18 en cultivos de células NK con células tumorales, o de PBMC o Mo aislados, observamos que los niveles de IL-18 cuantificados en sobrenadantes de cultivo de Mo en presencia de células NK y células tumorales no difieren de los niveles de IL-18 hallados en los cultivos de PBMC con células tumorales (**Figura 27A**). Teniendo en cuenta estos resultados, utilizamos este cultivo de sólo 3 poblaciones celulares (Mo, NK y tumor), y comprobamos que la expresión de PD-L1 inducida en las células NK es comparable a la observada en los cultivos de PBMC con células tumorales (**Figura 27B**). Además, la neutralización de IL-18 en estos cultivos restringe la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 27B**), demostrando que los Mo colaboran en la inducción de la expresión de PD-L1 a través de la producción de IL-18.

Posteriormente nos interesamos en los mecanismos involucrados en la inducción de IL-18; para ello nos planteamos dos posibilidades, que la producción de IL-18 requiera del reconocimiento directo de las células tumorales, o que se induzca por acción de factores solubles derivados de los cultivos de células NK con células tumorales, los cuáles pueden incluir citoquinas o factores derivados de la muerte tumoral. Mediante la utilización de *transwells* comprobamos que al evitar el contacto entre PBMC y las células tumorales se evita la producción de IL-18 (**Figura 28B**), lo que nos sugiere que es el contacto directo con las células tumorales lo que promueve la producción de IL-18 y no los factores solubles. Aún más, los experimentos de co-cultivo de Mo con células K562 o con células NK y células K562 demuestran que la presencia de células tumorales es estímulo suficiente para inducir la producción de IL-18, incluso en ausencia de células NK (**Figura 29**).

Como mencionamos, la caspasa-1 es la responsable del clivaje de pro-IL-18 para dar su forma activa, en los Mo esta activación puede darse como consecuencia de múltiples estímulos capaces de activar los inflammasomas (244). Los inflammasomas son

complejos multiproteicos que se ensamblan en respuesta a estímulos asociados con estrés e infección y conducen a la activación de respuestas inflamatorias rápidas mediadas por caspasa-1 (244). Entre las familias de proteínas que pueden formar inflamasomas encontramos a los NLR, compuestos por NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12 y NLRC4, la familia de receptores similares a AIM2 y los RLR (244). El inflamasoma más ampliamente estudiado es el NLRP3. Las señales que lo activan incluyen, entre otros, patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (*Damage associated molecular patterns*, DAMPs) como ATP, cristales de ácido úrico y ADN intracelular; y se han propuesto diversos mecanismos que llevan a su activación, entre ellos el estrés oxidativo, el flujo de iones y la ruptura lisosomal (58,244). A su vez, algunas de estas señales o vías de activación también pueden estar implicadas en la activación de otros inflamasomas. La muerte celular inmunogénica de las células tumorales mediada por LT y células NK libera numerosos DAMPs (245), y se ha demostrado, por ejemplo, que las células tumorales al morir liberan ATP, que actúa sobre el receptor purinérgico P2X7 en las CD y desencadena la activación de caspasa-1 dependiente de NLRP3 (246). En base a estos antecedentes, decidimos evaluar la participación de algunos de estos mecanismos en la producción de IL-18. Para ello, y teniendo en cuenta los tres mecanismos mencionados anteriormente, en los experimentos de co-cultivo de PBMC con células tumorales utilizamos catalasa para eliminar ROS, y L-NAME como inhibidor de la NOS. A su vez, el ATP extracelular activa el receptor P2X7 y desencadena una salida rápida de  $K^+$  (247), para evaluar la participación de esta vía utilizamos un antagonista de dicho receptor (A740003). Por último, también utilizamos drogas que inhiben el proceso de autofagia (cloroquina) y de fagocitosis (citocalasina D) dado que estos mecanismos convergen en la unión a lisosomas (248). Observamos que únicamente la inhibición de la fagocitosis restringió tanto la producción de IL-18 en los cultivos como la expresión de PD-L1 en las células NK (**Figura 30**). Una pregunta que podría surgir en este punto es si la utilización de citocalasina D, que interrumpe la red de actina, podría estar impidiendo el ensamblaje del inflamasoma o inhibiendo totalmente la secreción de citoquinas. No obstante, se ha demostrado que la utilización de citocalasina D impide la producción de

IL-1 $\beta$ , que utiliza la misma vía que IL-18, en macrófagos murinos cuando son estimulados con sales de aluminio (que forman agregados que son fagocitados), pero no impide la secreción de esta citoquina cuando es inducida por estímulos independientes de fagocitosis (249). Adicionalmente, la citocalasina D no inhibió la expresión de PD-L1 inducida por citoquinas en las células NK (*no mostrado*) lo que indica que la citocalasina no regula directamente la expresión de PD-L1. Nuestros resultados indican que la fagocitosis desempeña un papel clave en la producción de IL-18, que en consecuencia afecta la expresión de PD-L1 en las células NK, sin embargo, no son suficientes para permitirnos identificar el o los inflamomas involucrados.

Es importante mencionar que la inhibición de los procesos de autofagia también restringe la expresión de PD-L1 en las células NK, pero no así la secreción de IL-18, lo que sugiere que la autofagia también podría ser parte del mecanismo de inducción de PD-L1 (**Figura 30**). No nos fue posible establecer si la autofagia era requerida a nivel del Mo, de las células tumorales y/o de las células NK, ya que al realizar el ensayo incubando a cada tipo celular con la cloroquina y lavando previamente al co-cultivo, se perdió el efecto observado cuando el inhibidor estuvo presente durante todo el co-cultivo.

En función de nuestros hallazgos, posteriormente realizamos cultivos de Mo con células K562 y comprobamos mediante citometría de flujo que las células tumorales son fagocitadas por los Mo, lo cual fue inhibido en presencia de citocalasina D (**Figura 31B**). En concordancia, también hallamos que la producción de IL-18 en los cultivos de Mo con células tumorales, fue inhibida al restringir la fagocitosis (**Figura 31C**), demostrando que la fagocitosis de las células tumorales induce la secreción de IL-18 en los Mo. Si bien la citometría de flujo tiene la ventaja de permitir el análisis simultáneo de miles de células, una limitación importante al momento de evaluar la fagocitosis consiste en que no permite distinguir inequívocamente entre células unidas o células fagocitadas, por ello, la inhibición del fenómeno utilizando citocalasina D (que inhibe la polimerización de los filamentos de actina y por lo tanto, la fagocitosis) nos permite confirmar que lo observado por citometría de flujo corresponde a fagocitosis. Adicionalmente, a fin de corroborar estos resultados por otro método, utilizamos también microscopía confocal de alta resolución y así pudimos visualizar a las células tumorales siendo efectivamente



fagocitadas por los Mo (**Figura 32**). En el contexto del microambiente tumoral, además de Mo también esperaríamos encontrar otras células mieloides como CD o macrófagos (109,250). En este sentido, se ha reportado la presencia de un elevado número de TAM con fenotipo similar a los macrófagos M2 (perfil más inmunosupresor) en el infiltrado tumoral de varios tumores sólidos (250–254), incluido el ccRCC (255), lo cual se correlaciona con un peor pronóstico de la enfermedad. Especulamos que los TAM presentes en ccRCC, como parte de un mecanismo inmunosupresor también podrían potenciar la expresión de PD-L1 en las TINK de esos pacientes mediante IL-18.

Posteriormente, nos enfocamos en las características fenotípicas y funcionales de la población de células NK que expresan altos niveles de PD-L1. Nuestros resultados muestran que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> generadas *in vitro* poseen una mayor capacidad efectora y un fenotipo más activado (**Figura 33**), esto podría contrastar con nuestra observación inicial donde un alto infiltrado de células NK se correlaciona con un peor pronóstico (**Figura 7**). Sin embargo, la activación de las células NK ocurre rápidamente luego del contacto con células tumorales, tal como pudimos observar para los marcadores CD25 y CD69 a las 24 hs, mientras que el incremento en la expresión de PD-L1 se observa más tarde, con un pico a las 48 hs (**Figura 34**). Es concebible que la expresión de PD-L1 se induzca preferentemente en las células NK activadas y con mayor capacidad efectora como parte de un proceso homeostático. Sin embargo, en un contexto tumoral se debe considerar que las células NK estimuladas crónicamente adquieren características de células agotadas y se vuelven disfuncionales (212–217). En este sentido, se demostró que las TINK de pacientes con sarcoma y tumor de mama expresan altos niveles de CD73 junto con múltiples puntos de control inmunológicos, incluidos PD-L1, TIM-3, LAG-3, VISTA y PD-1 implicados en el agotamiento celular, además adquieren propiedades inmunoregulatorias dentro del microambiente tumoral y se asocian con tumores de mayor tamaño (134). Estos datos podrían explicar por qué la presencia de un alto infiltrado de células NK se asocia con un peor pronóstico, tal como observamos anteriormente.

Finalmente, en base a evidencias recientes que demuestran que las células NK adquieren propiedades inmunoregulatorias en el entorno tumoral (134–136), y

teniendo en cuenta que la interacción entre PD-L1 en células tumorales y PD-1 en LT frecuentemente da como resultado la apoptosis, anergia y agotamiento de estas células (150,157), nos propusimos analizar si las células NK PD-L1<sup>hi</sup> presentaban capacidad regulatoria sobre LT. Evaluar la capacidad regulatoria de las células NK de pacientes con ccRCC no fue posible dada la dificultad para aislar suficientes TINK de las muestras, debido al pequeño tamaño de las piezas tumorales y al bajo número de células infiltrantes que podían obtenerse. Por lo tanto, decidimos generar *in vitro* células NK PD-L1<sup>hi</sup> a partir de cultivos de PBMC de DS con células K562 y luego aislarlas mediante *cell sorting*. En esta instancia, nos encontramos con la imposibilidad de separar a las células NK en función de la expresión de PD-L1 debido a que el AcMo utilizado para detectar PD-L1 por citometría de flujo es a su vez bloqueante. Por ello, cultivamos PBMC con células K562 para generar células NK enriquecidas en células PD-L1<sup>hi</sup> y aislamos células NK totales mediante *cell sorting*. Observamos que la proliferación tanto de los LT CD4<sup>+</sup> como los LT CD8<sup>+</sup> disminuye a mayor proporción de células NK-te en los cultivos (**Figura 35B**), demostrando un efecto inhibitorio. Llamativamente, la restricción en la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> requirió de una menor proporción de NK-te en los cultivos, sugiriendo un mayor efecto de las células NK sobre los LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 35B**). Y aún más, al incluir en los cultivos un AcMo bloqueante anti-PD-L1 encontramos que sólo fue posible restaurar la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> (**Figura 35C**). Estos resultados nos sugieren que mientras la inhibición sobre los LT CD8<sup>+</sup> se da a través de la interacción PD-1/PD-L1, la inhibición sobre los LT CD4<sup>+</sup> ocurre mediante otro mecanismo. Es importante resaltar que estos cultivos se realizaron en ausencia de otras células del sistema inmune capaces de modular a los LT, tales como CD, por lo tanto, la inhibición observada se debe a una interacción directa entre las células NK y los LT. En función de estos resultados demostramos que las células NK estimuladas con células tumorales generan células NK con capacidad inmunoregulatoria, capaces de inhibir la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, y aún más, demostramos que la inhibición en los LT CD8<sup>+</sup> es a través de PD-L1. Por otra parte, no observamos que las células NK-te puedan regular otras funciones de los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>, en términos de activación y sobrevida (**Figura 36 y 37**). Se sabe que PD-1 reduce la sobrevida de los LT ya que la señalización a través de este receptor previene

la expresión del gen antiapoptótico Bcl-xL, mientras que la señalización a través de CD28 mantiene la supervivencia mediante la expresión de dicho gen (256); en nuestros ensayos podría estar ocurriendo un balance entre las señales dadas por la estimulación con AcMo anti-CD28 y por PD-L1 en las células NK-tes, lo cual no nos permite observar diferencias en la supervivencia de los LT. Por otro lado, tanto la activación como la supervivencia de los LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup> se evaluaron utilizando la relación entre células NK y LT donde observamos que se inhibía la proliferación, por lo que no podemos descartar que utilizando otra relación se vean afectadas la activación y/o la supervivencia de estas células.

Aunque la expresión de PD-L1 en las células tumorales juega un papel relevante en la atenuación de la inmunidad antitumoral, diferentes estudios que utilizaron modelos preclínicos en ratones mostraron que la expresión de PD-L1 en células no tumorales participa en la supresión de las respuestas de LT antitumorales y contribuye al escape tumoral (257,258). Además, la eficacia de la terapia anti-PD-L1 se basa parcialmente en la expresión de PD-L1 en células no tumorales (259–261). En consecuencia, nuestros resultados que muestran que las TINK de ccRCC presentan una alta expresión de PD-L1, y que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> pueden inhibir la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de PD-L1, sugieren que las células NK también podrían ser el objetivo durante el tratamiento con AcMo anti-PD-L1. Un trabajo reciente reveló la presencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> en la sangre de pacientes con leucemia mieloide aguda (262). En este trabajo, los autores también observaron que PD-L1 se expresa en las células NK luego del reconocimiento directo de las células tumorales, que dicha expresión ocurriría como consecuencia de la activación de las células NK, la cual no se ve afectada por IFN- $\gamma$ , y demuestran a su vez que las células NK PD-L1<sup>+</sup> son altamente efectoras y con un fenotipo activado, resultados que coinciden y respaldan nuestros hallazgos. Sin embargo, no analizaron la posible capacidad regulatoria de estas células sino que se centraron en la funcionalidad intrínseca de PD-L1 en las células NK y demostraron que el tratamiento con Atezolizumab, un AcMo anti-PD-L1 humanizado, aumentó la capacidad efectora de las células NK PD-L1<sup>+</sup>.

Se ha descrito que una población de células NK residentes de hígado de ratones con infecciones virales crónicas o agudas expresan PD-L1 y regulan negativamente la

respuesta antiviral mediada por de LT a través de interacciones PD-1/PD-L1 (263). Más recientemente se demostró que esta población de células NK PD-L1<sup>+</sup> puede restringir la respuesta T antiviral generada por vacunación en un modelo de infección crónica con el virus de la hepatitis B (264). Por lo tanto, la capacidad regulatoria de poblaciones de células NK PD-L1<sup>+</sup> parecería ser un fenómeno que no está solamente restringido a la respuesta anti-tumoral.

Por último, dado que PD-1 puede expresarse en un subconjunto de células NK, como se observa en pacientes infectados con citomegalovirus (CMV) y en pacientes con cáncer (162–164), también es posible que las células NK PD-L1<sup>hi</sup> puedan mostrar una actividad regulatoria sobre células NK PD-1<sup>+</sup>.

Los LT CD8<sup>+</sup> son fundamentales para la eliminación del tumor y la presencia de LT CD8<sup>+</sup> infiltrantes de tumor tiene un valor pronóstico positivo en pacientes con diferentes tipos de cáncer (265). En pacientes con ccRCC, un mayor infiltrado de LT CD8<sup>+</sup> intratumorales correlaciona con un peor pronóstico, excepto cuando estos LT CD8<sup>+</sup> están proliferando, lo que se asocia con una sobrevida más prolongada (266). Nuestros resultados, que demuestran que las células NK PD-L1<sup>+</sup> pueden inhibir la proliferación de LT CD8<sup>+</sup>, podrían explicar por qué un alto infiltrado de células NK se asocia con una menor sobrevida en pacientes con ccRCC.

En resumen, el reconocimiento de tumores, en cooperación con IL-18 producida por los Mo como consecuencia de la fagocitosis de células tumorales, induce la expresión de PD-L1 en las células NK, lo que resulta en un enriquecimiento en células NK PD-L1<sup>hi</sup> que a su vez limitan la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> a través de PD-L1. En consecuencia, la respuesta clínica observada en varios tipos de tumores, incluido el ccRCC, después de la terapia dirigida al eje PD-1/PD-L1 utilizando AcMo podría depender parcialmente del bloqueo de PD-L1 en TINK.

## CONCLUSIONES

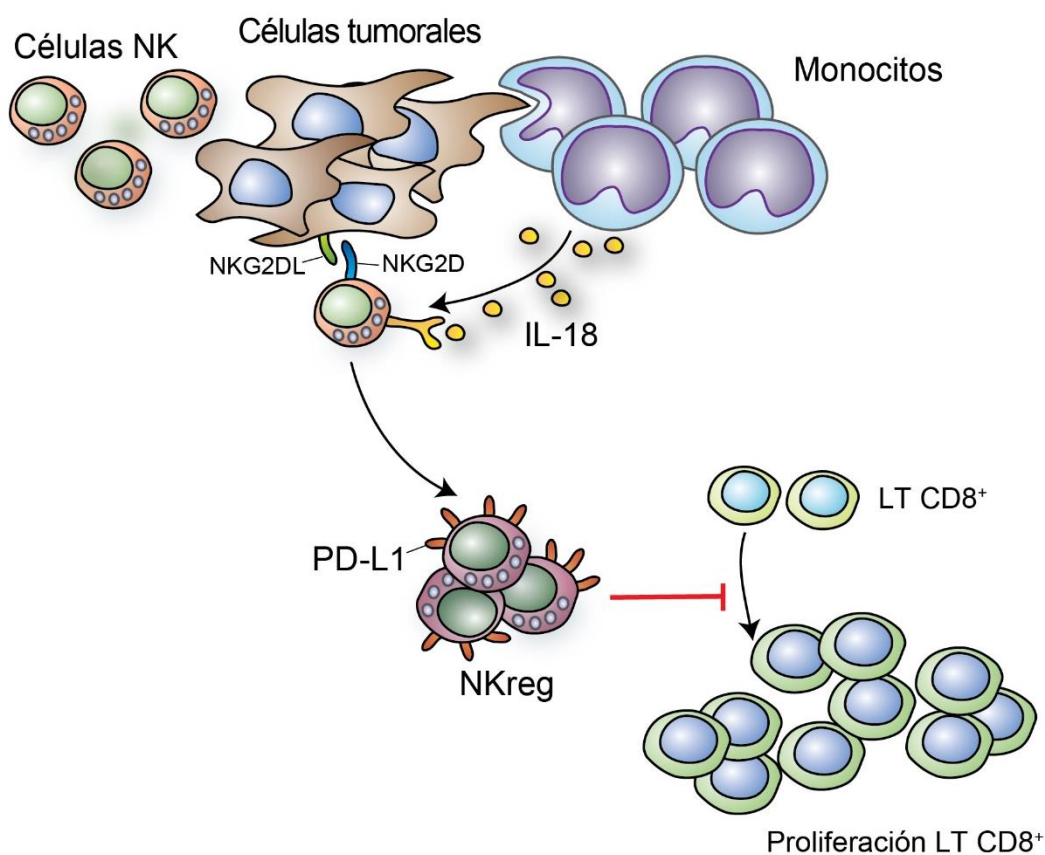
---

Los hallazgos de este trabajo demuestran que:

- ✓ En pacientes con ccRCC un mayor infiltrado de células NK se asocia con una disminución de la supervivencia.
- ✓ Las TINK de estos pacientes expresan altos niveles de la molécula inhibitoria PD-L1, y la presencia de células NK PD-L1<sup>+</sup> se asocia con un mayor tamaño tumoral.
- ✓ Líneas celulares de RCC o la línea K562 pueden inducir la expresión de PD-L1 en células NK *in vitro* mediante la interacción directa con las células tumorales.
- ✓ El aumento en la frecuencia de células NK que expresan PD-L1 se debe a un aumento de la expresión de dicha molécula durante el co-cultivo, no a una proliferación preferencial de las células NK que lo expresan basalmente.
- ✓ La citoquina IL-18 es crítica para potenciar la expresión de PD-L1 en las células NK. Además, PD-L1 se expresa preferentemente en las células sensibles a IL-18.
- ✓ La expresión de PD-L1 en las células NK no se modula por la acción de IFN- $\gamma$  o IL-1 $\beta$ .
- ✓ Las células tumorales son fagocitadas por los Mo, lo que gatilla la producción de IL-18, que potencia la expresión de PD-L1.
- ✓ Las células NK PD-L1<sup>hi</sup> exhiben un fenotipo activado y muestran una mayor capacidad efectora.
- ✓ Las células NK que estuvieron en contacto con células tumorales son capaces de inhibir la proliferación de LT CD4<sup>+</sup> y LT CD8<sup>+</sup>.
- ✓ La inhibición de la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> es dependiente de PD-L1.

En conjunto, a lo largo de este trabajo de Tesis, dilucidamos los mecanismos subyacentes a la expresión de PD-L1 en células NK humanas, y demostramos que en el contexto de la respuesta inmune antitumoral se puede generar una subpoblación de células NK con capacidad regulatoria, lo que explicaría el impacto negativo de un alto infiltrado de células NK en pacientes con ccRCC. Además, este trabajo constituye el primer reporte de la expresión de PD-L1 en células NK humanas infiltrantes de tumores sólidos.

Los resultados de este trabajo se pueden resumir en el modelo de la **Figura 38**, donde se ilustra que las células NK comienzan a expresar la molécula inhibitoria PD-L1 luego del reconocimiento tumoral a través del receptor NKG2D, y esta expresión se puede ver potenciada por la acción de la citoquina IL-18 producida por los Mo como consecuencia de la fagocitosis de las células tumorales. De esta manera, se genera una subpoblación de células NK regulatorias, capaces de inhibir la proliferación de los LT CD8<sup>+</sup> a través de PD-L1.



**Figura 38: Modelo que ilustra el mecanismo de inducción de la expresión de PD-L1 en células NK humanas y sus funciones regulatorias.**

Por último, estos resultados sugieren que las células NK también podrían ser blanco de las terapias dirigidas al eje PD-1/PD-L1 utilizando AcMo, ya que su mecanismo de acción podría depender parcialmente del bloqueo de PD-L1 en las células NK infiltrantes del tumor.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---



1. Diefenbach A, Colonna M, Romagnani C. The ILC World Revisited. *Immunity*. 2017;46(3):327-332. doi:10.1016/j.immuni.2017.03.008
2. Vivier E, Artis D, Colonna M, et al. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-1066. doi:10.1016/j.cell.2018.07.017
3. Del Zotto G, Marcenaro E, Vacca P, et al. Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom*. 2017;92(2):100-114. doi:10.1002/cyto.b.21508
4. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, et al. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet Lond Engl*. 2000;356(9244):1795-1799. doi:10.1016/S0140-6736(00)03231-1
5. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990;76(12):2421-2438.
6. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, et al. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008;9(5):503-510. doi:10.1038/ni1582
7. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, et al. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ*. 2008;15(2):226-233. doi:10.1038/sj.cdd.4402170
8. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001;22(11):633-640. doi:10.1016/s1471-4906(01)02060-9
9. Mattioli I, Pesant M, Tentorio PF, et al. Priming of Human Resting NK Cells by Autologous M1 Macrophages via the Engagement of IL-1 $\beta$ , IFN- $\beta$ , and IL-15 Pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015;195(6):2818-2828. doi:10.4049/jimmunol.1500325
10. Strowig T, Brilot F, Münz C. Nontoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180(12):7785-7791. doi:10.4049/jimmunol.180.12.7785
11. Grégoire C, Chasson L, Luci C, et al. The trafficking of natural killer cells. *Immunol Rev*. 2007;220(1):169-182. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x
12. Carrega P, Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front Immunol*. 2012;3:347. doi:10.3389/fimmu.2012.00347
13. Sojka DK, Tian Z, Yokoyama WM. Tissue-resident natural killer cells and their potential diversity. *Semin Immunol*. 2014;26(2):127-131. doi:10.1016/j.smim.2014.01.010
14. Martín-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, et al. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*. 2004;5(12):1260-1265. doi:10.1038/ni1138
15. Fauriat C, Long EO, Ljunggren HG, et al. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*. 2010;115(11):2167-2176. doi:10.1182/blood-2009-08-238469
16. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, et al. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(2):728-732. doi:10.1073/pnas.1012356108

17. Ferlazzo G, Thomas D, Lin SL, 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 Baltim Md 1950*. 2004;172(3):1455-1462. doi:10.4049/jimmunol.172.3.1455
18. Romagnani C, Juelke K, Falco M, et al. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178(8):4947-4955. doi:10.4049/jimmunol.178.8.4947
19. Dulphy N, Haas P, Busson M, et al. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181(3):2227-2237. doi:10.4049/jimmunol.181.3.2227
20. Yu J, Mao HC, Wei M, et al. CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets. *Blood*. 2010;115(2):274-281. doi:10.1182/blood-2009-04-215491
21. Björkström NK, Riese P, Heuts F, 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(19):3853-3864. doi:10.1182/blood-2010-04-281675
22. Juelke K, Killig M, Luetke-Eversloh M, et al. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood*. 2010;116(8):1299-1307. doi:10.1182/blood-2009-11-253286
23. Zwirner NW, Domaica CI. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors Oxf Engl*. 2010;36(4):274-288. doi:10.1002/biof.107
24. Becknell B, Caligiuri MA. Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol*. 2005;86:209-239. doi:10.1016/S0065-2776(04)86006-1
25. Sivori S, Falco M, Marcenaro E, et al. Early expression of triggering receptors and regulatory role of 2B4 in human natural killer cell precursors undergoing in vitro differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(7):4526-4531. doi:10.1073/pnas.072065999
26. Parrish-Novak J, Dillon SR, Nelson A, et al. Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature*. 2000;408(6808):57-63. doi:10.1038/35040504
27. Freud AG, Becknell B, Roychowdhury S, et al. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells. *Immunity*. 2005;22(3):295-304. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.013
28. Res P, Martínez-Cáceres E, Cristina Jaleco A, et al. CD34+CD38dim cells in the human thymus can differentiate into T, natural killer, and dendritic cells but are distinct from pluripotent stem cells. *Blood*. 1996;87(12):5196-5206.
29. Moroso V, Famili F, Papazian N, et al. NK cells can generate from precursors in the adult human liver. *Eur J Immunol*. 2011;41(11):3340-3350. doi:10.1002/eji.201141760
30. Viant C, Fenis A, Chicanne G, et al. SHP-1-mediated inhibitory signals promote responsiveness and anti-tumour functions of natural killer cells. *Nat Commun*. 2014;5:5108. doi:10.1038/ncomms6108
31. Yusa SI, 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 Baltim Md 1950*. 2003;170(9):4539-4547. doi:10.4049/jimmunol.170.9.4539
32. Mahmood S, Kanwar N, Tran J, et al. SHP-1 phosphatase is a critical regulator in preventing natural killer cell self-killing. *PLoS One*. 2012;7(8):e44244. doi:10.1371/journal.pone.0044244
33. A T, E V, F R. NK cell MHC class I specific receptors (KIR): from biology to clinical intervention. *Curr Opin Immunol*. 2012;24(2). doi:10.1016/j.coi.2012.01.001
34. Bellora F, Castriconi R, Dondero A, et al. Human NK cells and NK receptors. *Immunol Lett*. 2014;161(2):168-173. doi:10.1016/j.imlet.2013.12.009
35. Li Y, Mariuzza RA. Structural basis for recognition of cellular and viral ligands by NK cell receptors. *Front Immunol*. 2014;5:123. doi:10.3389/fimmu.2014.00123
36. Shiroishi M, Tsumoto K, Amano K, 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 U S A*. 2003;100(15):8856-8861. doi:10.1073/pnas.1431057100
37. Kumar S. Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology*. 2018;154(3):383-393. doi:10.1111/imm.12921
38. Braud VM, Allan DS, O'Callaghan CA, et al. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*. 1998;391(6669):795-799. doi:10.1038/35869
39. Chen Y, Lu D, Churov A, et al. Research Progress on NK Cell Receptors and Their Signaling Pathways. *Mediators Inflamm*. 2020;2020:6437057. doi:10.1155/2020/6437057
40. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, et al. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(2):216-224. doi:10.1038/icb.2010.78
41. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, et al. Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol*. 2017;95(4):347-355. doi:10.1038/icb.2017.6
42. Lanier LL. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(6):575-582. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0098
43. Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, et al. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002;168(2):671-679. doi:10.4049/jimmunol.168.2.671
44. Eagle RA, Flack G, Warford A, et al. Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. *PLoS One*. 2009;4(2):e4503. doi:10.1371/journal.pone.0004503
45. Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, et al. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol*. 2009;39(11):3207-3216. doi:10.1002/eji.200939502
46. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, et al. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:413-441. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951
47. Molinero LL, Fuertes MB, Rabinovich GA, et al. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol*. 2002;71(5):791-797.

48. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, et al. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol.* 2013;78(2):120-129. doi:10.1111/sji.12072
49. Bottino C, Castriconi R, Pende D, 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(4):557-567. doi:10.1084/jem.20030788
50. Chan CJ, Smyth MJ, Martinet L. Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ.* 2014;21(1):5-14. doi:10.1038/cdd.2013.26
51. Barrow AD, Martin CJ, Colonna M. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol.* 2019;10:909. doi:10.3389/fimmu.2019.00909
52. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, et al. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Front Immunol.* 2014;5:105. doi:10.3389/fimmu.2014.00105
53. Adib-Conquy M, Scott-Algara D, Cavaillon JM, et al. TLR-mediated activation of NK cells and their role in bacterial/viral immune responses in mammals. *Immunol Cell Biol.* 2014;92(3):256-262. doi:10.1038/icb.2013.99
54. Loza MJ, Perussia B. The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;172(1):88-96. doi:10.4049/jimmunol.172.1.88
55. Lauwerys BR, Renaud JC, Houssiau FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine.* 1999;11(11):822-830. doi:10.1006/cyto.1999.0501
56. Vuletić AM, Jovanić IP, Jurišić VB, et al. In-vitro activation of natural killer cells from regional lymph nodes of melanoma patients with interleukin-2 and interleukin-15. *Melanoma Res.* 2015;25(1):22-34. doi:10.1097/CMR.0000000000000126
57. Dubois S, Mariner J, Waldmann TA, et al. IL-15Ralpha recycles and presents IL-15 In trans to neighboring cells. *Immunity.* 2002;17(5):537-547. doi:10.1016/s1074-7613(02)00429-6
58. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(12):1012-1021. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
59. Yazdi AS, Ghoreschi K. The Interleukin-1 Family. *Adv Exp Med Biol.* 2016;941:21-29. doi:10.1007/978-94-024-0921-5\_2
60. Novick D, Kim S, Kaplanski G, et al. Interleukin-18, more than a Th1 cytokine. *Semin Immunol.* 2013;25(6):439-448. doi:10.1016/j.smim.2013.10.014
61. Akira S. The role of IL-18 in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2000;12(1):59-63. doi:10.1016/s0952-7915(99)00051-5
62. Liu B, Mori I, Hossain MJ, et al. Interleukin-18 improves the early defence system against influenza virus infection by augmenting natural killer cell-mediated cytotoxicity. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 2):423-428. doi:10.1099/vir.0.19596-0
63. Hodge DL, Subleski JJ, Reynolds DA, et al. The proinflammatory cytokine interleukin-18 alters multiple signaling pathways to inhibit natural killer cell death. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res.* 2006;26(10):706-718. doi:10.1089/jir.2006.26.706
64. Dinarello CA, Novick D, Kim S, et al. Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Front Immunol.* 2013;4:289. doi:10.3389/fimmu.2013.00289

65. Fehniger TA, Shah MH, Turner MJ, et al. Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999;162(8):4511-4520.
66. Chaix J, Tessmer MS, Hoebe K, et al. Cutting edge: Priming of NK cells by IL-18. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181(3):1627-1631. doi:10.4049/jimmunol.181.3.1627
67. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(1):7-19. doi:10.1038/nrc.2015.5
68. Ljunggren HG, Kärre K. In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*. 1990;11(7):237-244. doi:10.1016/0167-5699(90)90097-s
69. Cantoni C, Grauwet K, Pietra G, et al. Role of NK cells in immunotherapy and virotherapy of solid tumors. *Immunotherapy*. 2015;7(8):861-882. doi:10.2217/imt.15.53
70. Mocikat R, Braumüller H, Gumy A, et al. Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*. 2003;19(4):561-569. doi:10.1016/s1074-7613(03)00264-4
71. Tosi D, Valenti R, Cova A, et al. Role of cross-talk between IFN-alpha-induced monocyte-derived dendritic cells and NK cells in priming CD8+ T cell responses against human tumor antigens. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;172(9):5363-5370. doi:10.4049/jimmunol.172.9.5363
72. Lodoen MB, Lanier LL. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2006;18(4):391-398. doi:10.1016/j.coi.2006.05.002
73. Pien GC, Satoskar AR, Takeda K, et al. Cutting edge: selective IL-18 requirements for induction of compartmental IFN-gamma responses during viral infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;165(9):4787-4791. doi:10.4049/jimmunol.165.9.4787
74. Schoenborn JR, Wilson CB. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*. 2007;96:41-101. doi:10.1016/S0065-2776(07)96002-2
75. Cooper MA, Fehniger TA, Ponnappan A, et al. Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *Eur J Immunol*. 2001;31(3):792-801. doi:10.1002/1521-4141(200103)31:3<792::aid-immu792>3.0.co;2-u
76. Strengell M, Matikainen S, Sirén J, et al. IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;170(11):5464-5469. doi:10.4049/jimmunol.170.11.5464
77. Matikainen S, Paananen A, Miettinen M, et al. IFN-alpha and IL-18 synergistically enhance IFN-gamma production in human NK cells: differential regulation of Stat4 activation and IFN-gamma gene expression by IFN-alpha and IL-12. *Eur J Immunol*. 2001;31(7):2236-2245.
78. Prager I, Watzl C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol*. 2019;105(6):1319-1329. doi:10.1002/JLB.MR0718-269R
79. Lieberman J. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(5):361-370. doi:10.1038/nri1083
80. Orange JS. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(9):713-725. doi:10.1038/nri2381

81. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004;294(1-2):15-22. doi:10.1016/j.jim.2004.08.008
82. Krzewski K, Gil-Krzewska A, Nguyen V, et al. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*. 2013;121(23):4672-4683. doi:10.1182/blood-2012-08-453738
83. Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med*. 1999;5(1):90-96. doi:10.1038/4779
84. Lee J, Dieckmann NMG, Edgar JR, et al. Fas Ligand localizes to intraluminal vesicles within NK cell cytolytic granules and is enriched at the immune synapse. *Immun Inflamm Dis*. 2018;6(2):312-321. doi:10.1002/iid3.219
85. Peter ME, Krammer PH. The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003;10(1):26-35. doi:10.1038/sj.cdd.4401186
86. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, et al. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*. 1995;182(6):1777-1783. doi:10.1084/jem.182.6.1777
87. Schneider P, Holler N, Bodmer JL, et al. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med*. 1998;187(8):1205-1213. doi:10.1084/jem.187.8.1205
88. Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med*. 2001;193(6):661-670. doi:10.1084/jem.193.6.661
89. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 1995;3(6):673-682. doi:10.1016/1074-7613(95)90057-8
90. von Karstedt S, Montinaro A, Walczak H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(6):352-366. doi:10.1038/nrc.2017.28
91. Stegelmeier AA, van Vloten JP, Mould RC, et al. Myeloid Cells during Viral Infections and Inflammation. *Viruses*. 2019;11(2):168. doi:10.3390/v11020168
92. Michel T, Hentges F, Zimmer J. Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front Immunol*. 2012;3:403. doi:10.3389/fimmu.2012.00403
93. Ferlazzo G, Morandi B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Front Immunol*. 2014;5:159. doi:10.3389/fimmu.2014.00159
94. Haller D, Serrant P, Granato D, et al. Activation of human NK cells by staphylococci and lactobacilli requires cell contact-dependent costimulation by autologous monocytes. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(3):649-657. doi:10.1128/cdli.9.3.649-657.2002
95. Dalbeth N, Gundle R, Davies RJO, et al. CD56bright NK cells are enriched at inflammatory sites and can engage with monocytes in a reciprocal program of activation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;173(10):6418-6426. doi:10.4049/jimmunol.173.10.6418
96. Coillard A, Segura E. In vivo Differentiation of Human Monocytes. *Front Immunol*. 2019;10:1907. doi:10.3389/fimmu.2019.01907

97. Narasimhan PB, Marcovecchio P, Hamers AAJ, et al. Nonclassical Monocytes in Health and Disease. *Annu Rev Immunol.* 2019;37:439-456. doi:10.1146/annurev-immunol-042617-053119
98. Kapellos TS, Bonaguro L, Gemünd I, et al. Human Monocyte Subsets and Phenotypes in Major Chronic Inflammatory Diseases. *Front Immunol.* 2019;10:2035. doi:10.3389/fimmu.2019.02035
99. De Kleer I, Willems F, Lambrecht B, et al. Ontogeny of myeloid cells. *Front Immunol.* 2014;5:423. doi:10.3389/fimmu.2014.00423
100. Bujko A, Atlasy N, Landsverk OJB, et al. Transcriptional and functional profiling defines human small intestinal macrophage subsets. *J Exp Med.* 2018;215(2):441-458. doi:10.1084/jem.20170057
101. Watchmaker PB, Lahl K, Lee M, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice. *Nat Immunol.* 2014;15(1):98-108. doi:10.1038/ni.2768
102. McGovern N, Schlitzer A, Gunawan M, et al. Human dermal CD14<sup>+</sup> cells are a transient population of monocyte-derived macrophages. *Immunity.* 2014;41(3):465-477. doi:10.1016/j.immuni.2014.08.006
103. Eguíluz-Gracia I, Schultz HHL, Sikkeland LIB, et al. Long-term persistence of human donor alveolar macrophages in lung transplant recipients. *Thorax.* 2016;71(11):1006-1011. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208292
104. Patel VI, Booth JL, Duggan ES, et al. Transcriptional Classification and Functional Characterization of Human Airway Macrophage and Dendritic Cell Subsets. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2017;198(3):1183-1201. doi:10.4049/jimmunol.1600777
105. MacParland SA, Liu JC, Ma XZ, et al. Single cell RNA sequencing of human liver reveals distinct intrahepatic macrophage populations. *Nat Commun.* 2018;9(1):4383. doi:10.1038/s41467-018-06318-7
106. Bajpai G, Schneider C, Wong N, et al. The human heart contains distinct macrophage subsets with divergent origins and functions. *Nat Med.* 2018;24(8):1234-1245. doi:10.1038/s41591-018-0059-x
107. Guilliams M, Mildner A, Yona S. Developmental and Functional Heterogeneity of Monocytes. *Immunity.* 2018;49(4):595-613. doi:10.1016/j.immuni.2018.10.005
108. Aminin D, Wang YM. Macrophages as a “weapon” in anticancer cellular immunotherapy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2021;37(9):749-758. doi:10.1002/kjm2.12405
109. Olingy CE, Dinh HQ, Hedrick CC. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J Leukoc Biol.* 2019;106(2):309-322. doi:10.1002/JLB.4RI0818-311R
110. Goldszmid RS, Caspar P, Rivollier A, et al. NK cell-derived interferon- $\gamma$  orchestrates cellular dynamics and the differentiation of monocytes into dendritic cells at the site of infection. *Immunity.* 2012;36(6):1047-1059. doi:10.1016/j.immuni.2012.03.026
111. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, et al. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med.* 2002;195(3):327-333. doi:10.1084/jem.20010938

112. Piccioli D, Sbrana S, Melandri E, et al. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med*. 2002;195(3):335-341. doi:10.1084/jem.20010934
113. Barreira da Silva R, Münz C. Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2011;68(21):3505-3518. doi:10.1007/s00018-011-0801-8
114. Della Chiesa M, Sivori S, Castriconi R, et al. Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends Microbiol*. 2005;13(3):128-136. doi:10.1016/j.tim.2005.01.006
115. Pallmer K, Oxenius A. Recognition and Regulation of T Cells by NK Cells. *Front Immunol*. 2016;7:251. doi:10.3389/fimmu.2016.00251
116. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, et al. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood*. 2007;109(9):3776-3785. doi:10.1182/blood-2006-10-052977
117. Bellora F, Castriconi R, Dondero 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(50):21659-21664. doi:10.1073/pnas.1007654108
118. Crouse J, Xu HC, Lang PA, et al. NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends Immunol*. 2015;36(1):49-58. doi:10.1016/j.it.2014.11.001
119. Cook KD, Whitmire JK. The depletion of NK cells prevents T cell exhaustion to efficiently control disseminating virus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;190(2):641-649. doi:10.4049/jimmunol.1202448
120. Schuster IS, Wikstrom ME, Brizard G, et al. TRAIL+ NK cells control CD4+ T cell responses during chronic viral infection to limit autoimmunity. *Immunity*. 2014;41(4):646-656. doi:10.1016/j.immuni.2014.09.013
121. Lang PA, Lang KS, Xu HC, et al. Natural killer cell activation enhances immune pathology and promotes chronic infection by limiting CD8+ T-cell immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(4):1210-1215. doi:10.1073/pnas.1118834109
122. Waggoner SN, Taniguchi RT, Mathew PA, et al. Absence of mouse 2B4 promotes NK cell-mediated killing of activated CD8+ T cells, leading to prolonged viral persistence and altered pathogenesis. *J Clin Invest*. 2010;120(6):1925-1938. doi:10.1172/JCI41264
123. Laffont S, Seillet C, Ortaldo J, et al. Natural killer cells recruited into lymph nodes inhibit alloreactive T-cell activation through perforin-mediated killing of donor allogeneic dendritic cells. *Blood*. 2008;112(3):661-671. doi:10.1182/blood-2007-10-120089
124. Ehlers M, Papewalis C, Stenzel W, et al. Immunoregulatory natural killer cells suppress autoimmunity by down-regulating antigen-specific CD8+ T cells in mice. *Endocrinology*. 2012;153(9):4367-4379. doi:10.1210/en.2012-1247
125. Lee SH, Kim KS, Fodil-Cornu N, et al. Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med*. 2009;206(10):2235-2251. doi:10.1084/jem.20082387
126. Andrews DM, Estcourt MJ, Andoniou CE, et al. Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med*. 2010;207(6):1333-1343. doi:10.1084/jem.20091193



127. Hayakawa Y, Screpanti V, Yagita H, et al. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;172(1):123-129. doi:10.4049/jimmunol.172.1.123
128. Peppas D, Gill US, Reynolds G, et al. Up-regulation of a death receptor renders antiviral T cells susceptible to NK cell-mediated deletion. *J Exp Med*. 2013;210(1):99-114. doi:10.1084/jem.20121172
129. Deniz G, Erten G, Küçüksezer UC, et al. Regulatory NK cells suppress antigen-specific T cell responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180(2):850-857. doi:10.4049/jimmunol.180.2.850
130. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, et al. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood*. 2007;110(2):606-615. doi:10.1182/blood-2006-10-052720
131. Fogel LA, Yokoyama WM, French AR. Natural killer cells in human autoimmune disorders. *Arthritis Res Ther*. 2013;15(4):216. doi:10.1186/ar4232
132. Iyori M, Zhang T, Pantel H, et al. TRAIL/DR5 plays a critical role in NK cell-mediated negative regulation of dendritic cell cross-priming of T cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;187(6):3087-3095. doi:10.4049/jimmunol.1003879
133. Soderquest K, Walzer T, Zafirova B, et al. Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186(6):3304-3308. doi:10.4049/jimmunol.1004122
134. Neo SY, Yang Y, Record J, et al. CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment. *J Clin Invest*. 2020;130(3):1185-1198. doi:10.1172/JCI128895
135. Picard E, Godet Y, Laheurte C, et al. Circulating NKp46+ Natural Killer cells have a potential regulatory property and predict distinct survival in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncoimmunology*. 2019;8(2):e1527498. doi:10.1080/2162402X.2018.1527498
136. Iraolagoitia XLR, Spallanzani RG, Torres NI, et al. NK Cells Restrain Spontaneous Antitumor CD8+ T Cell Priming through PD-1/PD-L1 Interactions with Dendritic Cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2016;197(3):953-961. doi:10.4049/jimmunol.1502291
137. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, et al. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010;29(8):1093-1102. doi:10.1038/onc.2009.416
138. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. 2010;140(6):883-899. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025
139. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-1570. doi:10.1126/science.1203486
140. Sprangers B, Nair V, Launay-Vacher V, et al. Risk factors associated with post-kidney transplant malignancies: an article from the Cancer-Kidney International Network. *Clin Kidney J*. 2018;11(3):315-329. doi:10.1093/ckj/sfx122
141. Mayor PC, Eng KH, Singel KL, et al. Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry. *J Allergy Clin Immunol*. 2018;141(3):1028-1035. doi:10.1016/j.jaci.2017.05.024

142. Mbulaiteye SM, Biggar RJ, Goedert JJ, et al. Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999. 2003;32(5):527-533. doi:10.1097/00126334-200304150-00010
143. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 2007;450(7171):903-907. doi:10.1038/nature06309
144. O'Donnell JS, Teng MWL, Smyth MJ. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2019;16(3):151-167. doi:10.1038/s41571-018-0142-8
145. Beatty GL, Gladney WL. Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2015;21(4):687-692. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1860
146. Muenst S, Soysal SD, Tzankov A, et al. The PD-1/PD-L1 pathway: biological background and clinical relevance of an emerging treatment target in immunotherapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(2):201-211. doi:10.1517/14728222.2014.980235
147. Baumeister SH, Freeman GJ, Dranoff G, et al. Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. *Annu Rev Immunol*. 2016;34:539-573. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112049
148. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev*. 2010;236:219-242. doi:10.1111/j.1600-065X.2010.00923.x
149. Bai J, Gao Z, Li X, et al. Regulation of PD-1/PD-L1 pathway and resistance to PD-1/PD-L1 blockade. *Oncotarget*. 2017;8(66):110693-110707. doi:10.18632/oncotarget.22690
150. Qin W, Hu L, Zhang X, et al. The Diverse Function of PD-1/PD-L Pathway Beyond Cancer. *Front Immunol*. 2019;10:2298. doi:10.3389/fimmu.2019.02298
151. Okazaki T, Chikuma S, Iwai Y, et al. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat Immunol*. 2013;14(12):1212-1218. doi:10.1038/ni.2762
152. Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, et al. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol*. 2008;26:677-704. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090331
153. Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity*. 2018;48(3):434-452. doi:10.1016/j.immuni.2018.03.014
154. Wu X, Ke X, Ni Y, et al. Tumor-Infiltrating Immune Cells and PD-L1 as Prognostic Biomarkers in Primary Esophageal Small Cell Carcinoma. *J Immunol Res*. 2020;2020:8884683. doi:10.1155/2020/8884683
155. Sumitomo R, Hirai T, Fujita M, et al. PD-L1 expression on tumor-infiltrating immune cells is highly associated with M2 TAM and aggressive malignant potential in patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer Amst Neth*. 2019;136:136-144. doi:10.1016/j.lungcan.2019.08.023
156. Evangelou Z, Papoudou-Bai A, Karpathiou G, et al. PD-L1 Expression and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer: Clinicopathological Analysis in Women Younger than 40 Years Old. *Vivo Athens Greece*. 2020;34(2):639-647. doi:10.21873/invivo.11818
157. Tang Q, Chen Y, Li X, et al. The role of PD-1/PD-L1 and application of immune-checkpoint inhibitors in human cancers. *Front Immunol*. 2022;13:964442. doi:10.3389/fimmu.2022.964442

158. Ghebeh H, Tulbah A, Mohammed S, et al. Expression of B7-H1 in breast cancer patients is strongly associated with high proliferative Ki-67-expressing tumor cells. *Int J Cancer*. 2007;121(4):751-758. doi:10.1002/ijc.22703
159. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell*. 2015;27(4):450-461. doi:10.1016/j.ccell.2015.03.001
160. Krempski J, Karyampudi L, Behrens MD, et al. Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186(12):6905-6913. doi:10.4049/jimmunol.1100274
161. Park SJ, Namkoong H, Doh J, et al. Negative role of inducible PD-1 on survival of activated dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2014;95(4):621-629. doi:10.1189/jlb.0813443
162. Pesce S, Greppi M, Tabellini G, 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(1):335-346.e3. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.025
163. Vari F, Arpon D, Keane C, et al. Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood*. 2018;131(16):1809-1819. doi:10.1182/blood-2017-07-796342
164. Beldi-Ferchiou A, Lambert M, Dogniaux S, et al. PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*. 2016;7(45):72961-72977. doi:10.18632/oncotarget.12150
165. Atefi M, Avramis E, Lassen A, et al. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014;20(13):3446-3457. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-2797
166. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2007;13(1):84-88. doi:10.1038/nm1517
167. Kinter AL, Godbout EJ, McNally JP, et al. The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181(10):6738-6746. doi:10.4049/jimmunol.181.10.6738
168. Carbotti G, Barisione G, Airoidi I, et al. IL-27 induces the expression of IDO and PD-L1 in human cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(41):43267-43280. doi:10.18632/oncotarget.6530
169. Gato-Cañas M, Zuazo M, Arasanz H, et al. PDL1 Signals through Conserved Sequence Motifs to Overcome Interferon-Mediated Cytotoxicity. *Cell Rep*. 2017;20(8):1818-1829. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.075
170. Wojtukiewicz MZ, Rek MM, Karpowicz K, et al. Inhibitors of immune checkpoints-PD-1, PD-L1, CTLA-4-new opportunities for cancer patients and a new challenge for internists and general practitioners. *Cancer Metastasis Rev*. 2021;40(3):949-982. doi:10.1007/s10555-021-09976-0
171. Kythreotou A, Siddique A, Mauri FA, et al. PD-L1. *J Clin Pathol*. 2018;71(3):189-194. doi:10.1136/jclinpath-2017-204853
172. Lee JB, Ha SJ, Kim HR. Clinical Insights Into Novel Immune Checkpoint Inhibitors. *Front Pharmacol*. 2021;12:681320. doi:10.3389/fphar.2021.681320

173. Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, et al. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*. 2011;332(6029):600-603. doi:10.1126/science.1202947
174. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):252-264. doi:10.1038/nrc3239
175. Vaddepally RK, Kharel P, Pandey R, et al. Review of Indications of FDA-Approved Immune Checkpoint Inhibitors per NCCN Guidelines with the Level of Evidence. *Cancers*. 2020;12(3):738. doi:10.3390/cancers12030738
176. Jiang Y, Zhao X, Fu J, et al. Progress and Challenges in Precise Treatment of Tumors With PD-1/PD-L1 Blockade. *Front Immunol*. 2020;11:339. doi:10.3389/fimmu.2020.00339
177. Davis AA, Patel VG. The role of PD-L1 expression as a predictive biomarker: an analysis of all US Food and Drug Administration (FDA) approvals of immune checkpoint inhibitors. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):278. doi:10.1186/s40425-019-0768-9
178. Wang X, Teng F, Kong L, et al. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets Ther*. 2016;9:5023-5039. doi:10.2147/OTT.S105862
179. Teng MWL, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. *Cancer Res*. 2015;75(11):2139-2145. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-0255
180. Powles T, Eder JP, Fine GD, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014;515(7528):558-562. doi:10.1038/nature13904
181. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014;515(7528):563-567. doi:10.1038/nature14011
182. Capitanio U, Bensalah K, Bex A, et al. Epidemiology of Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol*. 2019;75(1):74-84. doi:10.1016/j.eururo.2018.08.036
183. Warren AY, Harrison D. WHO/ISUP classification, grading and pathological staging of renal cell carcinoma: standards and controversies. *World J Urol*. 2018;36(12):1913-1926. doi:10.1007/s00345-018-2447-8
184. Tan MH, Wong CF, Tan HL, et al. Genomic expression and single-nucleotide polymorphism profiling discriminates chromophobe renal cell carcinoma and oncocytoma. *BMC Cancer*. 2010;10:196. doi:10.1186/1471-2407-10-196
185. Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM. Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 1996;335(12):865-875. doi:10.1056/NEJM199609193351207
186. Ricketts CJ, De Cubas AA, Fan H, et al. The Cancer Genome Atlas Comprehensive Molecular Characterization of Renal Cell Carcinoma. *Cell Rep*. 2018;23(1):313-326.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.075
187. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell*. 2017;169(4):736-749.e18. doi:10.1016/j.cell.2017.04.016
188. Wong MCS, Goggins WB, Yip BHK, et al. Incidence and mortality of kidney cancer: temporal patterns and global trends in 39 countries. *Sci Rep*. 2017;7(1):15698. doi:10.1038/s41598-017-15922-4

189. Capitanio U, Montorsi F. Renal cancer. *Lancet Lond Engl.* 2016;387(10021):894-906. doi:10.1016/S0140-6736(15)00046-X
190. Garcia JA, Cowey CL, Godley PA. Renal cell carcinoma. *Curr Opin Oncol.* 2009;21(3):266-271. doi:10.1097/CCO.0b013e32832a05c8
191. Nielsen OH, Grimm D, Wehland M, et al. Anti-Angiogenic Drugs in the Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma: Advances in Clinical Application. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(3):381-391. doi:10.2174/1570161112666140219112130
192. Sánchez-Gastaldo A, Kempf E, González Del Alba A, et al. Systemic treatment of renal cell cancer: A comprehensive review. *Cancer Treat Rev.* 2017;60:77-89. doi:10.1016/j.ctrv.2017.08.010
193. Xu W, Atkins MB, McDermott DF. Checkpoint inhibitor immunotherapy in kidney cancer. *Nat Rev Urol.* 2020;17(3):137-150. doi:10.1038/s41585-020-0282-3
194. Posadas EM, Limvorasak S, Figlin RA. Targeted therapies for renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol.* 2017;13(8):496-511. doi:10.1038/nrneph.2017.82
195. Yang JC, Hughes M, Kammula U, et al. Ipilimumab (anti-CTLA4 antibody) causes regression of metastatic renal cell cancer associated with enteritis and hypophysitis. *J Immunother Hagerstown Md* 1997. 2007;30(8):825-830. doi:10.1097/CJI.0b013e318156e47e
196. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med.* 2012;366(26):2443-2454. doi:10.1056/NEJMoa1200690
197. Powles T, Tomczak P, Park SH, et al. Pembrolizumab versus placebo as post-nephrectomy adjuvant therapy for clear cell renal cell carcinoma (KEYNOTE-564): 30-month follow-up analysis of a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2022;23(9):1133-1144. doi:10.1016/S1470-2045(22)00487-9
198. McDermott DF, Sosman JA, Sznol M, et al. Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2016;34(8):833-842. doi:10.1200/JCO.2015.63.7421
199. McDermott DF, Huseni MA, Atkins MB, et al. Clinical activity and molecular correlates of response to atezolizumab alone or in combination with bevacizumab versus sunitinib in renal cell carcinoma. *Nat Med.* 2018;24(6):749-757. doi:10.1038/s41591-018-0053-3
200. Rini BI, Powles T, Atkins MB, et al. Atezolizumab plus bevacizumab versus sunitinib in patients with previously untreated metastatic renal cell carcinoma (IMmotion151): a multicentre, open-label, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl.* 2019;393(10189):2404-2415. doi:10.1016/S0140-6736(19)30723-8
201. Motzer RJ, Tannir NM, McDermott DF, et al. Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2018;378(14):1277-1290. doi:10.1056/NEJMoa1712126
202. Rini BI, Plimack ER, Stus V, et al. Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(12):1116-1127. doi:10.1056/NEJMoa1816714

203. Motzer RJ, Penkov K, Haanen J, et al. Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2019;380(12):1103-1115. doi:10.1056/NEJMoa1816047
204. Choueiri TK, Powles T, Burotto M, et al. Nivolumab plus Cabozantinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(9):829-841. doi:10.1056/NEJMoa2026982
205. Motzer R, Alekseev B, Rha SY, et al. Lenvatinib plus Pembrolizumab or Everolimus for Advanced Renal Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2021;384(14):1289-1300. doi:10.1056/NEJMoa2035716
206. Motzer RJ, Escudier B, McDermott DF, et al. Nivolumab versus Everolimus in Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2015;373(19):1803-1813. doi:10.1056/NEJMoa1510665
207. Díaz-Montero CM, Rini BI, Finke JH. The immunology of renal cell carcinoma. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(12):721-735. doi:10.1038/s41581-020-0316-3
208. Kazama A, Bilim V, Tasaki M, et al. Tumor-infiltrating immune cell status predicts successful response to immune checkpoint inhibitors in renal cell carcinoma. *Sci Rep.* 2022;12(1):20386. doi:10.1038/s41598-022-24437-6
209. Schmidinger M. Clinical decision-making for immunotherapy in metastatic renal cell carcinoma. *Curr Opin Urol.* 2018;28(1):29-34. doi:10.1097/MOU.0000000000000456
210. Cózar B, Greppi M, Carpentier S, et al. Tumor-Infiltrating Natural Killer Cells. *Cancer Discov.* 2021;11(1):34-44. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0655
211. Huntington ND, Cursons J, Rautela J. The cancer-natural killer cell immunity cycle. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(8):437-454. doi:10.1038/s41568-020-0272-z
212. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, et al. Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol.* 2014;44(6):1582-1592. doi:10.1002/eji.201344272
213. Pasero C, Gravis G, Guerin M, et al. Inherent and Tumor-Driven Immune Tolerance in the Prostate Microenvironment Impairs Natural Killer Cell Antitumor Activity. *Cancer Res.* 2016;76(8):2153-2165. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-1965
214. Xia Y, Zhang Q, Zhen Q, et al. Negative regulation of tumor-infiltrating NK cell in clear cell renal cell carcinoma patients through the exosomal pathway. *Oncotarget.* 2017;8(23):37783-37795. doi:10.18632/oncotarget.16354
215. Lim SA, Kim J, Jeon S, et al. Defective Localization With Impaired Tumor Cytotoxicity Contributes to the Immune Escape of NK Cells in Pancreatic Cancer Patients. *Front Immunol.* 2019;10:496. doi:10.3389/fimmu.2019.00496
216. Ziblat A, Iraolagoitia XLR, Nuñez SY, et al. Circulating and Tumor-Infiltrating NK Cells From Clear Cell Renal Cell Carcinoma Patients Exhibit a Predominantly Inhibitory Phenotype Characterized by Overexpression of CD85j, CD45, CD48 and PD-1. *Front Immunol.* 2021;12:681615. doi:10.3389/fimmu.2021.681615
217. Secchiari F, Nuñez SY, Sierra JM, et al. The MICA-NKG2D axis in clear cell renal cell carcinoma bolsters MICA as target in immuno-oncology. *Oncoimmunology.* 2022;11(1):2104991. doi:10.1080/2162402X.2022.2104991
218. Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(W1):W98-W102. doi:10.1093/nar/gkx247

219. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity*. 2013;39(4):782-795. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.003
220. Böttcher JP, Bonavita E, Chakravarty P, et al. NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell*. 2018;172(5):1022-1037.e14. doi:10.1016/j.cell.2018.01.004
221. Eberlein J, Nguyen TT, Victorino F, et al. Comprehensive assessment of chemokine expression profiles by flow cytometry. *J Clin Invest*. 2010;120(3):907-923. doi:10.1172/JCI40645
222. Cursors J, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Foroutan M, et al. A Gene Signature Predicting Natural Killer Cell Infiltration and Improved Survival in Melanoma Patients. *Cancer Immunol Res*. 2019;7(7):1162-1174. doi:10.1158/2326-6066.CIR-18-0500
223. Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, et al. Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection. *Nat Commun*. 2017;8:15165. doi:10.1038/ncomms15165
224. Bae DS, Hwang YK, Lee JK. Importance of NKG2D-NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cell Immunol*. 2012;276(1-2):122-127. doi:10.1016/j.cellimm.2012.04.011
225. Schleypen JS, Von Geldern M, Weiss EH, et al. Renal cell carcinoma-infiltrating natural killer cells express differential repertoires of activating and inhibitory receptors and are inhibited by specific HLA class I allotypes. *Int J Cancer*. 2003;106(6):905-912. doi:10.1002/ijc.11321
226. Wang Z, Peng S, Xie H, et al. Prognostic and clinicopathological significance of PD-L1 in patients with renal cell carcinoma: a meta-analysis based on 1863 individuals. *Clin Exp Med*. 2018;18(2):165-175. doi:10.1007/s10238-018-0488-3
227. Mikami S, Mizuno R, Kondo T, et al. Clinical significance of programmed death-1 and programmed death-ligand 1 expression in the tumor microenvironment of clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2019;110(6):1820-1828. doi:10.1111/cas.14019
228. Hasim MS, Marotel M, Hodgins JJ, et al. When killers become thieves: Trogocytosed PD-1 inhibits NK cells in cancer. *Sci Adv*. 2022;8(15):eabj3286. doi:10.1126/sciadv.abj3286
229. Reed J, Reichelt M, Wetzel SA. Lymphocytes and Trogocytosis-Mediated Signaling. *Cells*. 2021;10(6):1478. doi:10.3390/cells10061478
230. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, et al. Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2016;22(10):2329-2334. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-0224
231. Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, et al. Mechanisms regulating PD-L1 expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):305. doi:10.1186/s40425-019-0770-2
232. Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2004;64(3):1140-1145. doi:10.1158/0008-5472.can-03-3259
233. Sherratt S, Patel A, Baker DA, et al. Differential IL-18 Dependence of Canonical and Adaptive NK Cells for Antibody Dependent Responses to *P. falciparum*. *Front Immunol*. 2020;11:533. doi:10.3389/fimmu.2020.00533

234. Dinarello CA. Interleukin-18, a proinflammatory cytokine. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(3):483-486.
235. Wong JL, Berk E, Edwards RP, et al. IL-18-primed helper NK cells collaborate with dendritic cells to promote recruitment of effector CD8+ T cells to the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 2013;73(15):4653-4662. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4366
236. Lee SR, Park YK, Shin BA, et al. Effects of tumor vaccine expressing Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor and interleukin-18 fusion on cancer cells and its possible application for cancer immunotherapy. *Cytokine.* 2017;89:143-154. doi:10.1016/j.cyto.2016.01.009
237. Alagkiozidis I, Facciabene A, Carpenito C, et al. Increased immunogenicity of surviving tumor cells enables cooperation between liposomal doxorubicin and IL-18. *J Transl Med.* 2009;7:104. doi:10.1186/1479-5876-7-104
238. Park S, Cheon S, Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell Mol Immunol.* 2007;4(5):329-335.
239. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, et al. IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* 2011;71(16):5393-5399. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-0993
240. Vidal-Vanaclocha F, Mendoza L, Telleria N, et al. Clinical and experimental approaches to the pathophysiology of interleukin-18 in cancer progression. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):417-434. doi:10.1007/s10555-006-9013-3
241. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol.* 2013;14(6):e218-228. doi:10.1016/S1470-2045(12)70582-X
242. Dinarello CA. The paradox of pro-inflammatory cytokines in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2006;25(3):307-313. doi:10.1007/s10555-006-9000-8
243. Xu L, Zhu Y, An H, et al. Clinical significance of tumor-derived IL-1 $\beta$  and IL-18 in localized renal cell carcinoma: Associations with recurrence and survival. *Urol Oncol.* 2015;33(2):68.e9-16. doi:10.1016/j.urolonc.2014.08.008
244. de Zoete MR, Palm NW, Zhu S, et al. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(12):a016287. doi:10.1101/cshperspect.a016287
245. Minute L, Teijeira A, Sanchez-Paulete AR, et al. Cellular cytotoxicity is a form of immunogenic cell death. *J Immunother Cancer.* 2020;8(1):e000325. doi:10.1136/jitc-2019-000325
246. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* 2009;15(10):1170-1178. doi:10.1038/nm.2028
247. Adinolfi E, Giuliani AL, De Marchi E, et al. The P2X7 receptor: A main player in inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2018;151:234-244. doi:10.1016/j.bcp.2017.12.021
248. Birgisdottir ÅB, Johansen T. Autophagy and endocytosis - interconnections and interdependencies. *J Cell Sci.* 2020;133(10):jcs228114. doi:10.1242/jcs.228114
249. Lai HJ, Hsu YH, Lee GY, et al. Microtubule-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Independent of Microtubule-Associated Innate Immune Factor GEF-H1 in Murine Macrophages. *Int J Mol Sci.* 2020;21(4):1302. doi:10.3390/ijms21041302



250. Steidl C, Lee T, Shah SP, et al. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med*. 2010;362(10):875-885. doi:10.1056/NEJMoa0905680
251. Nishie A, Ono M, Shono T, et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1999;5(5):1107-1113.
252. Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res*. 1996;56(20):4625-4629.
253. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2009;27(20):3330-3337. doi:10.1200/JCO.2008.19.9919
254. Fujimoto J, Sakaguchi H, Aoki I, et al. Clinical implications of expression of interleukin 8 related to angiogenesis in uterine cervical cancers. *Cancer Res*. 2000;60(10):2632-2635.
255. Komohara Y, Hasita H, Ohnishi K, et al. Macrophage infiltration and its prognostic relevance in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2011;102(7):1424-1431. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01945.x
256. Ostrand-Rosenberg S, Horn LA, Haile ST. The programmed death-1 immune-suppressive pathway: barrier to antitumor immunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2014;193(8):3835-3841. doi:10.4049/jimmunol.1401572
257. Lau J, Cheung J, Navarro A, et al. Tumour and host cell PD-L1 is required to mediate suppression of anti-tumour immunity in mice. *Nat Commun*. 2017;8:14572. doi:10.1038/ncomms14572
258. Noguchi T, Ward JP, Gubin MM, et al. Temporally Distinct PD-L1 Expression by Tumor and Host Cells Contributes to Immune Escape. *Cancer Immunol Res*. 2017;5(2):106-117. doi:10.1158/2326-6066.CIR-16-0391
259. Tang H, Liang Y, Anders RA, et al. PD-L1 on host cells is essential for PD-L1 blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*. 2018;128(2):580-588. doi:10.1172/JCI96061
260. Lin H, Wei S, Hurt EM, et al. Host expression of PD-L1 determines efficacy of PD-L1 pathway blockade-mediated tumor regression. *J Clin Invest*. 2018;128(2):805-815. doi:10.1172/JCI96113
261. Kleinovink JW, Marijt KA, Schoonderwoerd MJA, et al. PD-L1 expression on malignant cells is no prerequisite for checkpoint therapy. *Oncoimmunology*. 2017;6(4):e1294299. doi:10.1080/2162402X.2017.1294299
262. Dong W, Wu X, Ma S, et al. The Mechanism of Anti-PD-L1 Antibody Efficacy against PD-L1-Negative Tumors Identifies NK Cells Expressing PD-L1 as a Cytolytic Effector. *Cancer Discov*. 2019;9(10):1422-1437. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1259
263. Zhou J, Peng H, Li K, et al. Liver-Resident NK Cells Control Antiviral Activity of Hepatic T Cells via the PD-1-PD-L1 Axis. *Immunity*. 2019;50(2):403-417.e4. doi:10.1016/j.immuni.2018.12.024
264. Diniz MO, Schurich A, Chinnakannan SK, et al. NK cells limit therapeutic vaccine-induced CD8+T cell immunity in a PD-L1-dependent manner. *Sci Transl Med*. 2022;14(640):eabi4670. doi:10.1126/scitranslmed.abi4670

265. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer*. 2020;20(11):662-680. doi:10.1038/s41568-020-0285-7
266. Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*. 2001;61(13):5132-5136.