



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en
Bioquímica Clínica e Inmunología
(CIBICI-CONICET)

Licenciado en Biología Molecular
Fernando Pablo Canale

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas
***Estudio fenotípico y funcional de linfocitos T CD8⁺ CD39⁺ en el
contexto de la respuesta inmune antitumoral.***

Directora de Tesis: Dra. Carolina Lucía Montes

Córdoba, Argentina

2018

Comisión Evaluadora:

Dra. Alicia Torres

Dr. Víctor Gabriel Morón

Dr. Germán A. Gil

Evaluadora Externa:

Dra. Roxana Schillaci

Este trabajo de tesis fue realizado gracias al apoyo económico del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Secretaría de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT-FonCyT) y el Instituto Nacional del Cáncer del Ministerio de Salud de la Nación (INC).

Abreviaturas	1
Listado de gráficos y tablas	4
Resumen	7
<i>Abstract</i>	9
INTRODUCCIÓN	11
1. EL CÁNCER	
1.1 El cáncer: un conjunto de enfermedades relacionadas.....	13
1.2 Características distintivas de las células cancerígenas	14
1.3 Fenómenos que favorecen la adquisición de las características distintivas del cáncer: inestabilidad genómica e inflamación asociada al tumor.....	15
1.4 Una característica emergente del cáncer: evasión de la respuesta inmune.....	16
2. LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL CÁNCER	
2.1 Respuesta inmune antitumoral: la teoría de la inmunoedición del cáncer.....	17
2.2 El microambiente tumoral durante la fase de escape	20
2.3 Funciones antitumorales de la inmunidad innata	21
2.4 La destrucción de la célula tumoral: el rol de las células dendríticas y los LiTCD8 ⁺	22
2.5 Diferenciación de LiTCD8 ⁺ a células efectoras y de memoria.....	24
2.6 Funciones antitumorales de otras células del sistema inmune adaptativo: LiTCD4 ⁺ y LiB.....	26
3. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER	
3.1 Mecanismos generales de la evasión de la respuesta inmune en cáncer	27
3.2 Reclutamiento y expansión de poblaciones celulares inmunosupresoras	27
3.3 Producción de citoquinas y otras moléculas solubles inmunoregulatorias	28
3.4 Disfuncionalidad de LiT: rol central del agotamiento en la fase de Escape	29
3.5 Expresión de enzimas inmunoregulatorias: modulación de señales purinérgicas por CD39 y CD73	33
3.6 Expresión de CD39 en LiTCD8 ⁺	38
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	41
RESULTADOS	45
1. Expresión de ectoenzimas inmunoregulatorias en LiTCD8 ⁺ en el contexto de la respuesta inmune antitumoral.....	47

1.1 Estudio de la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8 ⁺ en modelos experimentales murinos de cáncer.....	47
1.2 Estudio de la expresión de ectoenzimas en LiTCD8 ⁺ obtenidos de órganos linfoides de ratones normales o inyectados con líneas tumorales	51
1.3 Subpoblaciones de LiTCD8 ⁺ intratumorales definidas por la expresión de CD39 y su dinámica durante la progresión tumoral.....	52
1.4 Expresión de CD39 en distintas poblaciones de leucocitos infiltrantes de tumores murinos	54
1.5 Estado de activación y diferenciación de LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ en modelos experimentales murinos de cáncer.....	60
1.6 Rol de la activación específica de antígeno en la generación de LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ intratumorales	64
Conclusiones parciales 1.....	67
2. Estado funcional de LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ en el contexto de la respuesta inmune antitumoral	68
2.1 Producción de citoquinas proinflamatorias, potencial citotóxico y capacidad proliferativa	68
2.2 Estado de activación de vías de señalización involucradas en la regulación del metabolismo.....	72
2.3 Expresión de receptores inhibitorios.....	74
2.4 Expresión de factores de transcripción asociados a células efectoras y agotadas	77
2.5 Evaluación de CD39 como marcador de LiTCD8 ⁺ exhaustos en el microambiente tumoral.....	78
Conclusiones parciales 2.....	80
3. Rol regulatorio de CD39 en LiTCD8 ⁺ infiltrantes de tumores	81
3.1 Actividad enzimática de CD39 expresado por LiTCD8 ⁺ infiltrantes de tumores ..	81
3.2 Rol regulatorio de LiTCD8 ⁺ CD39 ^{high} sobre la proliferación y producción de citoquinas de LiTCD8 ⁺ respondedores	83
Conclusiones parciales 3.....	86
4. LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ en tumores y ganglios linfáticos metastásicos de pacientes con cáncer	87
4.1 Expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8 ⁺ en tumores primarios, ganglios drenantes y sangre periférica de pacientes con cáncer.....	87
4.2 Estado de diferenciación y expresión de receptores inhibitorios asociados a agotamiento en LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de pacientes con cáncer.....	90

4.3 Producción de citoquinas proinflamatorias y potencial citotóxico	94
Conclusiones parciales 4.....	96
5. Factores y señales involucradas en la inducción de CD39 en LiTCD8 ⁺	97
5.1 Inducción de CD39 en LiTCD8 ⁺ por citoquinas involucradas en la generación de LiT exhaustos.....	97
5.2 Rol de la hipoxia como inductora de la expresión de CD39 en LiTCD8 ⁺ en el microambiente tumoral.....	103
Conclusiones parciales 5.....	106
DISCUSIÓN	107
MATERIALES Y MÉTODOS	125
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	151

AAT: antígenos asociados a tumores.

ADA: adenosina deaminasa.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADP: adenosina bifosfato

AET: antígenos específicos de tumores.

AhR: del inglés, *Aryl hydrocarbon receptor* (Receptor de hidrocarburos de arilo).

AMP: adenosina monofosfato

AMPK: del inglés: *AMP-activated Kinase* (Quinasa activada por AMP).

ANOVA: del inglés: *Analysis of Variance* (Análisis de la varianza).

ATP: adenosina trifosfato.

ATPe: ATP extracelular.

BATF: del inglés, *Basic leucine zipper ATF-like transcription factor* (Factor de transcripción de cremallera de leucinas básico tipo ATF).

Bcl-2: del inglés, *B-cell lymphoma 2* (Linfoma de células B 2).

BCR: del inglés, *B-cell receptor* (Receptor de las células B).

Blimp-1: del inglés, *B lymphocyte-induced maturation protein-1* (Proteína de maduración inducida por linfocitos B 1).

Bref A: brefeldina A.

BTLA: del inglés, *B- and T-lymphocyte Attenuator* (Atenuador de linfocitos B y T).

CAR: del inglés, *Chimeric antigen receptor* (Receptor de antígeno quimérico).

CD: del inglés, *Cluster of Differentiation* (Grupo de diferenciación).

CEACAM-1: del inglés, *Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1* (Molécula de adhesión celular relacionada al antígeno carcinoembriónico 1).

CF: citometría de flujo.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

Conv: convencional.

CSM: célula supresora mieloide.

DAMP: del inglés, *Danger-associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados al peligro).

DAPI: del inglés, *4',6-diamidino-2-phenylindole* (4',6-diamidino-2-fenilindol).

DNAM-1: del inglés, *DNAX accessory molecule 1* (Molécula accesoria DNAX 1).

EEC: del inglés, *Early effector cells* (Células efectoras tempranas).

EEM: error estándar de la media.

Egr2: del inglés, *Early growth response protein 2* (Proteína de respuesta al crecimiento temprano 2).

ENTDP1: *ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1*.

Eomes: *Eomesodermin*.

EpCAM: del inglés, *Epithelial Cell Adhesion Molecule* (Molécula de adhesión celular epitelial).

FasL: del inglés, *Fas Ligand* (Ligando de Fas).

Foxp3: del inglés, *Forkhead box P3*.

GD: ganglio linfático drenante.

h: horas.

H-1: *hypoxyprome-1*

Hi: del inglés, *High* (alta).

HIF-1 α : del inglés, *Hypoxia-inducible Factor 1 α* (Factor inducible por hipoxia 1 α).

HMGB-1: del inglés, *High Mobility Group Box 1*.

HVEM: del inglés, *Herpesvirus entry mediator* (Mediador de la entrada de herpesvirus).

ICOS: del inglés, *Inducible T-cell Costimulator* (Coestimulador de células T inducible).

IDO: del inglés, *Indoleamina 2,3-dioxigenasa*.

IFN: Interferón.

IL: interleuquina.

iNOS: del inglés, *inducible Nitric Oxide Synthase* (Sintasa de óxido nítrico inducible).

Iono: ionomicina.

KLRG-1: del inglés, *Killer-cell lectin like receptor G1* (Receptor de tipo lectina de células asesinas G1).

LAG-3: del inglés, *Lymphocyte-activation Gene 3* (Gen de activación de linfocitos 3).

LFA-1: del inglés, *Lymphocyte associated function antigen 1* (Antígeno de función asociada a linfocitos 1).

Li: linfocito.

LiTreg: linfocito T regulatorio.

M: metastásicos (usualmente en GD-Ms: ganglios drenantes metastásicos).

MAT: microambiente tumoral.

min: minutos

Mon: monensina.

MPEC: del inglés, *Memory precursor effector cells* (Células efectoras precursoras de memoria).

mTOR: del inglés: *mamalian Target Of Rapamycin* (Diana de rapamicina de mamíferos).

NFAT: del inglés, *Nuclear Factor of Activated T-cells* (Factor nuclear de células T activadas).

NK: del inglés, *Natural killers* (Asesinas naturales).

NKG2D: del inglés, *Natural-killer group 2, member D* (Receptor de asesinas naturales del grupo 2, miembro D).

NM: no metástasicos (usualmente en GD-NMs: ganglios drenantes no metastásicos).

Ns: no significativo.

OVA: ovoalbúmina.

PD-1: del inglés, *Programed Cell Death Protein 1* (Proteína de muerte celular programada 1).

PD-L1: del inglés, *PD-1 Ligand 1* (Ligando 1 de PD-1).

PD-L2: del inglés, *PD-1 Ligand 2* (Ligando 2 de PD-1).

PGE₂: prostaglandina E2.

PI3K: del inglés, *Phosphatidylinositol 3-kinase* (Quinasa en posición 3 de fosfatidilinositol).

PKB: del inglés, *Protein Kinase B* (Proteína quinasa B).

PMA: del inglés, *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (Forbol de 12-miristato 13-acetato).

RI: rceptor inhibitorio.

Rp: respondedores.

SLEC: del inglés, *Short-lived effector cells* (Células efectoras de corta vida).

STAT: del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription* (Transductor de señales y activador de la transcripción).

Tc1: T citotóxico tipo 1.

TCR: del inglés, *T-cell receptor* (Receptor de las células T).

TGFβ: del inglés, *Transforming Growth Factor β* (Factor de crecimiento transformante β).

Th: del inglés, *T helper* (T colaborador).

TIGIT: del inglés, *T Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains* (Inmunoreceptor de células T con dominios inmunoglobulina e ITIM).

Tim-3: del inglés, *T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain containing-3* (Inmunoglobulina de células T que contiene dominios de mucina 3).

TNFα: del inglés, *Tumor Necrosis Factor α* (Factor de necrosis tumoral α).

Tr1: T regulatorio 1.

Treg: T regulatorio.

VCML: virus de la coriomeningitis linfocítica.

VEGF: del inglés, *Vascular-endotelial growth factor* (Factor de crecimiento vascular-endotelial).

VHC: virus de la hepatitis C.

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

INTRODUCCIÓN

Figura 1: La inmunoeedición del cáncer 18
 Figura 2: El ciclo de la inmunidad frente al cáncer 23
 Figura 3: El agotamiento de LiTCD8⁺ 33
 Figura 4: El sistema purinérgico en el microambiente tumoral 37

RESULTADOS

Figura 1: LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA poseen una alta expresión de la ectoenzima CD39 48
 Figura 2: LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores murinos poseen una alta expresión de la ectoenzima CD39, pero variable expresión de CD73..... 49
 Figura 3: Una baja frecuencia de LiTCD8⁺ expresa CD39 en órganos linfoides murinos, mientras que la expresión de CD73 varía entre cepas de ratones 51
 Figura 4: LiTCD8⁺ muestran distintos niveles de expresión de CD39, encontrándose LiTCD8⁺CD39^{high} solo en el MAT 52
 Figura 5: La frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high} aumenta con la progresión tumoral 53
 Figura 6: LiTCD8⁺CD39^{high} intratumorales se encuentran en mayor cantidad que los LiTregs CD39^{high} en el MAT 55
 Figura 7: La expresión de CD39 aumenta en diversas poblaciones leucocitarias en el MAT 56
 Figura 8: Leucocitos CD45⁺ CD39⁺ infiltran tumores B16F10-OVA..... 58
 Figura 9: Diversas poblaciones leucocitarias coexpresan CD39 y CD73 en el MAT y aumentan su expresión de CD39 con la progresión tumoral 59
 Figura 10: LiTCD8⁺CD39^{high} muestran un fenotipo de células efectoras de corta vida .. 62
 Figura 11: LiTCD8⁺CD39^{high} mantienen una alta expresión de CD8α a pesar de poseer un fenotipo de células efectoras activadas..... 63
 Figura 12: La alta expresión de CD39 se asocia a LiTCD8⁺ específicos para antígenos tumorales..... 65
 Figura 13: Tumores más inmunogenicos inducen una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high} 66
 Figura 14: LiTCD8⁺CD39^{high} son capaces de responder a la estimulación produciendo IFNγ, pero no TNFα ni IL-2 69
 Figura 15: LiTCD8⁺CD39^{high} poseen un alto potencial citotóxico 70
 Figura 16: LiTCD8⁺CD39^{high} poseen un menor potencial proliferativo que LiTCD8⁺ CD39^{int} y CD39^{int} 71

Figura 17: La inmunogenicidad de los tumores afecta el perfil efector de LiTCD8 ⁺ CD39 ^{high}	72
Figura 18: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ exhiben una menor respuesta metabólica que LiTCD8 ⁺ CD39 ⁻ cuando son re-estimulados	73
Figura 19: LiTCD8 ⁺ CD39 ^{high} exhiben alta expresión de múltiples RIs.....	75
Figura 20: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de órganos linfoides no expresan RIs.....	76
Figura 21: Tumores de alta inmunogenicidad promueven mayor expresión de LAG-3 y TIGIT en LiTCD8 ⁺ CD39 ^{high}	76
Figura 22: LiTCD8 ⁺ CD39 ^{high} muestran una alta expresión de factores de transcripción asociados a células efectoras y exhaustas	77
Figura 23: CD39 es un marcador de LiTCD8 ⁺ exhaustos en el MAT.....	79
Figura 24: El CD39 expresado por LiTCD8 ⁺ infiltrantes de tumor es enzimáticamente activo	82
Figura 25: LiTCD8 ⁺ exhaustos (CD39 ^{high}) son capaces de modular la producción de IFN γ por parte de LiTCD8 ⁺ Rp.....	84
Figura 26: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ infiltran tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer	89
Figura 27: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer de mama poseen principalmente un fenotipo de células de memoria efectoras	91
Figura 28: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de tumores primarios de pacientes con cáncer exhiben mayor expresión de CD8 α que LiTCD8 ⁺ CD39 ⁻	91
Figura 29: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer de mama muestran alta expresión de RIs	93
Figura 30: LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ de pacientes con cáncer de mama muestran una menor capacidad de producir citoquinas proinflamatorias que LiTCD8 ⁺ CD39 ⁻	95
Figura 31: IL-27 e IL-6 promueven la expresión de CD39 en LiTCD8 ⁺ murinos	99
Figura 32: IL-27 induce PD-1 y Tim-3 in vitro en LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ y una leve disminución en la producción de citoquinas inflamatorias.....	100
Figura 33: IL-27 e IL-6 promueven la generación de LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ humanos in vitro	102
Figura 34: Células CD45 ⁺ CD39 ⁺ se asocian a zonas de hipoxia.....	104
Figura 35: La alta expresión de CD39 en LiTCD8 ⁺ intratumorales se asocia a hipoxia	105
Tabla 1: Frecuencias de células CD39 ⁺ en LiTCD8 ⁺ en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama	88
Tabla 2: Frecuencias de células CD39 ⁺ , PD-1 ⁺ , TIGIT ⁺ y Tim-3 ⁺ en LiTCD8 ⁺ purificados de sangre periférica estimulados in vitro	102

DISCUSIÓN

Figura 1: Generación y función de LiTCD8 ⁺ CD39 ⁺ en el microambiente tumoral	122
---	-----

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 1: Estrategia de “gates” para el análisis de poblaciones leucocitarias mediante CF en órganos linfoides de ratón.....	133
Figura 2: Estrategia de “gates” para el análisis de poblaciones leucocitarias mediante CF en tumores de ratón.....	134
Tabla 1: Muestras de pacientes	128
Tabla 2: Anticuerpos y Fluorocromos para Citometría de flujo	131
Tabla 3: Anticuerpos para Inmunohistofluorescencia.....	138

Las células tumorales poseen diversos mecanismos para evadir la respuesta inmune antitumoral gatillada por células de la inmunidad innata, como las células asesinas naturales (NK, del inglés *Natural Killers*), y de la inmunidad adaptativa, como los linfocitos T CD8⁺ (LiTCD8⁺). Entre las estrategias de evasión se encuentra la generación de un microambiente tumoral (MAT) inmunosupresor propiciado por la expresión superficial de las enzimas inmunomoduladoras CD39 y CD73. Estas moléculas son capaces de hidrolizar el ATP extracelular, un metabolito altamente inflamatorio, generando adenosina, una molécula inmunosupresora. Aunque se ha descrito que en condiciones fisiológicas normales los LiTCD8⁺ no expresan CD39 algunos estudios han reportado la presencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en pacientes con cáncer. Sin embargo, las características fenotípicas y funcionales de estas células y la significancia biológica de la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ no fueron abordadas. En este contexto, postulamos la hipótesis de que la exposición prolongada de los LiTCD8⁺ a estímulos del MAT podría favorecer la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en los mismos. A su vez, dichas moléculas podrían modular y/o ser indicativas del estado de diferenciación y la funcionalidad de estas células.

Utilizando distintos modelos experimentales murinos de cáncer observamos que en el MAT una elevada frecuencia de LiTCD8⁺ adquiere la expresión de CD39, mientras que CD73 fue expresado de forma variable dependiendo del modelo experimental utilizado. En los LiTCD8⁺CD39⁺ intratumorales se distinguieron dos subpoblaciones con distinto grado de expresión de la ectoenzima: CD39^{int} y CD39^{high}. Los LiTCD8⁺CD39^{high} fueron detectados exclusivamente en tumores y su frecuencia se encontró asociada a la progresión y a la inmunogenicidad de los mismos, mientras que en bazos y ganglios linfáticos drenantes (GD) solo se encontró una pequeña población de LiTCD8⁺CD39^{int}. El análisis funcional de los LiTCD8⁺ mostró que un alto porcentaje de LiTCD8⁺CD39^{high} producían interferón γ (IFN γ) y expresaban granzima B. Sin embargo, estas células también mostraron una reducida capacidad para producir factor de necrosis tumoral α (TNF α) e IL-2, un bajo potencial proliferativo y deficiencias metabólicas, al compararlas con LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}. Todas estas observaciones permitieron inferir que los LiTCD8⁺CD39^{high} intratumorales podrían encontrarse en un estado de agotamiento. Esto fue

confirmado mediante el análisis de la expresión de receptores inhibitorios (RI), el cual demostró que LiTCD8⁺CD39^{high} exhibían altos niveles de expresión de PD-1, Tim-3, TIGIT, LAG-3 y 2B4. De forma similar, LiTCD8⁺ específicos para un antígeno tumoral poseían en su mayoría un fenotipo CD39^{high}, junto con una menor funcionalidad y mayor expresión de RIs que LiTCD8⁺CD39^{int} específicos. Todos estos resultados nos permitieron proponer a CD39 como un marcador de LiTCD8⁺ exhaustos en el contexto del cáncer.

En concordancia con la expresión de CD39, los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron una alta capacidad para hidrolizar ATP extracelular, indicando que podrían tener un rol relevante en la modulación de la señalización purinérgica en el MAT. LiTCD8⁺CD39^{high} purificados fueron además capaces de modular la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺ respondedores *in vitro*, aunque ensayos de bloqueo de CD39 demostraron que esta modulación era independiente de la ectoenzima, lo que evidencia la existencia de otros mecanismos regulatorios en estas células.

En este trabajo de tesis nos propusimos correlacionar los hallazgos realizados en modelos experimentales con lo que ocurre en pacientes con cáncer. Así, observamos que los tumores y GDs de pacientes con cáncer de mama estaban infiltrados por una población de LiTCD8⁺CD39⁺CD73⁻. Llamativamente, se detectó una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en GDs invadidos por células tumorales respecto a ganglios que no tenían células metastásicas, mientras que en sangre periférica no se detectó presencia de estas células. A su vez, el análisis fenotípico y funcional de los LiTCD8⁺CD39⁺ infiltrantes de tumores y GDs metastásicos demostró que dicha población también poseía un fenotipo exhausto en pacientes.

Finalmente, estudios realizados *in vitro* permitieron proponer a las citoquinas IL-6 e IL-27 como posibles señales involucradas en la inducción de CD39 en LiTCD8⁺ murinos y humanos en cáncer, abriendo la posibilidad de explorar a estas citoquinas como posibles dianas terapéuticas.

Todos los resultados obtenidos ponen en relevancia la posibilidad de utilizar a CD39 como un marcador de la respuesta inmune de LiTCD8⁺ frente a tumores en pacientes y en el pronóstico frente a distintos tratamientos. Los resultados de este trabajo nos permiten también postular que el bloqueo de CD39 podría tener efectos profundos en el MAT, afectando la funcionalidad de LiTCD8⁺ y otras poblaciones celulares. Además, este estudio descubre posibles funciones previamente ignoradas

de los LiTCD8⁺ exhaustos que, lejos de ser células inertes, podrían tener un efecto relevante en el desarrollo del cáncer.

Abstract

Tumor cells possess diverse mechanisms to evade the anti-tumor immune response triggered by innate immune cells, such as natural killer cells, and adaptive immune cells, such as CD8⁺ T cells. Among many evasion strategies tumor cells can generate an immunosuppressive tumor microenvironment favored by the surface expression of immunomodulatory enzymes like CD39 and CD73. These enzymes are able to hydrolyze extracellular ATP, an inflammatory metabolite, generating adenosine, an immunosuppressive molecule.

Although it has been described that in normal physiological conditions CD8⁺ T cells do not express CD39, some studies reported the presence of CD39⁺CD8⁺ T cells in cancer patients. Nevertheless, the phenotypic and functional characteristics of these cells and the biological significance of CD39 expression on CD8⁺ T cells was not addressed.

In this context, we postulated the hypothesis that the prolonged exposure of CD8⁺ T cells to stimuli from the tumor microenvironment could favor the expression of the ecto-enzymes CD39 and CD73 on them. Even more, these molecules could modulate and/or be indicative of the differentiation state and functionality of these cells.

Using different murine experimental cancer models we observed that in the tumor microenvironment a high frequency of CD8⁺ T cells acquires the expression of CD39, while CD73 expression varied depending on the used experimental model. Within tumor-infiltrating CD39⁺CD8⁺ T cells two subsets with distinct levels of CD39 expression were distinguished: CD39^{int} and CD39^{high}. CD39^{high}CD8⁺ T cells were exclusively detected in tumors and their frequency was found to be associated with tumor progression and immunogenicity, while in spleen and draining lymph nodes only a small population of CD39^{int}CD8⁺ T cells was observed. The functional analysis of CD8⁺ T cells showed that a high percentage of CD39^{high}CD8⁺ T cells produced IFN γ and expressed granzyme B. However, these cells also exhibited a reduced capacity to produce TNF α and IL-2, a lower proliferative potential and metabolic deficiencies when compared to CD39⁻ and CD39^{int}CD8⁺ T cells. All these

observations allowed us to infer that tumor-infiltrating $CD39^{high}CD8^{+}$ T cells could be in a state of exhaustion. This was confirmed through the analysis of inhibitory receptors expression, which showed that $CD39^{high}CD8^{+}$ T cells exhibited high expression of PD-1, Tim-3, TIGIT, LAG-3 and 2B4. Similarly, $CD8^{+}$ T cells specific for a tumor antigen were mostly $CD39^{high}$ and showed a lower functionality and higher expression of inhibitory receptors than antigen-specific $CD39^{int}CD8^{+}$ T cells. All these results allowed us to propose CD39 as a marker of exhausted $CD8^{+}$ T cells in the context of cancer.

In accordance with their levels of CD39 expression, $CD39^{high}CD8^{+}$ T cells exhibited a high capacity to hydrolyze extracellular ATP, indicating that these cells may have a relevant role in the modulation of the purinergic signaling in the tumor microenvironment. Purified $CD39^{high}CD8^{+}$ T cells were able to modulate IFN γ production by responder $CD8^{+}$ T cells *in vitro*, although CD39 blocking assays demonstrated that this effect was independent of the ecto-enzyme, which pointed out the existence of other regulatory mechanisms in these cells.

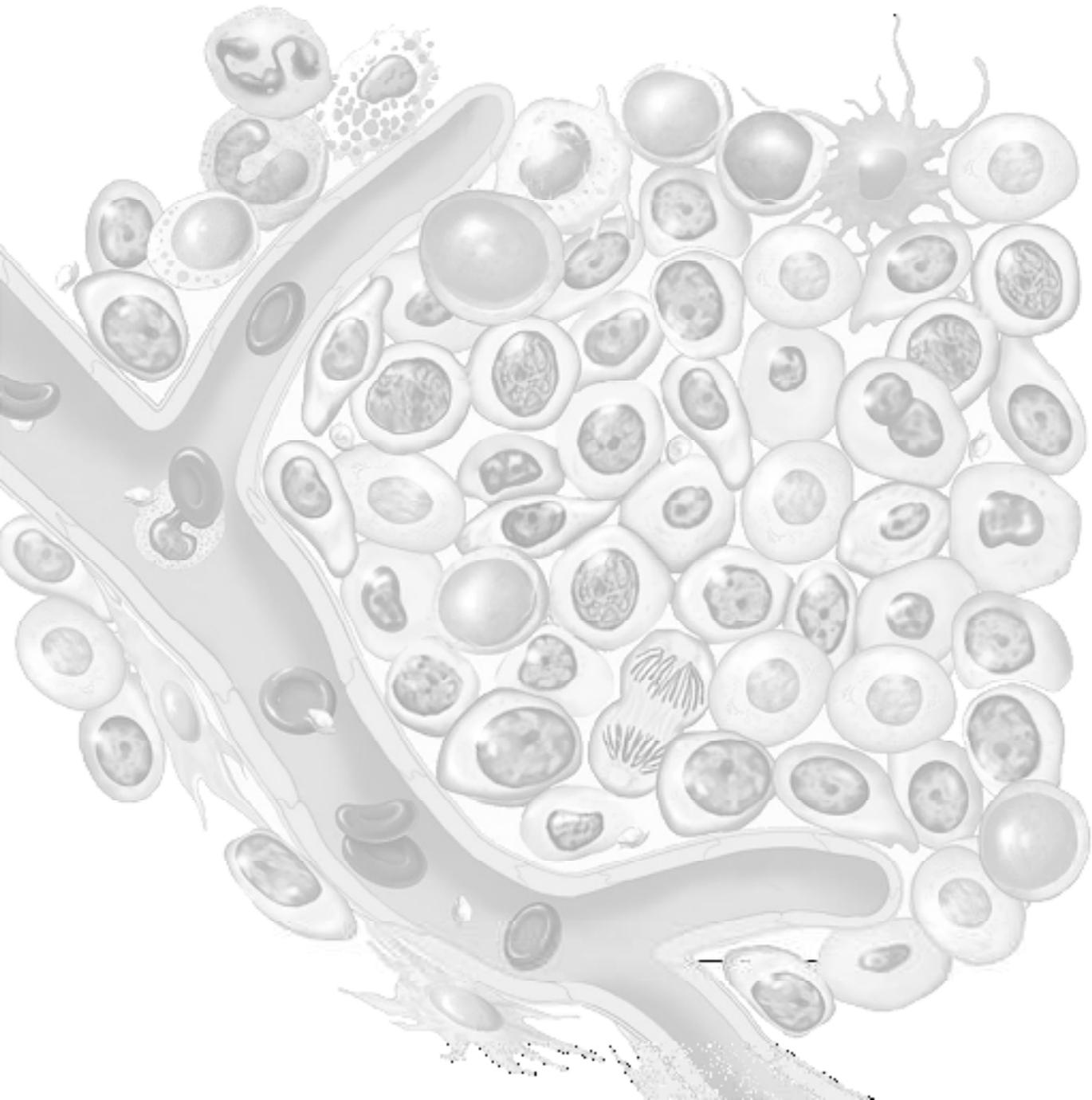
In this work we correlated the findings obtained in murine experimental models with cancer patients. We observed that tumors and tumor-draining lymph nodes from breast cancer patients were infiltrated by a population of $CD39^{+}CD73^{-}CD8^{+}$ T cells. Interestingly, a higher frequency of $CD39^{+}CD8^{+}$ T cells was detected in lymph nodes invaded by cancer cells compared to non-invaded lymph nodes, while in peripheral blood these cells were not present. The phenotypic and functional analysis of $CD39^{+}CD8^{+}$ T cells obtained from tumors and lymph nodes showed that this cell subset also possessed an exhausted phenotype in patients.

Finally, *in vitro* studies allowed us to propose the cytokines IL-6 and IL-27 as possible signals involved in the induction of CD39 on murine and human $CD8^{+}$ T cells in cancer, opening the possibility of exploring these cytokines as possible therapeutic targets.

All the results obtained in this thesis highlight the possibility of using CD39 as a marker of the response exerted by $CD8^{+}$ T cells against tumors in patients, and in prognosis when administering different treatments. These results also allowed us to propose that CD39 blockade could have profound effects in the tumor microenvironment, affecting the functionality of $CD8^{+}$ T cells and other tumor-infiltrating leukocytes. Moreover, this study unveils possible previously ignored

functions of exhausted CD8⁺ T cells which, far from being inert cells, could have a relevant effect in cancer development.

INTRODUCCIÓN



1. EL CÁNCER

1.1 El cáncer: un conjunto de enfermedades relacionadas.

Las enfermedades neoplásicas (de *neoplasia*: crecimiento nuevo no controlado de *tejido*) son un conjunto de patologías que poseen características muy diferentes entre sí, mostrando una dinámica y agresividad variada de acuerdo al origen histológico de cada tipo de cáncer y a cada individuo. Sin embargo, todos los tipos de cáncer se basan en el mismo mecanismo patogénico: células propias del organismo se transforman en células cancerígenas, las cuales pierden el control de los mecanismos que regulan la división celular y por lo tanto proliferan excesivamente e invaden otros tejidos alterando sus funciones biológicas. Es por ello que puede considerarse al cáncer como un conjunto de enfermedades relacionadas. Esta división celular sin control puede formar masas sólidas llamadas tumores, excepto en el cáncer de células del sistema hematopoyético. Adicionalmente, las células cancerosas pueden desprenderse del tumor original o primario, y formar tumores secundarios en nuevos tejidos, lo cual se conoce como metástasis, siendo ésta la principal causa de muerte en pacientes con cáncer^{1,2}.

La genética de un individuo puede predisponer para ciertos tipos de cáncer; sin embargo, es la interacción entre el genoma y factores ambientales lo que finalmente puede llevar a una célula a transformarse en cancerígena². Existen más de 100 tipos de cáncer, cada uno con características muy diferentes entre sí. Usualmente se clasifican en base al órgano, tejido o célula a partir del cual se han originado. Los carcinomas son los tipos de cáncer maligno más comunes y se originan en células epiteliales, apareciendo en órganos tales como mamas, colon y pulmones. Los sarcomas se originan en huesos y tejidos blandos como músculo y grasa, como así

también en vasos sanguíneos y linfáticos. Los melanomas surgen en la piel a partir de los melanocitos o en otros tejidos pigmentados como en los ojos. Entre los tipos de cáncer malignos que no forman tumores sólidos se encuentran las leucemias, en las cuales las células cancerosas son leucocitos generados en médula ósea, los linfomas, que comienzan en linfocitos T o B, y el mieloma múltiple, en el cual las células cancerosas son células plasmáticas que suelen localizarse en los huesos². El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta. En nuestro país el cáncer de mama es el de mayor incidencia, con 18.700 nuevos casos al año (que corresponden a un 18% del total de cánceres y 36% del total en mujeres), seguido del cáncer colorectal, de pulmón y próstata, siendo este último el de mayor incidencia en hombres (20,4% del total). En cuanto a la mortalidad, los tumores registran el 20% del total de defunciones que se producen por año, siendo el cáncer de pulmón el de mayor índice de mortalidad en hombres y el cáncer de mama en mujeres^{3,4}.

1.2 Características distintivas de las células cancerígenas.

La dinámica de la progresión de distintos tipos de cáncer varía ampliamente, como así también su capacidad metastásica, metabolismo, morfología, MAT y agresividad. Sin embargo, como se ha mencionado previamente, existen características de las células tumorales que suelen ser comunes a todos los tipos de cáncer⁵. Probablemente la más fundamental y conocida de ellas es su **alta capacidad proliferativa**⁵. En las células cancerígenas los mecanismos moleculares que controlan el crecimiento y la proliferación se encuentran desregulados. Éstas pueden producir factores de crecimiento que actúan de forma autocrina o estimular a células del estroma de los tejidos para que los produzcan. Alternativamente, también pueden volverse independientes de los mismos debido a la activación constitutiva de distintas vías de señalización⁶. Sin embargo, para proliferar de forma exacerbada las células tumorales deben ser capaces de **evadir mecanismos de supresión de la división celular**. Estos mecanismos dependen de los “genes supresores de tumores”, como por ejemplo el gen que codifica a la proteína TP53, el cual es el gen más frecuentemente mutado en cáncer. Frente a señales de estrés intracelular, como daños a nivel del ADN, TP53 puede optar por inducir la apoptosis de la célula

o activar un programa de senescencia (células arrestadas en el ciclo celular de forma irreversible)⁷. Aun así, las células tumorales pueden ser muy **resistentes a la apoptosis** debido al incremento de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2⁵. Por otro lado, un alto número de divisiones celulares puede llevar a un acortamiento crítico de sus telómeros, lo cual resulta en la activación de la maquinaria de reparación de ADN y el arresto en el ciclo celular. Sin embargo, en las células tumorales una elevada expresión de la enzima telomerasa les permite mantener la longitud de los telómeros y así asegurar su **inmortalización replicativa**⁸.

Luego de adquirir todas estas características distintivas que les permiten proliferar indefinidamente las células cancerígenas promueven la **angiogénesis**, es decir, la formación de nuevos vasos sanguíneos para irrigar y nutrir al tejido tumoral. Las células endoteliales, que normalmente se encuentran en un estado quiescente, proliferan y forman nuevos vasos por la estimulación con el factor de crecimiento endotelial-vascular (VEGF), el cual es producido en grandes cantidades en el MAT⁹. Las células tumorales también suelen **reprogramar su metabolismo energético** para poder adaptarse a las condiciones que se generan en el MAT, centrándose en la glicólisis por sobre la fosforilación oxidativa. Esta reprogramación les permite sobrevivir en los espacios hipóxicos que se generan en el interior de los tumores, y una rápida biosíntesis de moléculas requeridas durante la proliferación¹⁰.

Por último, como se mencionó anteriormente, los tumores malignos son capaces de hacer **metástasis**. Para ello, las células tumorales pierden sus uniones adherentes y producen enzimas que degradan la matriz extracelular, lo cual les permite abandonar el tumor primario e ingresar al torrente sanguíneo o a la linfa¹¹. Las células del estroma, como fibroblastos y macrófagos, junto con otras células del sistema inmune, contribuyen a la metástasis produciendo metaloproteasas y remodelando los tejidos donde se forman tumores secundarios^{5, 12}.

1.3 Fenómenos que favorecen la adquisición de las características distintivas del cáncer: inestabilidad genómica e inflamación asociada al tumor.

Las características clásicas del cáncer son adquiridas a través de mutaciones en el genoma, aberraciones cromosómicas, o alteraciones epigenéticas. Estas mutaciones confieren ventajas selectivas a las células transformadas, permitiendo su

dominancia en el tejido de origen. Las alteraciones que afectan a componentes del sistema de reparación del ADN favorecen una inestabilidad genómica de las células tumorales, volviéndose aún más sensibles a nuevas mutaciones inducidas por sustancias carcinogénicas^{5, 13}. Junto con la inestabilidad genómica, la respuesta inflamatoria asociada a los tumores muchas veces tiene el efecto paradójico de colaborar con la tumorigénesis. La inflamación es promovida por células del sistema inmune que al ser activadas pueden producir factores de crecimiento, VEGF y metaloproteasas, favoreciendo la proliferación, nutrición e invasividad de los tumores^{14, 15}.

1.4 Una característica emergente del cáncer: evasión de la respuesta inmune.

El sistema inmune está conformado por un conjunto de células, moléculas y tejidos que continuamente monitorean al organismo con el objetivo de identificar y eliminar amenazas tales como infecciones y focos neoplásicos. El sistema inmune es muy efectivo frente al cáncer, siendo capaz de eliminar la gran mayoría de los tumores nacientes. Sin embargo, algunos tumores adquieren ventajas que le permiten evadir los distintos brazos armados de la respuesta inmunológica, escapando a su destrucción y creciendo hasta el punto de resultar perjudiciales para el organismo¹⁶. Para introducir de mejor manera estos mecanismos de evasión, primero se revisará el funcionamiento de la respuesta inmune antitumoral en la siguiente sección.

2. LA RESPUESTA INMUNE CONTRA EL CÁNCER.

2.1 Respuesta inmune antitumoral: la teoría de la inmunoección del cáncer.

En la actualidad está demostrado que el sistema inmune puede combatir al cáncer de varias formas:

- Eliminando infecciones virales que pueden causar mutaciones en células del organismo.
- Resolviendo infecciones y estados inflamatorios de forma aguda, evitando la generación de una inflamación crónica que pueda favorecer la tumorigénesis.
- Eliminando células tumorales nacientes a través del reconocimiento de antígenos asociados a tumores (**AAT**, son autoantígenos normales pero que son sobreexpresados en los tumores) y antígenos específicos de tumores (**AET**, son neoantígenos producto de mutaciones que generan péptidos diferentes)^{17, 18}.

La teoría más establecida que explica cómo se desarrolla la respuesta inmune contra tumores se denomina “inmunoección del cáncer”¹⁶. Los estudios que permitieron postularla fueron realizados en un primer momento en modelos experimentales murinos. Un experimento clave demostró que tumores inducidos en ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicos que aquellos generados en ratones inmunocompetentes, indicando que los animales que poseían su sistema inmune intacto eliminaban aquellos clones de células tumorales altamente antigénicos¹⁹. De esta manera, pudo establecerse que el sistema inmune es capaz

de moldear la inmunogenicidad, y en consecuencia, el genotipo y el fenotipo de las células tumorales.

La teoría postula tres etapas diferentes de la respuesta contra los tumores: Eliminación, Equilibrio y Escape (Figura 1). Durante la etapa de **Eliminación** el sistema inmune se encarga de detectar nuevos focos de células tumorales y destruirlos a través de mecanismos de la inmunidad innata y adaptativa. Se ha observado en modelos experimentales murinos que en esta etapa es crucial la liberación de “señales asociadas al daño/peligro” (DAMPs, del inglés “*Danger-associated molecular patterns*”), como la proteína HMGB-1, que son liberadas por células necróticas y activan al sistema inmune innato iniciando la respuesta inflamatoria¹⁶.

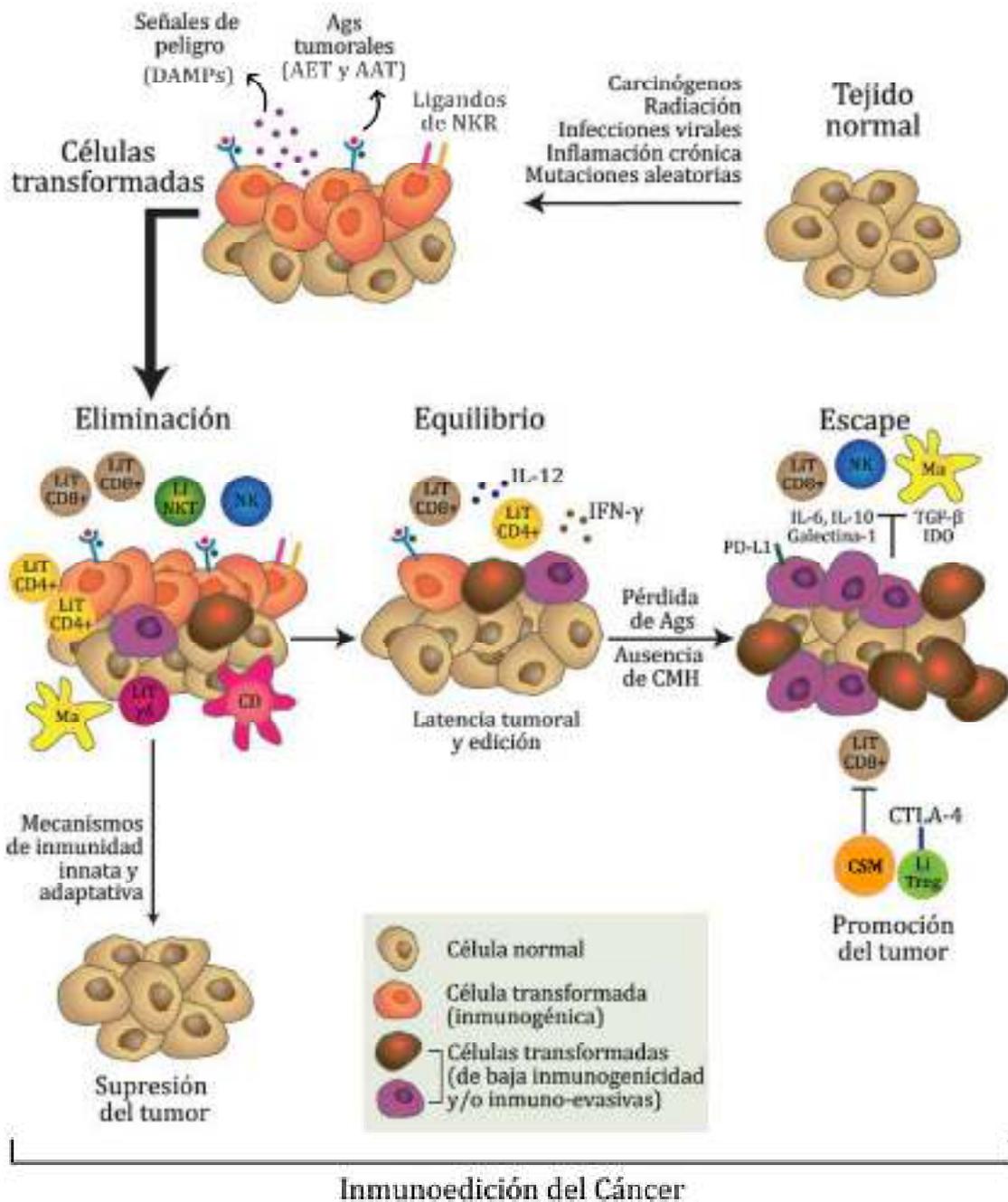


Figura 1: La inmunoedición del cáncer: En su forma más compleja, la inmunoedición del cáncer consta de tres fases: Eliminación, Equilibrio y Escape. En la fase de Eliminación las respuestas inmunes innata (células NK, LiTγδ, NKT, macrófagos y células dendríticas) y adaptativa (LiTCD4+ y LiTCD8+) trabajan juntas detectando DAMPs y AET para destruir los focos tumorales nacientes. Si esta fase es exitosa se eliminan completamente las células cancerígenas y finaliza la respuesta inmune antitumoral. Sin embargo, algunas variantes de células tumorales pueden entrar en la fase de Equilibrio, donde son controladas por la respuesta inmune adaptativa, pero no erradicadas. En este proceso dinámico, los LiTCD8+ eliminan las variantes de células tumorales más inmunogénicas, esculpiendo en el proceso el genotipo y el fenotipo del tumor. Esta etapa puede también comprender un punto final de la progresión tumoral. En algunos casos puede ocurrir que debido a la presión selectiva del sistema inmune y a la inestabilidad genética de las células tumorales surjan variantes de estas últimas con capacidad de evadir la respuesta inmune. Esto puede ocurrir por una pérdida de AETs y CMH I en las células tumorales y/o por la generación de un MAT inmunosupresor. Estas células tumorales pueden entonces entrar en la fase de Escape, en la cual el tumor crece y se torna clínicamente detectable. Ma: macrófago; CD: célula dendrítica; NKR: receptores de NK. Adaptado de Schreiber R. y col. Science 2011.

Estos estudios revelaron además la importancia en esta fase de células del sistema inmune adaptativo como los LiTCD8⁺ y los linfocitos T CD4⁺ (LiTCD4⁺), capaces de reconocer a los AET. Las citoquinas IFN γ y TNF α producidas por estas células, demostraron ser claves en el rechazo y la inmunoección de los tumores^{17, 20, 21}. La producción de perforinas y granzimas también resultó ser crucial, ya que participan en los mecanismos de citotoxicidad mediados por células NK y LiTCD8⁺¹⁵. Sin embargo, en estos estudios también se evidenció el rol protumoral de algunas poblaciones de células inmunes, entre ellas los LiTregs, que producen citoquinas inmunosupresoras como la IL-10 y el “factor de crecimiento transformante β ” (TGF β). En humanos las evidencias de la existencia de la fase de eliminación se basan principalmente en el mayor riesgo de individuos inmunodeficientes a padecer distintos tipos de cáncer. Tal es el caso de pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o de otros pacientes inmunodeprimidos, más susceptibles a padecer cáncer de colon, pulmón y melanoma, entre otros¹⁷.

Algunas variantes de células tumorales que han sobrevivido a la eliminación pueden entrar en la etapa de **Equilibrio**. En esta fase la inmunidad adaptativa y el foco neoplásico entran en un balance dinámico que puede durar años, en el cual la respuesta inmune contiene a las células tumorales pero sin lograr erradicarlas, esculpiendo en este proceso su inmunogenicidad¹⁶. En esta etapa los focos tumorales se encuentran en un estado latente, el cual no muestra signos clínicos aparentes y puede representar un punto final de la progresión tumoral. En pacientes con cáncer de próstata y mama se ha observado que un 20-45% de ellos recaen años o décadas luego de la eliminación del tumor primario, sugiriendo la existencia de focos tumorales en estado de equilibrio por largos períodos de tiempo¹⁷. Experimentos en modelos murinos demostraron que los LiTCD8⁺ y CD4⁺, la IL-12 y el IFN γ son componentes cruciales para mantener al tumor en este estado latente²².

La presión selectiva a la que son sometidas las células cancerígenas puede también favorecer la generación de mutantes que de alguna forma son capaces de evadir el reconocimiento y la destrucción por parte del sistema inmune. En este caso el foco neoplásico avanza a otra etapa conocida como **Escape**. En esta fase, las células cancerígenas que han logrado evadir al sistema inmune emergen como un tumor detectable y en crecimiento progresivo. El escape puede ocurrir a través de diferentes mecanismos que en general involucran la pérdida de inmunogenicidad por parte de las células cancerígenas y/o la generación de un MAT inmunosupresor^{16, 23}.

La pérdida en la expresión de antígenos tumorales puede darse por mutaciones que generan células que no expresan AET, por pérdida de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I (CMH I), o disminución en la capacidad de procesar antígenos endógenos por parte de las células tumorales, todos procesos que son facilitados por su inestabilidad genética¹⁶. De esta manera, las células tumorales resultantes poseen menor antigenicidad, volviéndose en cierta forma “invisibles” para el sistema inmune adaptativo.

Alternativamente, el escape puede darse por la generación de un microambiente que inhiba la función del sistema inmune y que favorezca la proliferación de células tumorales. Muchos mecanismos y células pueden participar en dicho proceso produciendo moléculas solubles, enzimas y ligandos inmunoregulatorios^{23, 24}. Estos mecanismos inmunosupresores son revisados en mayor detalle en la sección 3 de la Introducción.

2.2 El microambiente tumoral durante la fase de Escape.

Las características del MAT varían ampliamente entre diferentes tipos de tumores y pacientes, existiendo distintos grados de vascularización, márgenes definidos o difusos, distintos niveles de hipoxia y un infiltrado de células inmunes de cantidad y calidad variable. El MAT también está compuesto por matriz extracelular y líquido intersticial, caracterizado este último por un pH levemente ácido, baja presión parcial de oxígeno y una alta concentración de vesículas, proteínas y moléculas de bajo peso molecular^{5, 25}.

Además de las células cancerígenas, el MAT posee otros tipos de células que conforman el estroma del tumor. Entre ellas se encuentran las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos y linfáticos, y los pericitos, los cuales cumplen funciones vitales en el apoyo estructural y nutricional de las primeras. Los fibroblastos pueden constituir en muchos casos la población preponderante del estroma del MAT y se encargan del soporte estructural del tejido. Un subtipo especial de estas células, los miofibroblastos, participan en la progresión tumoral produciendo factores de crecimiento y angiogénicos. Los tumores pueden también reclutar células mesenquimales y progenitoras desde la médula ósea al MAT, las cuales pueden diferenciarse en distintos tipos celulares o permanecer en un estado no diferenciado. Estas células mesenquimales son capaces de colaborar con la

generación de un microambiente supresor mediante la producción de moléculas y enzimas inmunoregulatorias²⁶. Entre las células del sistema inmune que infiltran el MAT los macrófagos constituyen una de las poblaciones más representativas, aunque también pueden encontrarse las mencionadas células NK, los LiTCD4⁺ y CD8⁺, y también mastocitos, células dendríticas, neutrófilos, células supresoras mieloides (CSM), linfocitos B (LiB) y eosinófilos. El perfil y la concentración de quimionas producidas en el tumor impactan directamente en el tipo de infiltrado leucocitario. Las células del sistema inmune reclutadas pueden localizarse en el interior de los tumores, en sus márgenes invasivos o incluso en órganos linfoides terciarios adyacentes al tejido tumoral. Un alto infiltrado de LiTCD4⁺ T “helper”1 (Th1) y LiTCD8⁺ productores de IFN γ y TNF α ha sido asociado a un buen pronóstico en pacientes luego de la extirpación del tumor primario. Este tipo de infiltrado es también importante ya que muchas terapias antitumorales inducen una muerte inmunogénica de algunas células tumorales, caracterizada por la liberación de DAMPs y AET que pueden activar al sistema inmune contra el tumor^{27, 28, 29} (ver sección 2.3). Es por ello por lo que actualmente se considera de suma importancia el estudio del infiltrado inmune en el MAT para el diseño y aplicación de tratamientos.

2.3 Funciones antitumorales de la inmunidad innata.

Entre los componentes del sistema inmune innato las células NK destacan por su capacidad efectora antitumoral. Estas células linfoides son capaces de reconocer y activarse por la disminución de la expresión de CMH I en las células tumorales y por distintas señales de estrés que reconocen a través de los receptores NKG2D y DNAM-1, entre otros. Una vez activadas, destruyen a las células tumorales mediante mecanismos citotóxicos que incluyen la liberación de perforinas, granzimas y la expresión de FasL. Además, son una fuente temprana de IFN γ y TNF α , lo cual aumenta la activación de LiTCD8⁺^{30, 31}. Otras poblaciones de células linfoides innatas como las NKT y los LiT $\gamma\delta$ también pueden tener efectos antitumorales. Particularmente las NKT invariantes, que reconocen al antígeno α -galactosil ceramida, son capaces de controlar el crecimiento tumoral mediante la producción de IFN γ ^{15, 27}.

Las células mieloides innatas como los macrófagos y neutrófilos pueden poseer tanto funciones protumorales como antitumorales. Bajo la influencia de IFN γ y TNF α

los macrófagos y neutrófilos pueden adoptar los fenotipos antitumorales M1 y N1, respectivamente^{15, 32}. Los macrófagos M1 pueden eliminar células tumorales mediante fagocitosis y son una fuente importante de IL-12, la cual promueve la diferenciación de LiTCD8⁺ citotóxicos y LiTCD4⁺ Th1^{15, 32, 33}. En cuanto a los eosinófilos, un elevado infiltrado de estas células generalmente también se asocia a un efecto protector frente al cáncer³⁴.

2.4 La destrucción de la célula tumoral: el rol de las células dendríticas y los LiTCD8⁺.

Las células dendríticas son componentes fundamentales de la respuesta inmune antitumoral ya que son las encargadas de promover la activación de la inmunidad adaptativa frente a AET y AAT. Junto a los LiTCD8⁺ participan en un proceso conocido como el ciclo de la inmunidad frente al cáncer, el cual consta de siete etapas clásicas²³ (Figura 2).

Primera etapa: involucra la muerte inmunogénica de una célula tumoral, usualmente por necrosis, lo cual favorece la liberación de AET y DAMPs³⁵. Los antígenos solubles liberados por células tumorales son transportados a los GDs a través de los vasos linfáticos. Estos antígenos pueden ser capturados por células dendríticas residentes de GDs a través de endocitosis mientras que células dendríticas residentes de tejidos capturan antígenos directamente en el MAT y luego migran a los GDs.

Segunda etapa: las células dendríticas procesan los antígenos generando péptidos que se presentan en su superficie asociados a moléculas del CMH I, y que pueden ser reconocidos por el TCR de LiTCD8⁺ presentes en la zona T de los GDs²³. En este proceso son cruciales algunas subpoblaciones de células dendríticas como las CD8 α ⁺ en ratones y sus homólogas Clec9a⁺XCR1⁺ en humanos. Éstas son capaces de capturar antígenos solubles (los cuales usualmente son presentados en moléculas del CMH II a LiTCD4⁺) y mediante presentación cruzada presentar péptidos en moléculas del CMH I³⁶.

Tercera etapa: La interacción CMH I-péptido/TCR constituye la primera señal que necesitan los LiTCD8⁺ para activarse. La segunda señal necesaria la aportan las células dendríticas a través de la expresión de moléculas coestimuladoras, entre las cuales las más estudiadas son CD80 y CD86, que interaccionan con el receptor CD28 en LiTCD8⁺. También son importantes otros receptores coestimuladores en

los LiTCD8⁺, tales como OX-40, ICOS y 4-1BB, entre otros. La maduración de las células dendríticas y la expresión de ligandos coestimulatorios dependen fuertemente de la presencia de distintos estímulos como DAMPs, citoquinas proinflamatorias (TNF α e IL-1 β) e IFNs de tipo I ²³. A falta de ellos, las células dendríticas pueden adoptar un fenotipo tolerogénico, suprimiendo la respuesta frente a los AET. Sin embargo, si las células dendríticas logran dar la primera y segunda señal correctamente los LiTCD8⁺ se expanden y diferencian a células efectoras.

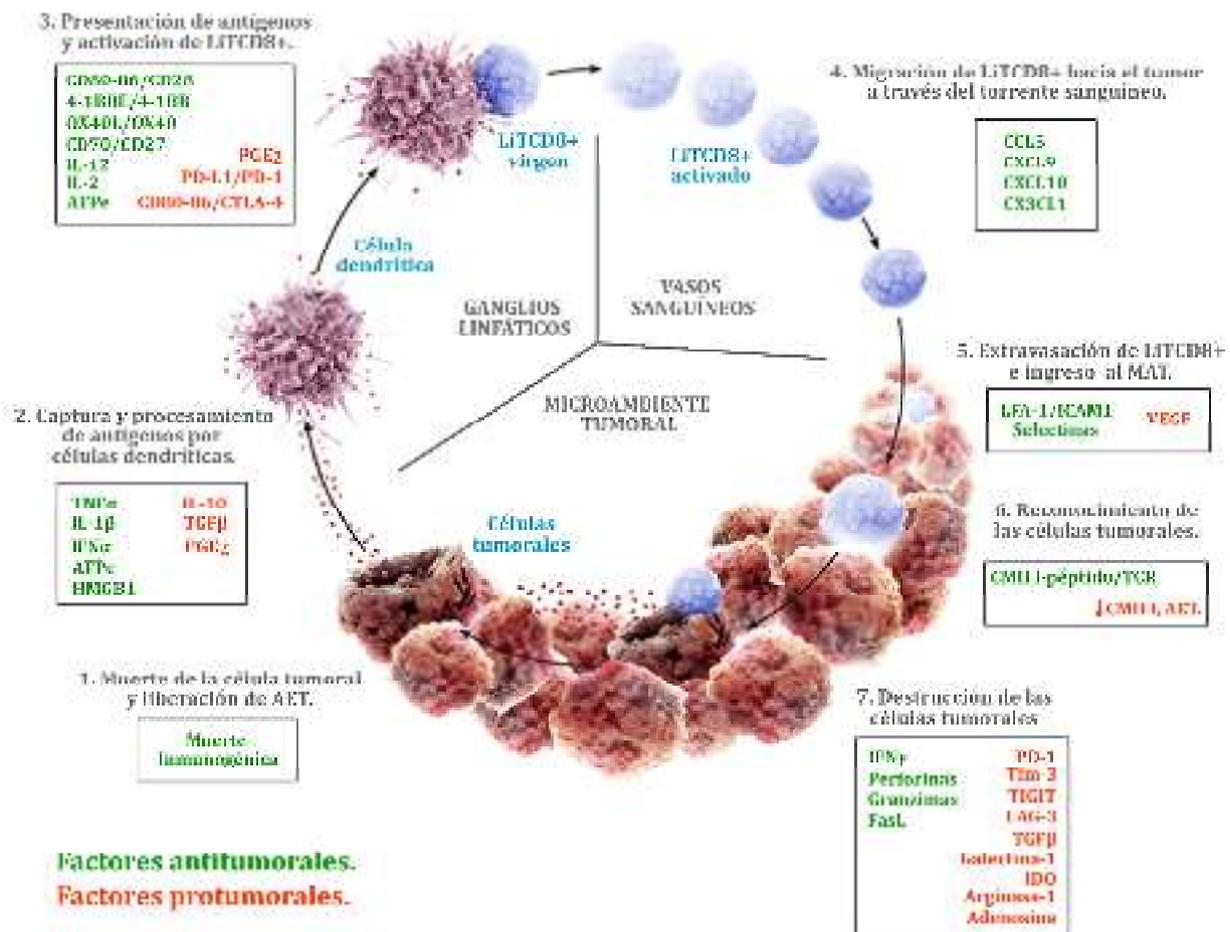


Figura 2: El ciclo de la inmunidad frente al cáncer. La generación de inmunidad frente al cáncer es un proceso cíclico que puede autopropagarse, llevando a la acumulación de factores inmunoestimuladores que en principio amplificarían la respuesta de LiT. El ciclo se caracteriza también por la presencia de factores inhibitorios los cuales regulan o limitan la respuesta inmune frente al tumor. El ciclo puede dividirse en siete grandes pasos, comenzando con la liberación de antígenos específicos de tumores por células tumorales y terminando en la destrucción de otras células tumorales por parte de LiTCD8⁺ específicos. En la figura se describe cada paso, indicándose en cada uno de ellos las principales células que intervienen, los sitios anatómicos donde se localizan y los factores que estimulan o inhiben la respuesta inmune antitumoral. *Adaptado de Chen D.S. y col. Immunity 2013.*

Cuarta etapa: Los LiTCD8⁺ activados migran a los focos inflamatorios a través del torrente sanguíneo gracias al aumento en la expresión de CXCR3, receptor de las

quimiocinas CXCL9 y CXCL10, las cuales se producen por células estromales y mieloides en el MAT.

Quinta etapa: Una vez que llegan a la vasculatura tumoral, los LiTCD8⁺ deben extravasar, un proceso que es facilitado por el aumento en la expresión de selectinas e integrinas.

Sexta etapa: Una vez en el MAT, los LiTCD8⁺ reconocen específicamente a través de su TCR a los AET unidos a moléculas del CMH I en la superficie de células tumorales.

Séptima etapa: Los LiTCD8⁺ desencadenan sus mecanismos citotóxicos, liberando sus gránulos de perforinas y granzimas o expresando FasL, lo que induce la muerte celular de las células tumorales²³.

En este último paso, la lisis de las células tumorales produce la liberación de nuevos AET y DAMPs, lo cual lleva al inicio del ciclo nuevamente. Este proceso puede llevar a la destrucción de focos tumorales nacientes, a la destrucción de clones tumorales inmunogénicos durante la fase de Equilibrio, o a la eliminación de células tumorales durante la fase de Escape en un intento por contener el crecimiento del tumor.

2.5 Diferenciación de LiTCD8⁺ a células efectoras y de memoria.

Los LiTCD8⁺ activados pueden adoptar diferentes fenotipos efectoras; sin embargo, en la mayoría de los casos la IL-12 producida por células dendríticas induce un fenotipo Tc1, caracterizado por una alta expresión de los factores de transcripción Tbet y Eomes, un alto potencial citotóxico (expresión de perforinas y granzimas en sus gránulos) y una elevada producción de IFN γ y TNF α . El IFN γ es crucial en la activación de células antitumorales como macrófagos M1, células NK, y en la potenciación de la citotoxicidad del propio LiTCD8⁺. Además, esta citoquina es capaz de inducir un aumento en la expresión de moléculas de CMH I en las células tumorales, lo cual facilita el reconocimiento de las mismas. Por otro lado, el TNF α puede activar a una gran variedad de leucocitos, promover su reclutamiento al foco inflamatorio e incluso inducir directamente la apoptosis en células tumorales^{15, 37}.

Para diferenciarse a este fenotipo efector los LiTCD8⁺ sufren cambios dramáticos en su metabolismo, incrementando su capacidad de incorporación de glucosa, aminoácidos y hierro. Otro cambio crítico se da en el mecanismo de obtención de energía, pasando de utilizar la fosforilación oxidativa como vía primaria de

generación de ATP a la glicólisis, lo cual favorece la síntesis de ácidos nucleicos, lípidos y proteínas necesarios para la proliferación celular. Debido a que no requieren oxígeno para obtener energía, los LiTCD8⁺ efectores son además capaces de sobrevivir mejor en los ambientes hipóxicos del MAT. Todos estos cambios son activados por las vías de señalización del TCR y de CD28, favoreciendo este último la activación del complejo proteico mTOR, el cual es un regulador maestro del metabolismo en LiT.

La activación de los LiTCD8⁺ lleva a una expansión de la población específica para el antígeno. Durante este proceso es indispensable la estimulación con IL-2 la cual puede ser producida por ellos mismos, aunque la principal fuente de esta citoquina son los LiTCD4⁺. La IL-2 es también un importante factor de diferenciación ya que promueve la expresión del factor de transcripción Blimp-1, el cual participa en la polarización a células efectoras y en la expresión de granzima B y perforinas^{37, 38}.

Los LiTCD8⁺ efectores se caracterizan por la pérdida de la expresión de las moléculas CD62L y CCR7, las cuales son esenciales para migrar hacia órganos linfoides secundarios. Por otro lado, aumentan la expresión de CD44 y LFA-1, moléculas de adhesión que les permiten ingresar a tejidos inflamados³⁷.

En la población efectora expandida pueden diferenciarse distintos fenotipos de activación, donde una subpoblación mayoritaria de LiTCD8⁺ expresan la molécula KLRG-1 pero no CD127, las cuales se denominan células efectoras de corta vida o SLECs (del inglés, "*short-lived effector cells*"). Las SLECs son una población de células efectoras con alto potencial citotóxico y capacidad de producir citoquinas inflamatorias. Durante una respuesta aguda son las principales encargadas de la destrucción de células infectadas o tumorales. Una vez que la estimulación antigénica desaparece, estas células mueren por apoptosis y la población rápidamente se contrae³⁷. Otra subpoblación de LiTCD8⁺, caracterizada por un fenotipo KLRG-1⁻CD127⁺, muestra una menor capacidad efectora que las SLECs. Sin embargo, una vez que ocurre la contracción de la respuesta estas células pueden persistir dando lugar a los LiT de memoria, por lo que se las denomina células efectoras precursoras de memoria o MPECs (del inglés, "*memory precursor effector cells*"). Las células de memoria que permanecen luego durante años se caracterizan por una elevada expresión de CD44 y CD62L, molécula de superficie que vuelve a expresarse y que les permite migrar a órganos linfoides. Estas células son capaces de dividirse periódicamente, gracias a la estimulación por IL-15 e IL-7.

Frente al surgimiento de nuevos focos tumorales que posean la misma antigenicidad los LiTCD8⁺ de memoria pueden diferenciarse rápidamente a células efectoras, asegurando de esta manera la protección del organismo^{38, 39}. En el contexto de la respuesta inmune en la fase de Escape, donde la estimulación de los LiTCD8⁺ es crónica y no existe un pico agudo de inflamación ni una contracción de la población de LiT efectora, se genera una población heterogénea de LiTCD8⁺ efectores y de memoria, SLECs y MPECs, como así también LiTCD8⁺ con fenotipos disfuncionales.

2.6 Funciones antitumorales de otras células del sistema inmune adaptativo: LiTCD4⁺ y LiB.

Los LiTCD4⁺ pueden discriminarse principalmente en LiTreg y LiTCD4⁺ convencionales (LiTCD4⁺conv). Los primeros tienen funciones inmunoregulatorias, mientras que los LiTCD4⁺conv pueden tener una amplia variedad de funciones efectoras y se los denomina T “*helper*” o “colaboradores”. Estas células se activan de forma similar a los LiTCD8⁺ y bajo la influencia de distintas citoquinas pueden adoptar diferentes perfiles efectores. La IL-12 favorece el perfil Th1 en LiTCD4⁺conv^{40, 41}. Estas células colaboran con la activación de macrófagos, células NK y LiTCD8⁺ a través de la producción de IFN γ y TNF α . Además, son capaces de producir grandes cantidades de IL-2, lo cual potencia la proliferación y la capacidad citotóxica de LiTCD8⁺⁴².

El rol de los LiB en el cáncer es controversial. Estas células pueden reconocer antígenos solubles en su estado nativo gracias a su BCR, y una vez activados y diferenciados a células plasmáticas pueden producir inmunoglobulina G específica frente a antígenos tumorales. Esto favorece la opsonización de las células tumorales y su posterior destrucción por proteínas del complemento o por células NK y LiTCD8⁺⁴³. Sin embargo, en muchos otros casos los LiB han demostrado poseer mecanismos inmunosupresores en el MAT⁴⁴.

3. EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN CÁNCER.

3.1 Mecanismos generales de la evasión de la respuesta inmune en cáncer.

Para lograr atravesar la fase de equilibrio y eventualmente entrar en la fase de escape las células tumorales deben utilizar estrategias que le permiten evadir el reconocimiento y la destrucción por parte del sistema inmune. Los mecanismos de evasión pueden clasificarse en cinco grandes grupos²⁴:

- *Mecanismos intrínsecos de las células tumorales*: evasión del reconocimiento por parte del sistema inmune y resistencia a la apoptosis (descrito en la sección 1).
- *Reclutamiento y expansión de poblaciones celulares inmunosupresoras.*
- *Producción de citoquinas y otras moléculas solubles inmunoregulatorias.*
- *Inducción de disfuncionalidad de linfocitos T.*
- *Expresión de enzimas inmunoregulatorias.*

3.2 Reclutamiento y expansión de poblaciones celulares inmunosupresoras.

Numerosos trabajos han demostrado que el MAT es capaz de reclutar células del sistema inmune con funciones inmunosupresoras que colaboran con el crecimiento de los tumores. Entre estas poblaciones celulares se pueden encontrar:

-Linfocitos T regulatorios: Los LiTregs se caracterizan por una elevada expresión del factor de transcripción Foxp3, el cual está involucrado en la expresión de moléculas inmunoregulatorias. Estas células son reclutadas por las quimiocinas CCL17, CCL22 y CCL28, que son producidas en el MAT. Una vez allí, cumplen sus funciones regulatorias por diversos mecanismos entre lo que se pueden mencionar la inhibición de la función de LiT efectores a través de la producción de moléculas inmunosupresoras como TGF β , IL-10 y adenosina, el consumo de la IL-2 producida por LiTCD4⁺conv Th1 y la expresión de CTLA-4, un receptor que induce la expresión

de la enzima inmunoregulatoria indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en células dendríticas^{45, 46}.

-*Linfocitos regulatorios Tr1*: son Li regulatorios que no expresan Foxp3 y son inducidos a partir de la estimulación de LiTCD4⁺conv con IL-10 e IL-27. Son capaces de contribuir con el escape de los tumores produciendo IL-10 y TGFβ⁴⁷.

-*CSMs, células dendríticas tolerogénicas y macrófagos asociados a tumores*: Las CSMs se pueden dividir en dos grandes grupos, las mieloides granulocíticas y las monocíticas. Estas células suprimen la función de LiT efectores a través de la expresión de enzimas inmunoregulatorias como IDO, arginasa-1 e iNOS y la producción de TGFβ y prostaglandina E₂ (PGE₂). Además, las CSMs monocíticas suelen poseer una elevada expresión de PD-L1 en su superficie, el cual suprime la función de LiT efectores⁴⁸. Estos mismos mecanismos inmunoregulatorios también son utilizados por células dendríticas tolerogénicas y macrófagos asociados a tumores, aunque estos últimos también colaboran con el tumor produciendo grandes cantidades de VEGF y CCL22^{49, 50}.

-*LiTCD8⁺ con fenotipos regulatorios*: Varias subpoblaciones de LiTCD8⁺ regulatorias han sido descritas que, aunque minoritarias, pueden afectar el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral⁵¹. Así, LiTCD8⁺Foxp3⁺ con capacidad de suprimir la funcionalidad de LiTCD4⁺conv han sido descritos en cáncer colorectal y ovárico^{52, 53}. Otra subpoblación de LiTCD8⁺Foxp3⁺ regulatorios, restringida al reconocimiento de la molécula Qa1 en ratones, ha sido asociada con la eliminación LiTCD4⁺ T foliculares activados, lo cual suprime la generación de respuestas inmunes humorales frente a los antígenos tumorales⁵⁴. Por otro lado, Parodi y colaboradores identificaron LiTCD8⁺CD39⁺Foxp3⁻ en biopsias de pacientes con cáncer, observando que estas células eran capaces de modular la proliferación de células mononucleares de sangre periférica⁵⁵. Más allá de estos reportes sobre LiTCD8⁺ regulatorios, el origen de estas células no ha sido definido, como tampoco su fenotipo y funcionalidad más allá de sus funciones supresoras.

3.3 Producción de citoquinas y otras moléculas solubles inmunoregulatorias.

Las principales citoquinas inmunosupresoras producidas por células tumorales y células del sistema inmune son el TGFβ y la IL-10. Estas citoquinas suprimen la función de LiT inhibiendo la producción de IL-2, la activación citotóxica de LiTCD8⁺ y

la polarización de LiTCD4⁺conv a Th1. Por otro lado, el TGFβ es capaz de inducir la expresión del factor de transcripción Foxp3, favoreciendo la generación de LiTregs⁵⁶. La IL-10 puede también inducir una disminución en la expresión de moléculas del CMH I en las células tumorales, evitando su reconocimiento por los LiTCD8⁺⁵⁶. Otra molécula inmunoregulatoria importante en el MAT es la PGE₂, producida por la enzima ciclooxigenasa 2 en macrófagos y células tumorales. Esta molécula inhibe la síntesis de IFNγ, IL-12 y la maduración de células mieloides, favoreciendo en las mismas la adquisición de fenotipos regulatorios⁵⁶.

Los tumores también pueden sobreexpresar galectina-1, una proteína de unión a azúcares que puede inducir apoptosis en LiTCD4⁺conv Th1 y LiTCD8⁺ activados, inhibir la producción de IFNγ y favorecer la síntesis de IL-10⁵⁷.

El VEGF producido en el MAT, además de sus efectos proangiogénicos, también colabora con la inmunosupresión ya que promueve el reclutamiento de macrófagos de fenotipo M2 protumorales y e induce la expresión de moléculas inhibitorias en LiT^{56, 58, 59}. Por otro lado, citoquinas que en general son consideradas proinflamatorias también pueden ejercer efectos supresores en un contexto de inflamación crónica, como es el caso de la IL-6. Esta citoquina puede activar el factor de transcripción STAT3 en diferentes células, el cual promueve la expresión de muchas proteínas con funciones inmunomodulatorias y que además es esencial para el fenotipo regulatorio de LiTregs. Otro ejemplo está dado por la IL-27, la cual puede ser producida por varias células mieloides y se ha asociado a la inducción de células Tr1 y células dendríticas tolerogénicas^{60, 61, 62}.

3.4 Disfuncionalidad de linfocitos T: rol central del agotamiento en la fase de Escape.

La inducción de fenotipos disfuncionales de LiT es uno de los mecanismos de evasión más estudiados en los últimos años. Existen tres tipos de disfuncionalidad que han sido profundamente estudiados en cáncer: la anergia, la senescencia y el agotamiento.

-Anergia: La anergia de LiT es un estado de hiporespuesta caracterizado por baja producción de IL-2 y arresto en el ciclo celular como resultado de una activación inicial incompleta. Esto ocurre cuando el linfocito no recibe suficiente coestimulación por parte de las células presentadoras de antígenos. En estas condiciones, factores

de transcripción como Egr2 y NFAT y ciertas modificaciones epigenéticas se encargan de la inducción y mantenimiento de este fenotipo disfuncional⁶³.

-Senescencia: es un estado de disfunción de LiT que han sido correctamente activados pero que por diferentes motivos sufren daños a nivel de ADN, lo cual desencadena el programa de senescencia y el consecuente arresto en el ciclo celular. Este proceso ocurre naturalmente durante el envejecimiento, aunque también se ha observado en individuos jóvenes en el contexto del cáncer e infecciones crónicas. Las células senescentes sufren diversas alteraciones fenotípicas, entre las que se encuentran la pérdida de la expresión de receptores coestimuladores y de la producción de IL-2 y, en algunos casos, la adquisición de funciones inmunoregulatorias^{63, 64}.

-Agotamiento: es un estado de disfuncionalidad de los LiT que ocurre durante procesos inflamatorios crónicos, particularmente en infecciones virales y en cáncer. En líneas generales se caracteriza por una disminución en la función efectora de los linfocitos, una expresión sostenida de RIs y un estado transcripcional diferente al de LiT efectores y de memoria, lo cual previene un control óptimo de los tumores⁶⁵ (Figura 3).

Este fenotipo disfuncional ha sido principalmente descrito en LiTCD8⁺ y fue caracterizado por primera vez en modelos murinos de infección crónica con el virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML). Este estado se adquiere luego de la estimulación repetitiva a través del TCR en un contexto donde hay una gran cantidad de señales inhibitorias⁶⁵. Entre los estímulos inhibitorios más relevantes se encuentran aquellos gatillados por ligandos de RIs, los cuales pueden ser expresados por células tumorales y células inmunes regulatorias. Los RIs son expresados por los LiTCD8⁺ luego de su activación y como consecuencia de estimulaciones repetitivas. Entre los RIs más estudiados se puede mencionar a PD-1 (cuyo ligandos son PD-L1 y PD-L2), que es expresado rápidamente luego de la activación y regula la magnitud de las funciones efectoras de los LiTCD8⁺, siendo necesario para evitar una sobreactivación de los mismos⁶⁶. Sucesivas señalizaciones a través del TCR junto con la estimulación por citoquinas como IFNs de tipo I, TGFβ, IL-6, IL-27 y VEGF pueden llevar a la adquisición de otros RIs^{58, 62, 67, 68}. Además de PD-L1/PD-1, existen otras duplas ligando/RI entre las que se pueden destacar Galectina-9, CEACAM1, fosfatidilserina y HMGB1 que interaccionan con Tim-3, CMH II que interacciona con LAG-3, CD155 con TIGIT,

CD48 con 2B4, CD80 y CD86 con CTLA-4 y HVEM con CD160 y BTLA⁶⁹. Las señales inhibitorias que producen muchos de ellos son redundantes, mientras que otros funcionan de manera coordinada regulando distintas funciones biológicas, lo cual se ha demostrado en ratones infectados crónicamente con VCML⁷⁰. La mayoría de estos receptores inhiben la vía de señalización del TCR a través del reclutamiento de fosfatasa que defosforilan dianas importantes como PKB y PI3K. Por otro lado, algunos RIs promueven la acción de factores de transcripción involucrados en la transcripción de genes de agotamiento como BATF y Maf^{67, 68}. Además, se han reportado otros factores de transcripción involucrados en el agotamiento como son T-bet, Eomes y Blimp-1. Estos tres factores de transcripción son centrales en la regulación de la diferenciación a distintos fenotipos funcionales de los LiTCD8⁺^{71, 72}. Durante el agotamiento ocurren cambios en sus niveles de expresión y en las proteínas con las que interaccionan. Usualmente T-bet disminuye su expresión, mientras que Eomes y Blimp-1 aumentan y se mantienen elevados en el tiempo. Blimp-1 está involucrado en la diferenciación terminal de células efectoras, pero en altos niveles puede reprimir al gen de la IL-2 y favorecer la expresión de RIs. Eomes también participa en la adquisición de funciones efectoras en LiTCD8⁺, como en la síntesis de perforinas e IFN γ , sin embargo la sostenida expresión de este factor de transcripción lleva finalmente al agotamiento⁷². Paley y colaboradores demostraron que en base a la expresión de PD-1, T-bet y Eomes es posible identificar dos subpoblaciones de LiTCD8⁺ exhaustos⁷³. Una de ellas, denominada LiTCD8⁺ exhaustos progenitores, se caracteriza por un fenotipo PD-1^{int}T-bet^{high}Eomes^{low}, la cual se localiza en órganos linfoides y mantiene una alta capacidad de producir citoquinas y de proliferar. A partir de esta subpoblación surgen los LiTCD8⁺ exhaustos terminalmente diferenciados PD-1^{high}T-bet^{low}Eomes^{high} los cuales se encuentran en tejidos periféricos, como en tumores, y se caracterizan por haber perdido la mayoría de sus funciones efectoras^{73, 74}. Durante el agotamiento la pérdida en las funciones efectoras es gradual y jerárquica. Típicamente, los LiTCD8⁺ agotados o exhaustos pierden en primer lugar la capacidad de producir IL-2 y, aunque mantienen cierto nivel de división celular, pierden su capacidad de responder de forma proliferativa frente a un re-estímulo. En una etapa posterior las células pierden su capacidad de producir TNF α , mientras que en casos extremos de agotamiento severo los LiTCD8⁺ pierden su capacidad de producir IFN γ y por último entran en apoptosis⁶⁵. En cuanto a la citotoxicidad existen

reportes contradictorios, aunque los últimos sostienen que se mantiene cierta capacidad citotóxica^{45, 65}. De hecho, se ha propuesto que los LiTCD8⁺ exhaustos surgen como un mecanismo adaptativo evolutivo que evita la muerte del hospedador por una respuesta inmune exacerbada cuando la noxa no puede ser eliminada. Esto se lograría disminuyendo la capacidad de estas células de generar una respuesta inflamatoria, pero manteniendo cierto grado de citotoxicidad que les permite al menos contener el tumor o la infección^{65, 75, 76}.

Todos estos cambios fenotípicos están sostenidos por la adquisición de un programa transcripcional propio, el cual difiere sustancialmente del de células efectoras, de memoria y anérgicas⁷⁷. Uno de los procesos biológicos más afectados en los LiTCD8⁺ exhaustos es su metabolismo, el cual se encuentra seriamente comprometido debido a una menor expresión de proteínas de la maquinaria de traducción y del ciclo de Krebs⁷⁷. Estudios recientes demostraron que muchas insuficiencias bioenergéticas de los LiTCD8⁺ exhaustos están también mediadas por la señalización de PD-1, el cual inhibe la actividad de mTOR, la glicólisis, el metabolismo mitocondrial y diversas vías anabólicas⁷⁸. El tumor también es capaz de afectar el metabolismo de los LiTCD8⁺ a través de la competencia por la incorporación de nutrientes, cuya escasez colabora con el fenotipo disfuncional⁷⁹. Todos estos cambios metabólicos y funcionales se establecen de forma permanente, incluso cuando los LiTCD8⁺ exhaustos son removidos del ambiente en el cual reciben estimulación antigénica. Estudios recientes demostraron que rearrreglos en la estructura de la cromatina y determinadas marcas epigenéticas serían responsables de la estabilidad de este fenotipo^{80, 81, 82}.

Sin bien la gran mayoría de los estudios sobre LiTCD8⁺ exhaustos fueron realizados en el contexto de infecciones crónicas, Sakuishi y colaboradores demostraron que subpoblaciones de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores en distintos modelos murinos de cáncer coexpresaban PD-1 y Tim-3, y que estas células poseían un fenotipo disfuncional⁸³. Esto llevó también a la identificación de LiTCD8⁺ exhaustos en pacientes con melanoma mediante el análisis de la coexpresión de dos o más RIs, usualmente PD-1 y Tim-3 o PD-1 y TIGIT^{84, 85, 86}. Estos avances permitieron estudiar el estado transcriptómico y la funcionalidad de estas subpoblaciones celulares. Desde entonces, numerosos estudios han asociado la presencia de LiTCD8⁺ exhaustos infiltrantes de tumores a un mal pronóstico en pacientes con cáncer⁸⁷. Debido a ello actualmente muchas estrategias inmunoterapéuticas apuntan a

revigorizar a esta población celular a través de la administración de anticuerpos monoclonales bloqueantes de los RIs⁷⁵.

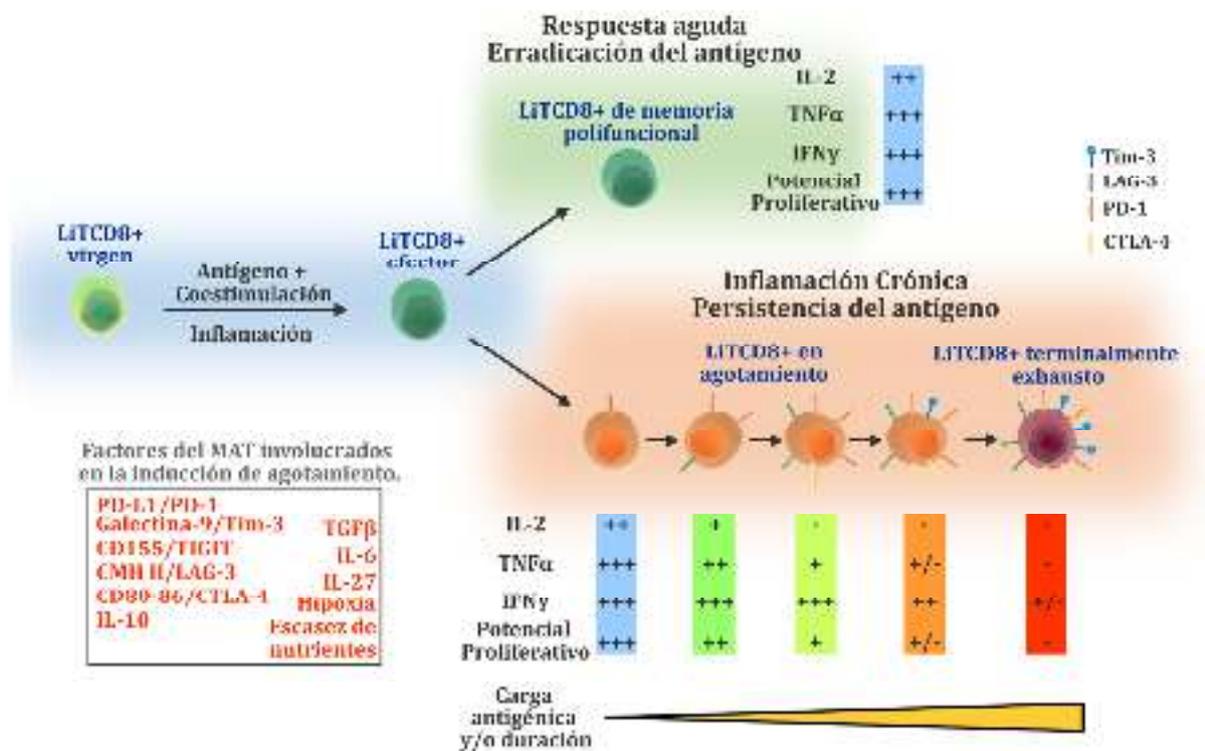


Figura 3: El agotamiento de LiTCD8⁺. Al inicio de la respuesta inmune antitumoral los LiTCD8⁺ vírgenes son activados a través de la presentación de antígenos y coestimulación por células dendríticas, y por señales inflamatorias como citoquinas o DAMPs. La erradicación de las células tumorales por los LiTCD8⁺ efectoras permite la generación de LiTCD8⁺ de memoria que persisten en el tiempo y son altamente polifuncionales, capaces de proliferar y coproducir IFN γ , TNF α e IL-2 al ser estimuladas. Durante una inflamación crónica, como la que se da en el microambiente de tumores en la fase de Escape, los LiTCD8⁺ reciben estimulaciones repetidas en el TCR y una amplia variedad de señales inhibitorias (ver recuadro). Estas señales llevan a los LiTCD8⁺ a perder sus funciones efectoras y expresar RIs de forma gradual. Finalmente, los LiTCD8⁺ llegan a un estadio terminalmente exhausto en el cual ya no pueden responder frente a sus estímulos específicos y eventualmente mueren por apoptosis. La severidad del agotamiento se correlaciona normalmente con la carga antigénica y/o la duración del proceso inflamatorio. La producción de cada citoquina y el potencial proliferativo se valoran desde muy alto (+++) a nulo (-). *Adaptado de Wherry E.J. Nature Immunology 2011.*

3.5 Expresión de enzimas inmunoregulatorias: modulación de señales purinérgicas por CD39 y CD73.

Muchos tipos de células tumorales y células del sistema inmune expresan altos niveles de distintas enzimas que tienen funciones inmunoregulatorias. Entre ellas, destacan laIDO, arginasa-1, las diferentes isoformas de la NOS y las ectoenzimas CD39 y CD73. En general, las primeras tres actúan a través de la privación de aminoácidos como triptófano y arginina, los cuales son esenciales para la

funcionalidad de LiT, a la vez que producen compuestos tóxicos como quinureninas y óxido nítrico⁵⁶. Por otro lado, CD39 y CD73 participan en la modulación de la señalización purinérgica, un fenómeno al cual se le ha dado mucha importancia en los últimos años ya que ha demostrado tener un papel fundamental en la generación del MAT inmunosupresor. El sistema purinérgico está compuesto por una gran cantidad de enzimas, receptores y metabolitos solubles los cuales están involucrados en la regulación fina de diversos procesos biológicos, entre los que se encuentra la actividad de las células del sistema inmune. Mediadores purinérgicos como el ATP y la adenosina son liberados al espacio extracelular frente a alteraciones fisiológicas como daños en los tejidos e inflamación (Figura 4). El ATP es liberado a partir de las células del organismo por mecanismos que incluyen la lisis de la células, exocitosis de distintos tipos de vesículas o a través de canales proteicos de la membrana citoplasmática⁸⁸. Las células del sistema inmune reconocen el ATP extracelular (ATPe) como un DAMP y responden desencadenando procesos inflamatorios. En el MAT una alta cantidad de células tumorales, estromales e inmunes mueren por necrosis, lo cual lleva a una alta concentración de ATPe en el líquido intersticial. Además, al ser estimulados, los LiT y los neutrófilos son capaces de liberar ATP al espacio extracelular a través de panexinas y conexinas, reforzando su propia activación de manera autocrina y la de las células adyacentes⁸⁹.

Los receptores de los metabolitos purinérgicos se clasifican en P1 (receptores de adenosina), P2Y (receptores de varios tipos de nucleótidos) y P2X (receptores de ATPe). En el caso de neutrófilos y macrófagos el ATPe liberado sinergiza a través de receptores P2X con señales quimiotractantes para activar a las células y guiarlas hacia el foco inflamatorio. El ATPe también puede inducir la secreción de la quimiocina IL-8 y activar el complejo del inflamosoma en células mieloides, lo cual lleva a la amplificación de la respuesta inflamatoria gracias a la secreción de IL-1 β . En LiT el ATPe contribuye en la amplificación de la señal de activación que reciben por el TCR y es necesario para la producción de IL-2 e IFN γ ^{89, 90}. Altos niveles de ATPe también son capaces de inducir la maduración y producción de citoquinas proinflamatorias en células dendríticas, mientras que por otro lado inhiben la expansión y función supresora de LiTregs y Tr1^{60, 88, 91}.

El ATPe puede ser hidrolizado por ectoenzimas solubles o localizadas en la superficie de distintos tipos celulares, lo cual disminuye la estimulación

proinflamatoria. Existen varios tipos de enzimas capaces de degradar este metabolito entre las cuales se encuentran fosfatasas alcalinas, pirofosfatasas y fosfodiesterasas⁹². Sin embargo, las enzimas CD39 y CD73 son las principales reguladoras del metabolismo de nucleótidos en la inmunidad e inflamación⁸⁸.

La enzima CD39, también denominada “ectonucleósido trifosfato difosfohidrolasa-1” (ENTDP1), es una proteína integral de membrana que hidroliza ATP y ADP a AMP. Es integrante de una familia de ocho ENTDPasas, de las cuales solo ENTDP1, 2, 3 y 8 son extracelulares⁹³, aunque en el caso de LiT se ha observado que dependen casi exclusivamente de ENTDP1 para hidrolizar ATPe^{94, 95}. La enzima se activa catalíticamente una vez expresada en superficie y luego de su correcta glicosilación⁹³. CD39 se expresa en varios tejidos como placenta, pulmones y bazo, principalmente en la superficie de células endoteliales, donde regula fenómenos como la coagulación. También se expresa constitutivamente en células del sistema inmune como LiB, células NK, neutrófilos y LiTregs, siendo un marcador clásico de las dos últimas poblaciones celulares^{88, 95}. En otras células inmunes esta enzima puede ser inducida por citoquinas proinflamatorias como IL-6 e IL-27^{61, 96}, antiinflamatorias como TGFβ⁹⁷, por estrés oxidativo y por hipoxia^{98, 99}, para lo cual es crucial la participación de factores de transcripción como Sp1, AhR, HIF-1α y STAT3^{88, 100}. Al eliminar el ATPe, CD39 favorece la estabilización del fenotipo supresor de LiTregs y promueve la diferenciación de LiTr1. Además, esta enzima le otorga funciones inmunosupresoras a LiT efectores como los LiTCD4⁺ Th17 y a células dendríticas¹⁰⁰. Finalmente, CD39 puede estar también sobreexpresada en distintos tipos de células tumorales y en células endoteliales presentes en el MAT, lo cual contribuye a la eliminación del ATPe como DAMP y les otorga un potencial inmunosupresor^{88, 101, 102}.

Un segundo paso en la vía catalítica del ATP está dado por la enzima CD73, también conocida como ecto-5'-nucleotidasa (NT5E). Esta enzima se encuentra anclada a la membrana citoplasmática y tiene la capacidad de hidrolizar AMP a adenosina, además de poseer funciones en adhesión celular y coestimulación en LiT¹⁰³. Para que CD73 sea catalíticamente activa necesita de la acción coordinada de CD39, ya que altos niveles de ATPe y ADPe inhiben su función. CD73 está presente en varios tejidos y su expresión en células del sistema inmune depende en gran medida del balance de citoquinas en el ambiente. Su expresión es estimulada por TGFβ, TNFα, IL-1β, PGE₂ e hipoxia^{88, 97}, aunque puede ser inhibida por otras

citoquinas como IL-12, IL-4, IL-21 e IFN γ ⁹⁷. Además, su expresión también se encuentra aumentada en algunos tipos de tumores, lo cual favorece la inmunosupresión mediada por adenosina en el MAT¹⁰⁴. Algunos tumores tienen incluso la capacidad de liberar pequeñas vesículas llamadas exosomas, las cuales poseen en su superficie CD39 y CD73 y actúan a distancia generando un microambiente supresor en nichos metastásicos ⁹².

La adenosina cumple un rol crucial en la generación de un MAT inmunosupresor. Este metabolito actúa interaccionando con los receptores P1, entre los cuales se encuentran los A1, A2 y A3. En monocitos y macrófagos, la adenosina promueve la adquisición de un fenotipo M2, con elevada expresión de arginasa-1 y producción de VEGF. Además, inhibe la maduración de células dendríticas y la producción de quimiocinas que reclutan LiTCD8⁺ al MAT. Por otro lado, la adenosina promueve la expansión de CMSs y LiTregs, que a su vez expresan CD39 y CD73 y amplifican esta vía purinérgica ¹⁰⁵. La adenosina también es capaz de inhibir la actividad de LiTCD4⁺conv Th1, LiTCD8⁺ efectores y células NK, afectando su potencial proliferativo y citotóxico, y su capacidad de producir IFN γ , IL-2 y TNF α ^{92, 106}. Por otro lado, este metabolito puede tener diferentes efectos sobre las propias células tumorales, promoviendo la proliferación en aquellas que expresan los receptores A1, A2A y A2B⁹².

Los niveles de adenosina pueden ser controlados por adenosina deaminasas (ADA), las cuales la hidrolizan a inosina eliminando así su potencial inmunosupresor. En humanos la ADA puede estar anclada a la membrana de las células de manera indirecta a través de interacciones con la proteína de membrana CD26. En algunos tipos de tumores y en LiTregs la expresión de ADA y/o CD26 se encuentra disminuida lo que favorece la acumulación de adenosina en el MAT ⁹².

La presencia de CD39 y CD73 en el MAT ha sido asociada a la progresión tumoral en modelos murinos y a un mal pronóstico en pacientes con cáncer. En ratones se ha observado que la deficiencia de CD73 favorece un aumento en la inmunidad antitumoral y resistencia a metástasis experimentales, mientras que la expresión de CD39 en LiTregs infiltrantes de tumores promueve el crecimiento de tumores hepáticos ^{107, 108}. En pacientes con cáncer gástrico una elevada tasa de células CD39⁺ y baja de CD8⁺ se asocia a un pronóstico adverso ¹⁰⁹. Debido a todo esto, en la actualidad se ha propuesto el bloqueo de distintos componentes del sistema

purinérgico como estrategia terapéutica, desarrollándose una gran cantidad de inhibidores y algunos anticuerpos monoclonales bloqueantes ¹¹⁰.

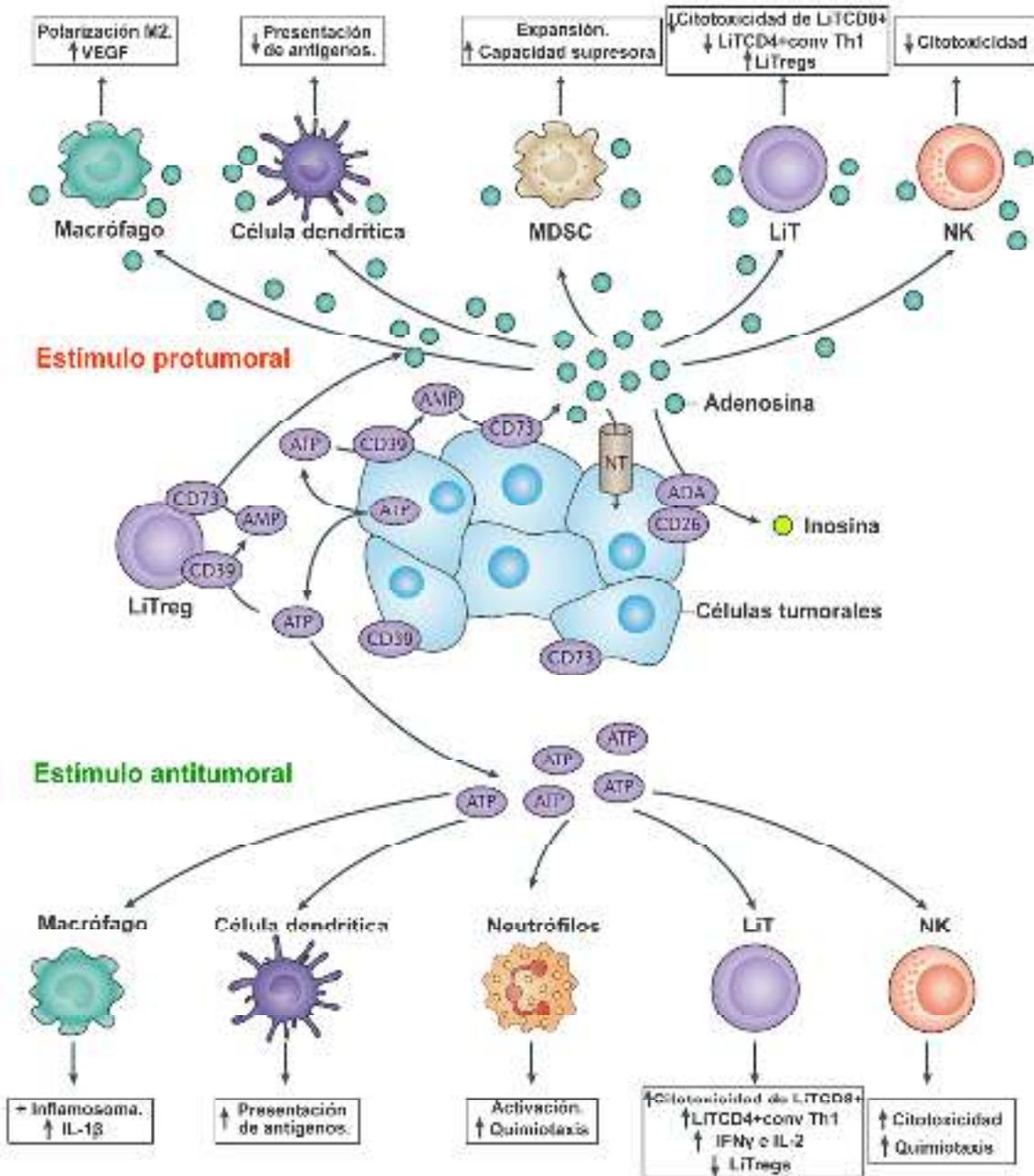


Figura 4: El sistema purinérgico en el microambiente tumoral. El ATP se libera desde el citoplasma de células al medio extracelular a través de varios mecanismos, siendo uno de los más relevantes la muerte necrótica de las células tumorales. El ATP extracelular es un metabolito proinflamatorio que puede activar a células de la inmunidad innata y adaptativa de múltiples formas, como se señala en los recuadros inferiores para cada una de ellas. Alternativamente, las ectoenzimas CD39 y CD73, expresadas por células tumorales y algunas subpoblaciones inmunes como los LiTregs, trabajan juntas para hidrolizar el ATP a adenosina. Esta molécula posee una amplia variedad de efectos inmunosupresores, cumpliendo un rol crucial en la evasión de la respuesta inmune por parte de los tumores (recuadros superiores). Las ADA pueden hidrolizar la adenosina eliminando su potencial inmunosupresor; sin embargo, muchos tumores promueven la acumulación de adenosina disminuyendo la expresión de ADA o de la molécula de anclaje a membrana CD26, *Adaptado de Antonioli L. Nature Reviews Cancer 2013.*

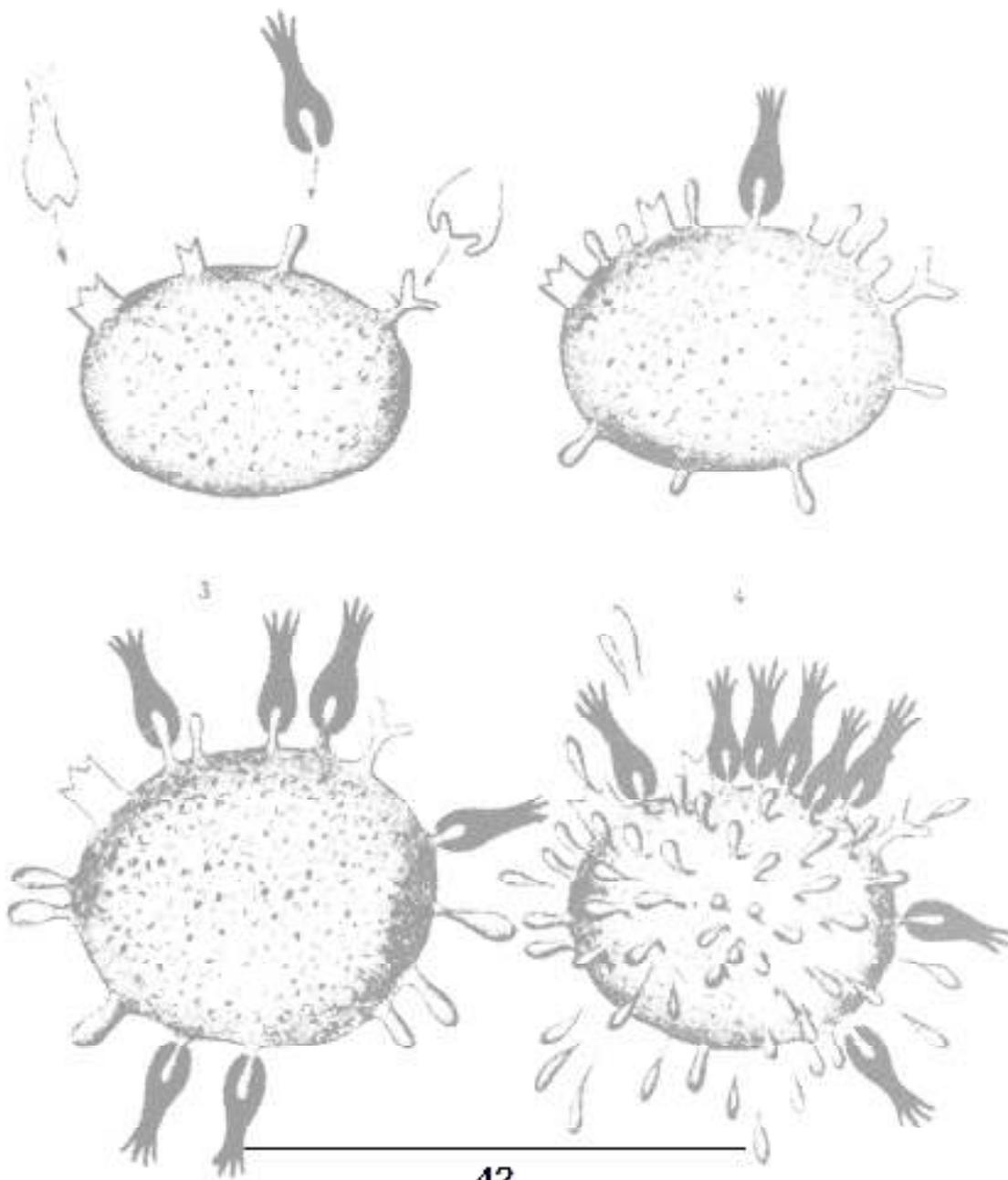
El bloqueo *in vitro* de CD39 en células tumorales con los inhibidores ARL67156 y POM-1 demostró ser capaz de disminuir su capacidad inmunosupresora sobre LiT¹⁰². El inhibidor POM-1 también se ha utilizado en modelos experimentales *in vivo* favoreciendo una mejora en la respuesta inmune antitumoral, una disminución en el número de metástasis y mayor muerte inmunogénica de células tumorales. Experimentos con células humanas demostraron que anticuerpos bloqueantes de CD39 inhibían la capacidad de LiTregs de suprimir la función efectora de LiTCD8⁺⁹⁴. Por otro lado, tratamientos con anticuerpos monoclonales e inhibidores dirigidos contra CD73 también mostraron una mejora en la respuesta inmune en distintos modelos, llegándose a probar un anticuerpo bloqueante en fase clínica en pacientes¹¹⁰.

3.6 Expresión de CD39 en LiTCD8⁺.

Generalmente, los LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores son asociados a un buen pronóstico en pacientes con cáncer. Sin embargo, como se ha comentado previamente existen subpoblaciones de LiTCD8⁺ con fenotipos disfuncionales y regulatorios. En cuanto a la expresión de ectoenzimas inmunoregulatorias en humanos alrededor de un 50% de los LiTCD8⁺ circulantes expresan CD73, mientras que menos de un 5% expresa CD39¹¹⁰. De hecho, entre las subpoblaciones de LiT suele atribuirse la expresión de CD39 casi exclusivamente a LiTregs, Tr1 y LiTCD4⁺conv Th17¹⁰⁰. Sin embargo, en un estudio pionero a principios de los '90 se reportó la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ humanos activados alogénicamente *in vitro*. En dicho estudio la expresión de la ectoenzima se asoció a una subpoblación con elevada capacidad citotóxica¹¹¹. En 2009 Hilchey y colaboradores reportaron la presencia de LiTCD4⁺ y CD8⁺ que expresaban CD39 en muestras de pacientes con linfoma folicular. En este trabajo, el bloqueo de CD39 o de los receptores de adenosina en el conjunto de LiT infiltrantes producía un aumento en la capacidad efectora de los mismos, indicando que la señalización purinérgica modulaba la funcionalidad de estas células de manera autocrina y/o paracrina¹¹². Posteriormente otro grupo reportó la presencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en pacientes con leucemia linfocítica crónica, donde su frecuencia fue correlacionada con una mayor severidad de la enfermedad¹¹³. Al poco tiempo Parodi y colaboradores también detectaron

estas células en pacientes con cáncer colorectal, de vejiga y renal, observando que la expresión de la ectoenzima les confería características inmunosupresoras ⁵⁵. Desde estos últimos reportes el estudio de LiTCD8⁺CD39⁺ en pacientes con cáncer no fue continuado, ni tampoco abordado en modelos experimentales murinos. Por estos motivos, el estado de diferenciación y la funcionalidad efectora de estas células en el MAT aún no se conoce en profundidad, como tampoco las señales que inducen la expresión de la ectoenzima en estas células.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



Hipótesis de trabajo

Numerosos trabajos han reportado que los tumores sólidos están infiltrados por células tumorales. Sin embargo, también se ha reportado la existencia de subpoblaciones de LiTCD8^+ con fenotipos disfuncionales, que pierden su capacidad de producir citoquinas proinflamatorias, y regulatorias que pueden modular la funcionalidad de otras células del sistema inmune. Los estudios sobre estos últimos se contraponen al paradigma de los LiTCD8^+ como células del sistema inmune que cumplen exclusivamente un rol protector frente al cáncer.

En este contexto, *postulamos que la prolongada exposición por parte de los LiTCD8^+ infiltrantes de tumores a estímulos proinflamatorios e inmunosupresores propios del MAT favorecería la adquisición de distintos perfiles funcionales y la expresión de moléculas inmunoregulatorias como las ectoenzimas CD39 y CD73. Dichas moléculas regulatorias podrían modular y/o ser indicativas del estado de diferenciación y la funcionalidad de estas células, como así también tener un impacto en la respuesta inmune frente a tumores.*

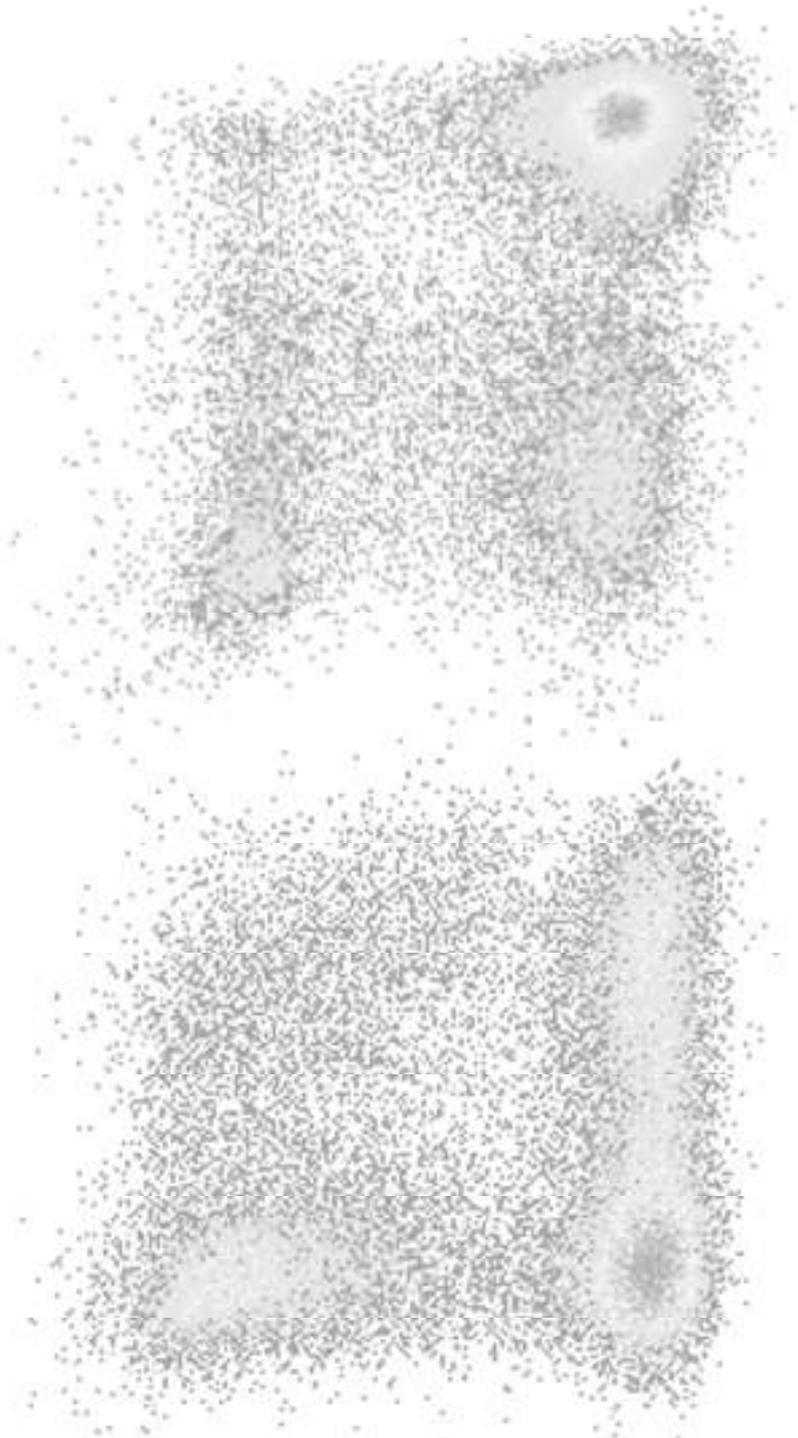
Objetivo general:

Estudiar el fenotipo y la funcionalidad de LiTCD8⁺ que expresan ectonucleotidasas inmunoregulatorias en el contexto de la respuesta inmune antitumoral, evaluando a su vez el posible impacto que tendrían estas células en la progresión tumoral.

Objetivos específicos:

- A. Evaluar la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ y otras células del sistema inmune en modelos experimentales murinos de cáncer, analizando los cambios de expresión de las mismas en base a la progresión e inmunogenicidad de los tumores.
- B. Realizar una caracterización fenotípica y funcional de las subpoblaciones de LiTCD8⁺ que expresen CD39 y CD73 en animales inyectados con líneas tumorales.
- C. Evaluar el posible rol inmunoregulatorio de los LiTCD8⁺ que expresan ectoenzimas inmunoregulatorias.
- D. Analizar la presencia, fenotipo y funcionalidad de LiTCD8⁺ que expresen CD39 y/o CD73 en muestras de pacientes con cáncer.
- E. Evaluar señales que podrían estar involucradas en la inducción de la expresión de ectonucleotidasas en LiTCD8⁺.

RESULTADOS



Expresión de ectoenzimas inmunoregulatorias en el MAT en el contexto de la respuesta inmune antitumoral.

1.1 Estudio de la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ en modelos experimentales murinos de cáncer.

Con el objetivo de abordar el estudio de la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ y su posible contribución a la señalización purinérgica en el MAT, se utilizaron diversos modelos experimentales murinos de cáncer. Como modelo principal fue utilizada la línea tumoral B16F10-OVA, una línea celular de melanoma capaz de inducir tumores sólidos en ratones C57BL/6. Esta línea tumoral cuenta con la ventaja de expresar la proteína foránea ovoalbúmina (OVA), ya que está transfectada con un plásmido que la codifica ¹¹⁴. La OVA aporta mayor inmunogenicidad al tumor B16F10, lo cual permite estudiar la respuesta de LiTCD8⁺ específicos para este antígeno mediante distintas herramientas. Además, se utilizaron otros modelos experimentales, tanto en ratones C57BL/6 como en ratones de la cepa BALB/c, con el fin de comparar la expresión de las ectoenzimas en células infiltrantes provenientes de distintos MATs y en tumores con distintos grados de inmunogenicidad.

Durante este trabajo se realizó un estudio general de las células infiltrantes de tumores B16F10-OVA y de la expresión de CD39 y CD73 en las mismas. Para ello, se obtuvieron tumores, bazo y GDs de ratones C57BL/6 en el día 17 p.i.. Mediante citometría de flujo (CF) se identificaron diferentes poblaciones celulares inmunes utilizando anticuerpos dirigidos contra el marcador pan-leucocitario CD45 (solo en tumor), y luego contra los marcadores que se detallan en la sección de Materiales y Métodos donde se muestran la estrategia de “*gates*” fundamentales que fueron utilizadas para el análisis en GDs y tumores.

En un primer análisis se estudió la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA, observándose un contraste

significativo en la expresión de ambas enzimas entre tumores y órganos linfoides (Figura 1A). En los tumores una alta frecuencia de LiTCD8⁺ expresaban la ectoenzima CD39, aunque la mayoría de los LiTCD8⁺CD39⁺ no coexpresaban CD73. En bazo y GDs, la mayor parte de los LiTCD8⁺ expresaban CD73, mientras que un porcentaje muy bajo de ellos expresaba CD39 en su superficie. Al comparar con los órganos linfoides se hizo evidente la frecuencia significativamente mayor de LiTCD8⁺ que expresaban CD39 en tumores (Figura 1B). Además, los LiTCD8⁺CD39⁺ infiltrantes de tumor presentaban una mayor intensidad de expresión de la ectoenzima, comparada con la observada en los LiTCD8⁺CD39⁺ de bazos y GDs. A su vez, en los órganos linfoides una mayor frecuencia de LiTCD8⁺ expresaban CD73 (Figura 1C).

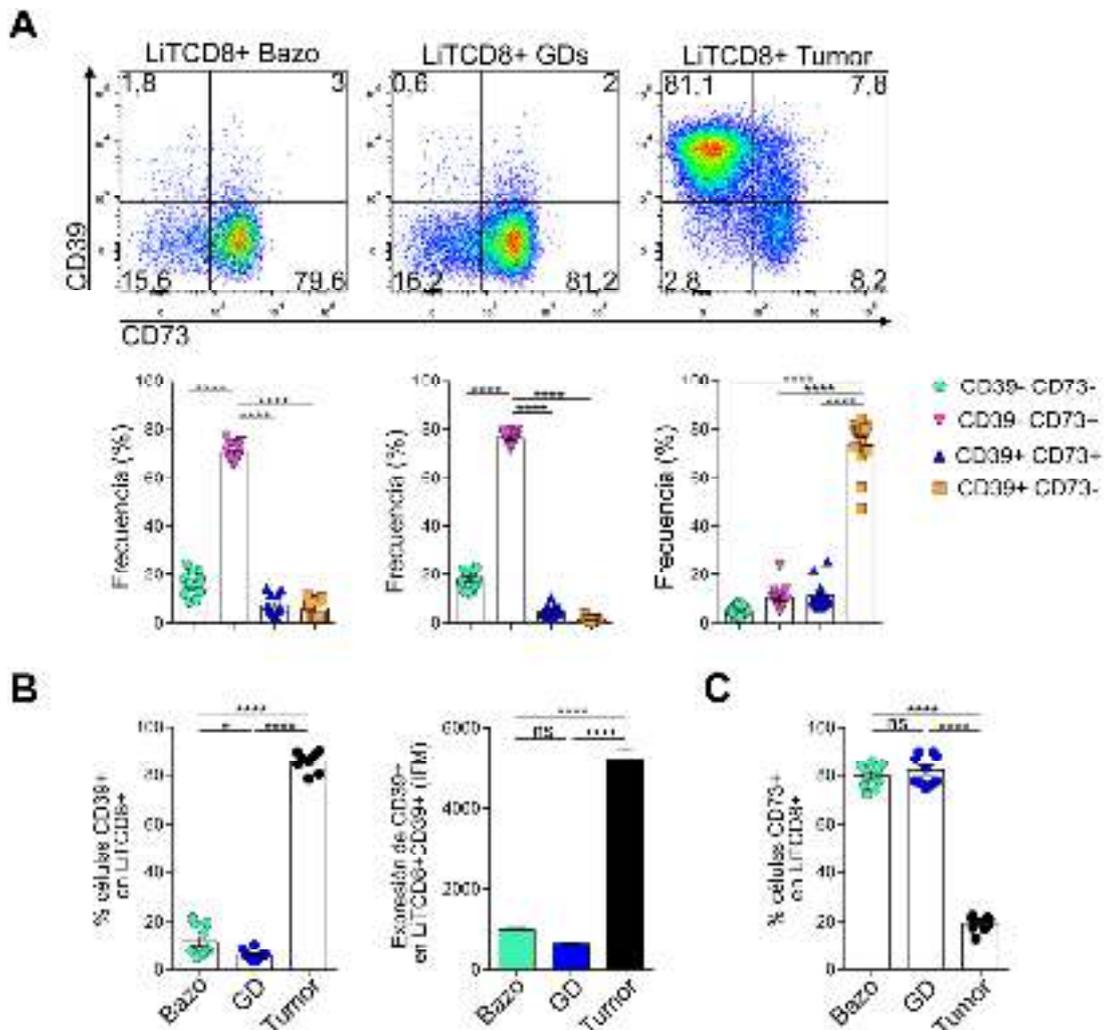


Figura 1: LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA poseen una alta expresión de la ectoenzima CD39. **A,** Los “dot plots” representativos obtenidos mediante CF y gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ obtenidos *ex vivo* que expresan CD39 y CD73 en tumores, GDs y bazos de ratones con tumores B16F10-OVA (n=12). **B,** Los gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 en los tejidos mencionados (izquierda), y la intensidad de expresión de CD39 en LiTCD8⁺CD39⁺ (derecha) (n=10). **C,** El gráfico de barras muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD73 en los distintos tejidos indicados (n=10). Todos los resultados son representativos de 3-5 experimentos independientes (6-12 ratones por experimento) Datos presentados como media±EEM (Error estándar de la media); ns: no significativo, * P<0,05; ****P<0,0001.

Con el objetivo de determinar si estas observaciones eran reproducibles en tumores de distintos orígenes histológicos se analizó la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ de ratones inyectados con las líneas tumorales MCA-OVA, 4T1 y CT26 (Figura 2A).

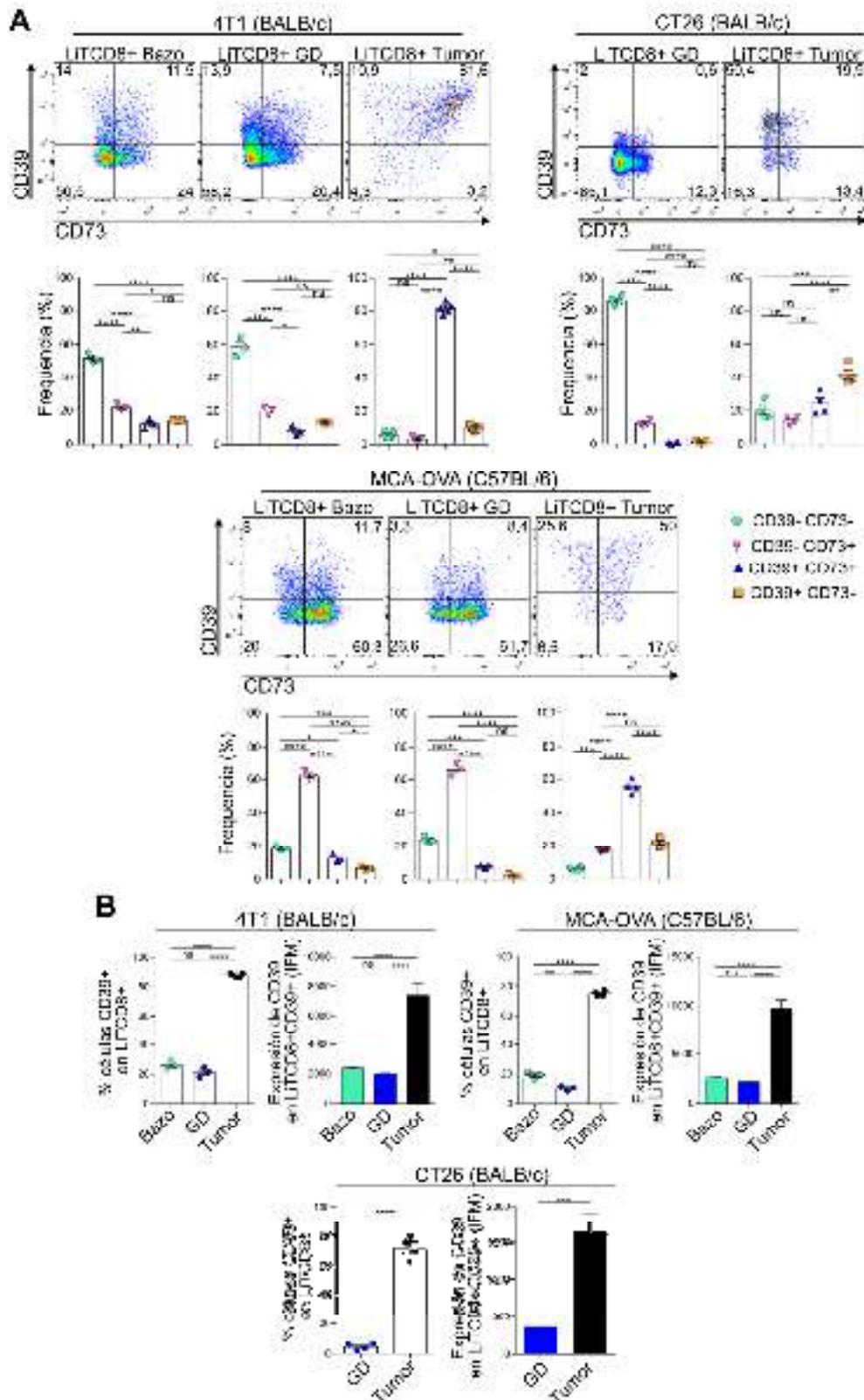


Figura 2: LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores murinos poseen una alta expresión de la ectoenzima CD39, pero variable expresión de CD73. **A,** “Dot plots” representativos y gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73 en tumores, GDs y bazos de ratones con tumores 4T1, MCA-OVA y CT26 (n=3-5). **B,** Gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 en los tejidos mencionados, y la intensidad de expresión de CD39 en LiTCD8⁺CD39⁺ (n=3-5). Resultados representativos de 2 experimentos independientes (3-6 ratones por experimento). Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo, *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ****P≤0,0001.

De manera similar a lo observado en el modelo B16F10-OVA, una alta frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ intratumorales fue detectada en todos los modelos estudiados, mientras que LiTCD8⁺ de órganos linfoides mostraron una baja frecuencia de esta población celular. Sin embargo, fue llamativa la expresión de CD73, la cual fue muy variable de un modelo a otro. Por un lado, alrededor de un 80% de los LiTCD8⁺ intratumorales coexpresaron CD39 y CD73 en el modelo 4T1, mientras que en el modelo MCA-OVA este porcentaje alcanzó un 50% y en el CT26 alrededor de un 20%. En todos los modelos experimentales evaluados se observó que en tumores no solo la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresaban CD39 era mayor que en órganos linfoides, sino que también los LiTCD8⁺CD39⁺ intratumorales mostraron mayor intensidad de expresión de la ectoenzima (Figura 2B).

1.2 Estudio de la expresión de ectoenzimas en LiTCD8⁺ obtenidos de órganos linfoides de ratones normales o inyectados con líneas tumorales.

En la Figura 2 se observó una marcada diferencia en la frecuencia de LiTCD8⁺CD73⁺ en órganos linfoides de animales C57BL/6 y BALB/c inyectados con sus correspondientes líneas celulares. Para determinar si la presencia del tumor y la cepa de ratón utilizada tienen influencia en la expresión de las ectoenzimas en órganos linfoides, se analizó la frecuencia de LiTCD8⁺ CD39⁺ y CD73⁺ en bazo y ganglios de ratones normales libres de tumores, de ambas cepas, y se comparó con los mismos órganos de ratones con tumores (Figura 3A y B). Como se observa en la figura, en los ratones de la cepa C57BL/6 la presencia del tumor no alteró la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresaban CD39 ó CD73 en GDs y bazo. Sin embargo, en ratones BALB/c la presencia de tumores 4T1 indujo un aumento en la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en GDs, pero no en bazo, y en la frecuencia de LiTCD8⁺CD73⁺ en bazo y GDs. En cuanto a tumores CT26, su presencia no aumentó la expresión de CD39 ni de CD73 en GDs. Estos hallazgos resaltan la importancia del estudio de la expresión basal de CD73 en LiTCD8⁺ en diferentes cepas de ratones, la cual debería ser considerada al estudiar señalizaciones purinérgicas en estos modelos.

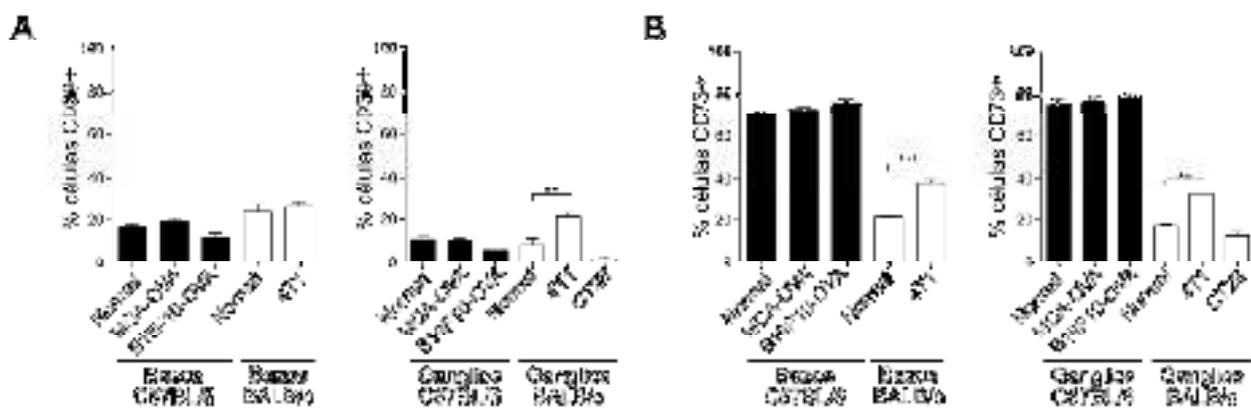


Figura 3: Una baja frecuencia de LiTCD8⁺ expresa CD39 en órganos linfoides murinos, mientras que la expresión de CD73 varía entre cepas de ratones. **A,** Gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺, determinada mediante CF, que expresan CD39 en ganglios y bazos de ratones con tumores (MCA-OVA, B16F10-OVA, 4T1 y CT26) y sin tumores (Normal), de las cepas C57BL/6 (en negro) y BALB/c (en blanco) (n=3-7). **B** Gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD73 en ganglios y bazos de ratones con y sin tumores, de las cepas C57BL/6 y BALB/c (n=3-7). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; **P≤0,01; ***P≤0,001.

1.3 Subpoblaciones de LiTCD8⁺ intratumorales definidas por la expresión de CD39 y su dinámica durante la progresión tumoral.

El hecho de que la alta expresión de CD39 en LiTCD8⁺ se haya mostrado como un fenómeno conservado a través de diferentes modelos y cepas de ratones sugirió que la inducción de la ectoenzima en esta población celular podría ser altamente relevante en la biología del MAT. Por lo tanto, durante el desarrollo de esta tesis doctoral se profundizó en el estudio de los LiTCD8⁺CD39⁺. Al analizar más detalladamente la expresión de CD39 en los LiTCD8⁺ intratumorales se pudieron diferenciar dos subpoblaciones de células CD39⁺, una con alta expresión de la enzima y otra con una expresión intermedia de la misma, las cuales fueron denominadas CD39^{high} (alta) y CD39^{int} (intermedia), respectivamente. La población de LiTCD8⁺CD39^{high} solo fue detectada en tumores, mientras que los LiTCD8⁺CD39⁺ presentes en GDs y bazo solo mostraron una expresión intermedia de la enzima (Figura 4A). Resultados similares fueron obtenidos al analizar la población de LiTCD8⁺CD39⁺ en otros modelos tumorales murinos (Figura 4B).

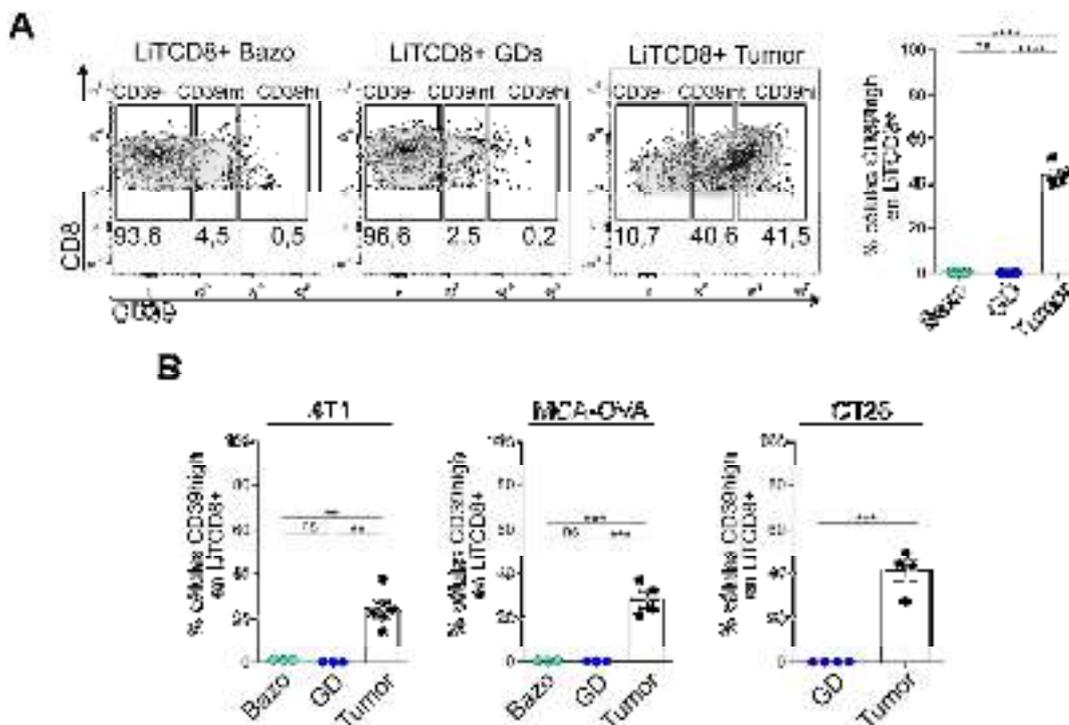


Figura 4: LiTCD8⁺ muestran distintos niveles de expresión de CD39, encontrándose LiTCD8⁺CD39^{high} solo en el MAT. **A**, "Density plots" obtenidos por CF muestran la frecuencia *ex vivo* de LiTCD8⁺ que expresan CD39 con intensidad alta (high) o intermedia (int) o que no lo expresan (CD39⁻), en ganglios, bazos y tumores de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA. El gráfico de barras (derecha) muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ con alta expresión de CD39 en los tejidos indicados (n=6). **B**, Gráficos de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ con alta expresión de CD39 en órganos linfoides y tumores de ratones con tumores 4T1, MCA-OVA y CT26 (n=3-5). Resultados representativos de 2-5 experimentos

independiente. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; ** $P\leq 0,01$; *** $P\leq 0,001$; **** $P\leq 0,0001$.

Teniendo en cuenta que la población de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ se encontró exclusivamente asociada al MAT, se prosiguió a determinar si la progresión del tumor o una carga tumoral inicial diferente podrían afectar la frecuencia de las subpoblaciones de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$, CD39^{int} y $\text{CD39}^{\text{high}}$. Para abordar el primer interrogante se estudió el porcentaje de LiTCD8^+ infiltrantes de tumor en ratones inyectados con la línea B16F10-OVA a los días 10, 17 y 24 p.i. (Figura 5A). El estudio cinético demostró que la frecuencia de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ intratumorales incrementaba con el tiempo, mientras que las subpoblaciones CD39^- y CD39^{int} disminuían, indicando que el desarrollo del tumor promueve la inducción de la ectoenzima. Llamativamente, el porcentaje de $\text{LiTCD8}^+\text{CD73}^+$ intratumorales también disminuyó con la progresión tumoral (Figura 5B).

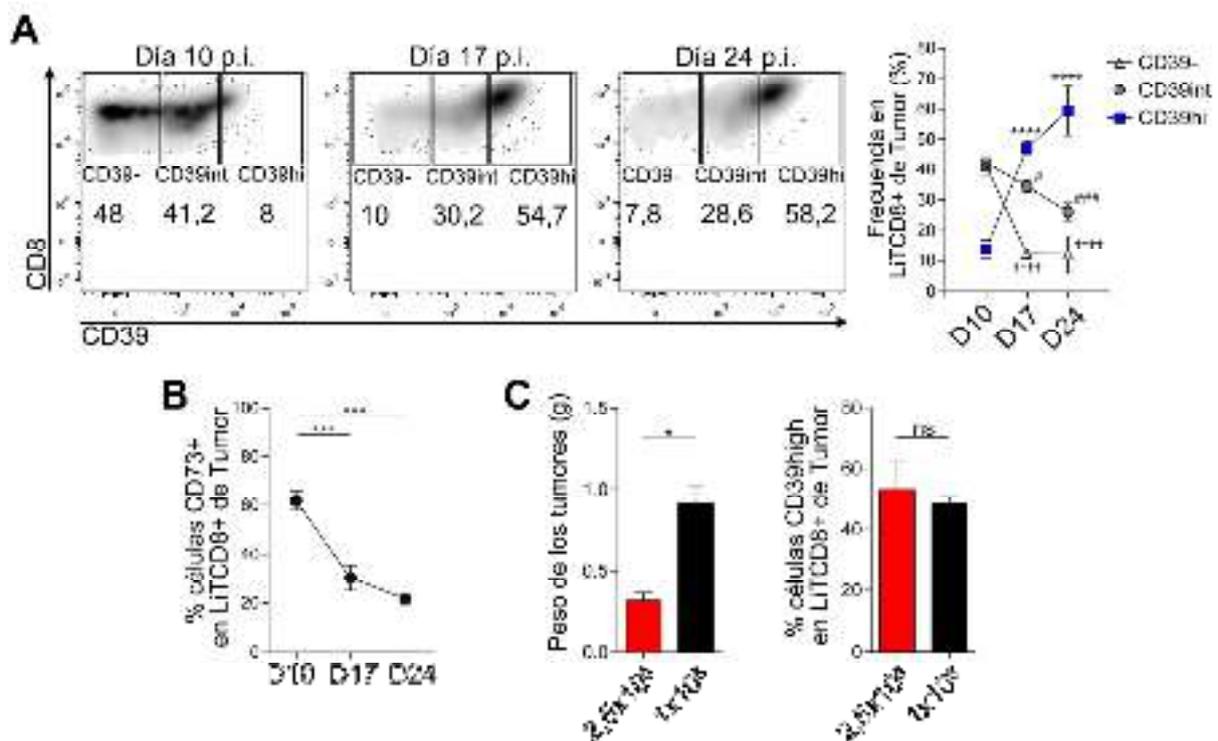


Figura 5: La frecuencia de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ aumenta con la progresión tumoral. **A**, “Density plots” obtenidos por CF muestran la frecuencia *ex vivo* de LiTCD8^+ que expresan CD39 con intensidad alta (high) o intermedia (int) o que no lo expresan (CD39^-), en tumores B16F10-OVA a los días 10, 17 y 24 p.i. El gráfico de líneas (derecha) muestra la frecuencia de LiTCD8^+ con diferentes niveles de expresión de CD39 durante la progresión tumoral. El análisis estadístico muestra comparación de medias entre día 10 p.i. vs. días 17 y 24 (* para $\text{CD39}^{\text{high}}$, # para CD39^{int} y † para CD39^-) (n=4-6 por día p.i.). **B**, El gráfico de líneas muestra la frecuencia de $\text{LiTCD8}^+\text{CD73}^+$ en los tumores durante la progresión tumoral (n=4-6 por día p.i.). **C**, Los gráficos de barras muestran el peso de tumores B16F10-OVA (izquierda) y la frecuencia de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ (derecha) en grupos de animales que han sido inyectados con $2,5 \times 10^5$ ó 1×10^6 células tumorales (n=4). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como

media±EEM; ns: no significativo; * $P\leq 0,05$; # $P\leq 0,05$; *** $P\leq 0,001$; ### $P\leq 0,001$; **** $P\leq 0,0001$; †††† $P\leq 0,0001$.

Para evaluar si la cantidad inicial de células tumorales inoculadas tenía efecto en el porcentaje de LiTCD8⁺CD39^{high} se inyectaron los ratones con un número de células tumorales cuatro veces menor al que se había utilizado previamente. En estos animales se observó que al día 17 p.i. el tamaño de los tumores era efectivamente menor (Figura 5C). Sin embargo, al comparar la frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high} en tumores de ratones inyectados con 2×10^5 o 1×10^6 células tumorales no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de esta subpoblación (Figura 5C). Estos resultados indicarían que la generación de LiTCD8⁺CD39^{high} está relacionada con el tiempo de exposición al MAT siendo, por otro lado, independiente de la carga tumoral inicial.

1.4 Expresión de CD39 en distintas poblaciones de leucocitos infiltrantes de tumores murinos.

La ectoenzima CD39 ha sido previamente descrita como un marcador de LiTregs^{88, 95}. Además, forma parte del arsenal de mecanismos inmunoregulatorios de estas células y se ha demostrado que tiene un rol importante en la generación de un microambiente inmunosupresor en tumores⁹². Teniendo en cuenta estas observaciones previas se comparó la expresión de CD39 entre LiTregs y LiTCD8⁺ de bazo, GDs y tumores de ratones con tumores B16F10-OVA. En órganos linfoides, como era de esperar, los LiTregs mostraron una elevada expresión de la ectoenzima, mientras que la amplia mayoría de los LiTCD8⁺ no la expresaban (Figura 6A). Por otro lado, en tumores las poblaciones de LiTCD8⁺ y Tregs mostraron frecuencias comparables de células CD39^{high}. Llamativamente, al evaluar los porcentajes de LiTCD8⁺CD39^{high} y Tregs CD39^{high} en el total de células CD45⁺ infiltrantes se observó que los LiTCD8⁺CD39^{high} se encontraban significativamente más representados en el tumor, lo cual llevó a inferir un posible rol inmunomodulador de estas células en el MAT (Figura 6B). Es interesante destacar que la expresión de CD39 fue también mayor en LiTregs CD39⁺ intratumorales totales (Media IFM ± EEM: 3974±574) que en LiTregs CD39⁺ de órganos linfoides (Media IFM ± EEM: en bazos: 1137±38; en GDs: 1031±18), indicando que el MAT también afectaría la expresión de CD39 en esta población celular.

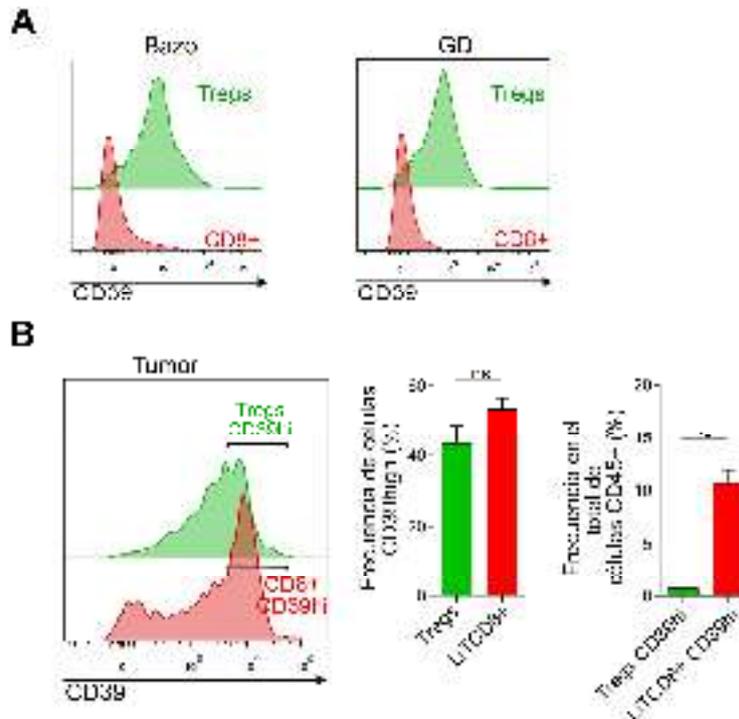


Figura 6: LiTCD8⁺CD39^{high} intratumorales se encuentran en mayor cantidad que LiTregs CD39^{high} en el MAT. **A,** Los histogramas muestran la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ y LiTregs en GDs y bazo de ratones con tumores B16F10-OVA. **B,** El histograma muestra la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ y LiTregs infiltrantes de tumores B16F10-OVA. Lo gráficos de barras muestran: frecuencia de células CD39^{high} dentro de las poblaciones de LiTCD8⁺ y Tregs (izquierda) y la frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high} y Tregs CD39^{high} en el total de las células CD45⁺ infiltrantes de tumores (derecha, n=6). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

La capacidad del MAT para inducir la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ y aumentarla en LiTregs llevó a formular el interrogante acerca de si el tumor también sería capaz de inducir un aumento en la expresión de la enzima en otras poblaciones leucocitarias. Mediante las estrategias de “gates” mostradas en Materiales y Métodos se determinaron las frecuencias de distintas poblaciones de leucocitos en órganos linfoides y en tumores al día 17 p.i. (Figura 7). Notablemente, en los tumores alrededor de un 20% de las células CD45⁺ correspondieron a la población de LiTCD8⁺ (CD3⁺CD8⁺). Además, se observó un importante infiltrado de células NK1.1⁺, las cuales en tumores se asocian a células NK e ILC1 ya que las células NK pueden diferenciarse a ILC1 debido a ciertos estímulos del MAT ¹¹⁵. También se observó una alta frecuencia de células mieloides, tanto granulocíticas como monocíticas. Realizando una distinción entre células CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} se analizó la expresión de la ectoenzima en LiTCD4⁺ convencionales, LiB, células dendríticas, mieloides granulocíticas, mieloides monocíticas, células NK/ILC1 y NKT tanto en tumores como en GDs y bazo (en órganos linfoides se ha reportado que el

marcador NK1.1 identifica esencialmente a células NK, CD11b junto con Ly6G a neutrófilos y CD11b junto con Ly6C a monocitos). Evaluando los datos de las poblaciones leucocitarias en conjunto observamos que la frecuencia de las distintas poblaciones de leucocitos es notoriamente distinta en el MAT comparado con bazo y ganglios. Llamativamente, un alto porcentaje de todas las poblaciones de células del sistema inmune expresaron CD39 en el MAT, incluso exhibiendo un nivel de expresión CD39^{high}, mientras que en órganos linfoides la expresión de la ectoenzima fue marcadamente menor, estando ausente en la mayor parte de las subpoblaciones celulares.

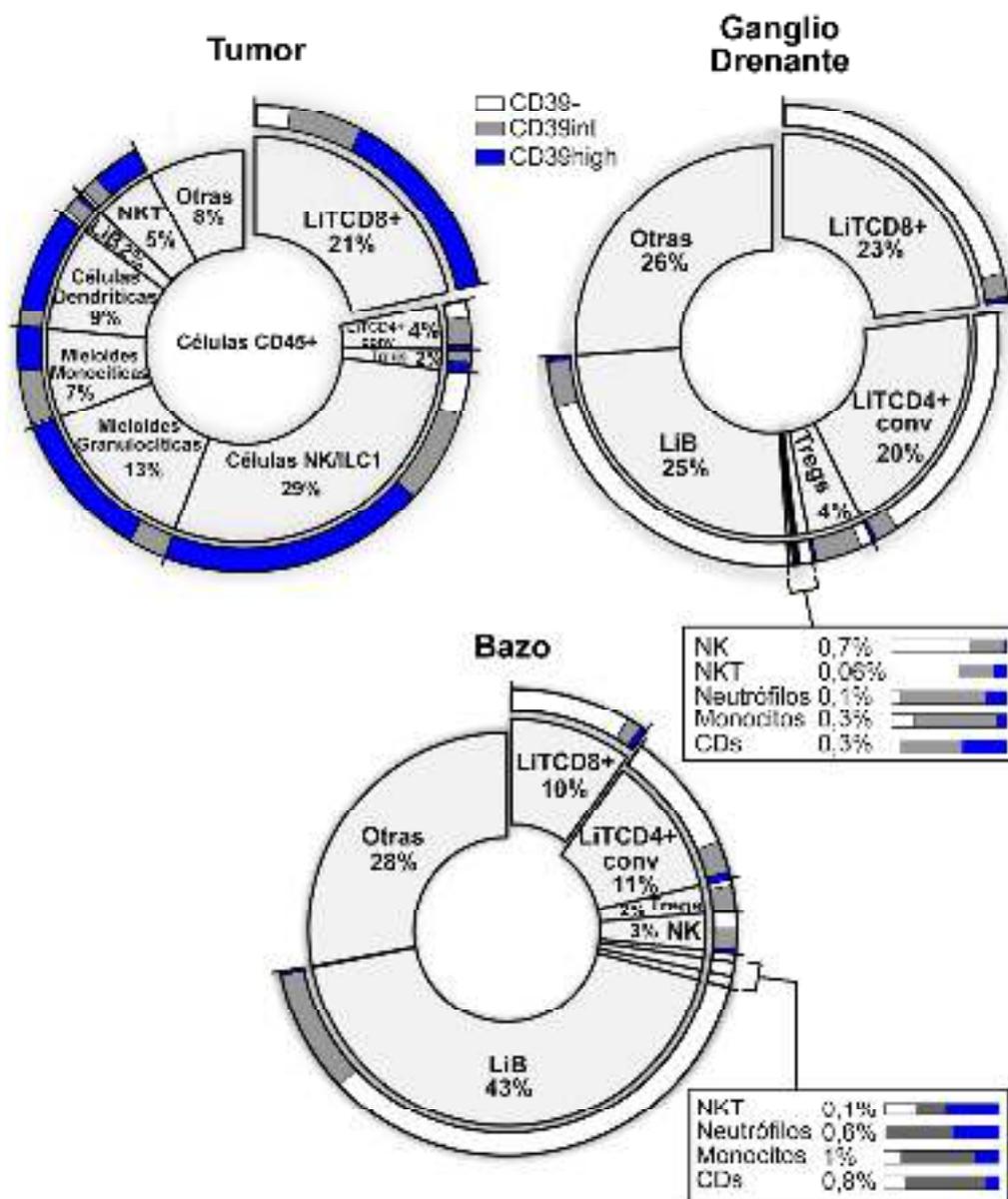


Figura 7: La expresión de CD39 aumenta en diversas poblaciones leucocitarias en el MAT. Los gráficos de torta muestran la frecuencia de las distintas poblaciones de células inmunes (anillo interno). La proporción de células inmunes que no expresa CD39 (CD39⁻) o tiene una expresión alta (CD39^{high}) o intermedia (CD39^{int}) de la enzima se indica en los anillos externos (para las poblaciones mayoritarias) y en las barras en los recuadros (para las poblaciones minoritarias).

La expresión de CD39 en leucocitos CD45⁺ infiltrantes de tumores fue también estudiada mediante inmunohistofluorescencia, donde cortes de tejido tumoral fueron analizados por microscopía de fluorescencia para observar la localización de células CD45⁺ en general y CD8⁺ en particular, y la colocalización con CD39 (Figura 8A). En las imágenes pueden observarse un gran número de núcleos atribuidos a las células tumorales, las cuales fueron teñidas con DAPI. Infiltrando el tejido se observaron células positivas para la marcación con anti-CD45. Se pudieron observar también células CD8⁺, como un subconjunto de las células CD45⁺ y a su vez se detectó que la mayor parte de los leucocitos infiltrantes eran CD39⁺. En otros cortes histológicos pudo observarse también la presencia de células CD8⁺ en las inmediaciones de vasos sanguíneos (marcados con anti-CD31), con diferentes grados de intensidad de CD39 (Figura 8B). Estos resultados corroboran las observaciones realizadas por CF que indican que el MAT tendría la capacidad de inducir la expresión de CD39 de forma general en las distintas poblaciones de leucocitos, lo cual podría tener un fuerte impacto en la generación de un ambiente inmunosupresor.

Continuando con la caracterización del infiltrado leucocitario en tumores de animales inyectados con la línea B16F10-OVA se analizó por CF la frecuencia de las poblaciones CD39⁺ más relevantes que también coexpresaban CD73 (Figura 9A). A diferencia de lo observado para LiTCD8⁺CD39⁺, en este modelo experimental las células NK/ILC1, LiTregs, mieloides granulocíticas, mieloides monocíticas y las células dendríticas mostraron una alta frecuencia de células CD39⁺ que también coexpresaban CD73, siendo las más notorias los LiTregs, las NK y las dendríticas. Las poblaciones de células dendríticas, NK y mieloides monocíticas con alta expresión de CD39 (CD39^{high}) mostraron además comportarse de manera similar a los LiTCD8⁺CD39^{high} en cuanto a que su frecuencia aumentó durante la progresión tumoral (Figura 9B), evidenciando una evolución del MAT y una inducción progresiva de la expresión de la enzima. Sin embargo, los LiTregs y las células mieloides granulocíticas, poblaciones en las cuales CD39 se considera un marcador clásico, mantuvieron el mismo porcentaje de células CD39^{high} durante los 3 tiempos p.i. estudiados. En conjunto, el estudio integral de las poblaciones de leucocitos infiltrantes de tumor y la expresión de ectonucleotidasas muestra que el MAT es capaz de inducir una alta expresión de CD39 en una amplia variedad de células, resaltando entre ellas los LiTCD8⁺CD39^{high}, que no se encuentran presentes en condiciones basales o en órganos linfoides de ratones con tumores.

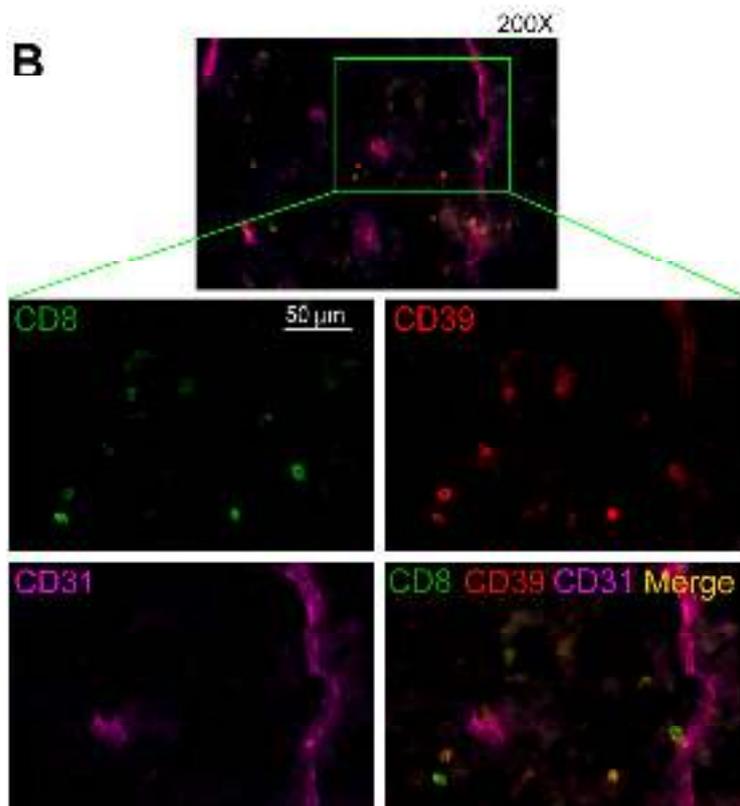
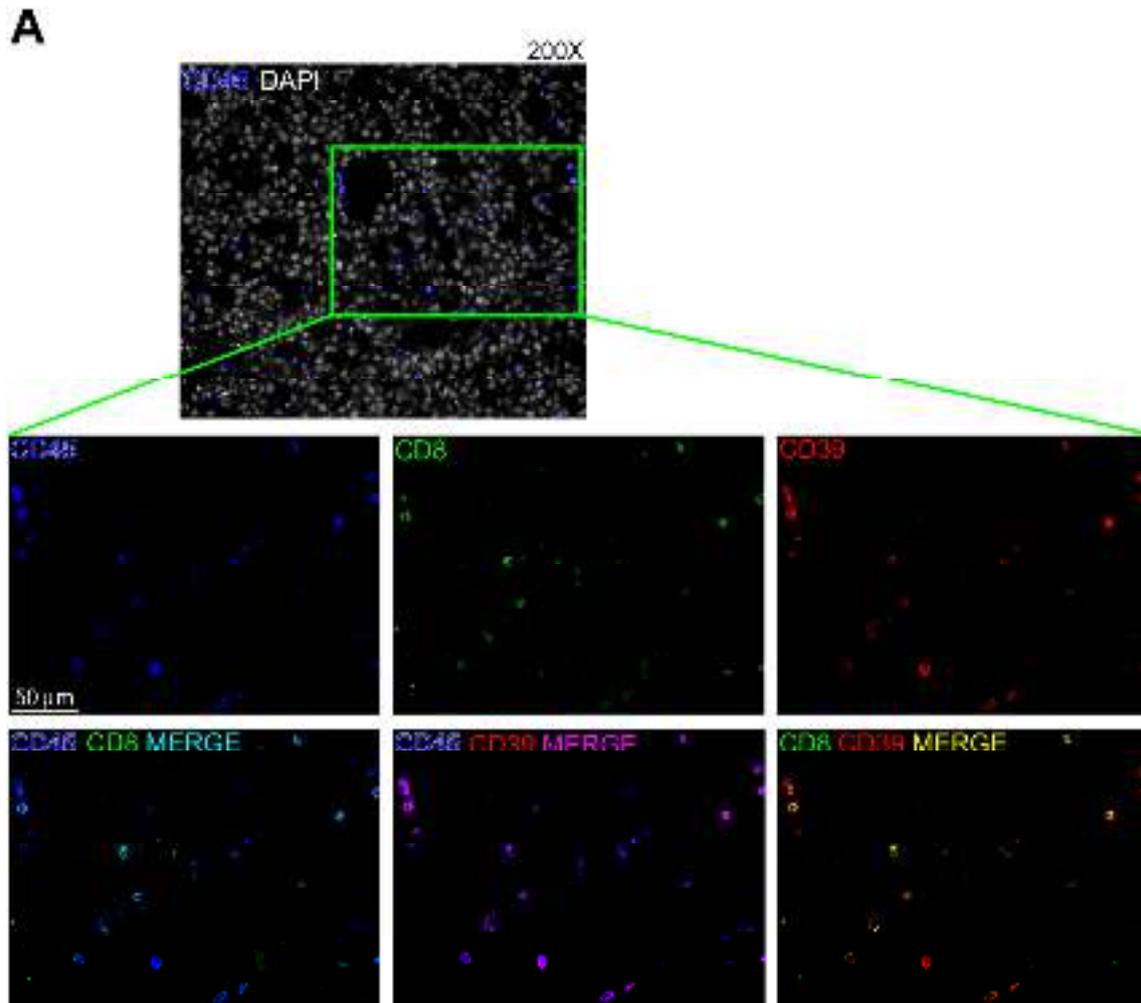


Figura 8: Leucocitos CD45⁺ CD39⁺ infiltran tumores B16F10-OVA. Cortes histológicos de tumores B16F10-OVA extraídos al día 17 p.i. fueron evaluados por microscopía de fluorescencia. **A**, Se observa arriba una región del tejido tumoral, en gris los núcleos con DAPI y en azul las células CD45⁺ infiltrantes (200X). En las imágenes ampliadas se muestran las marcas de células CD45⁺ (azul), CD8⁺ (verde) y CD39⁺ (rojo), y el “merge” de las marcas. **B**, Se observan en los tumores células CD8⁺ (verde) y CD39⁺ (rojo) y el “merge” de las marcas. En magenta se muestran células CD31⁺ que corresponden a células endoteliales (200X la imagen original).

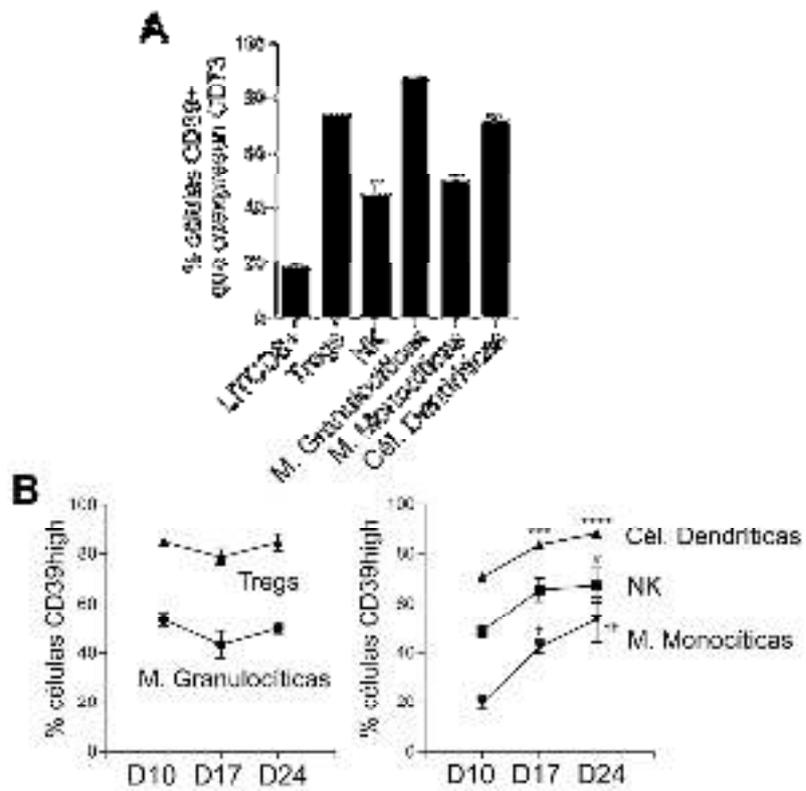


Figura 9: Diversas poblaciones leucocitarias coexpresan CD39 y CD73 en el MAT y aumentan su expresión de CD39 con la progresión tumoral. **A,** El gráfico de barras muestra la frecuencia de distintas poblaciones de células inmunes CD39⁺ en tumor que coexpresan CD73 (n=6). **B,** Los gráficos de líneas muestran la frecuencia de células inmunes CD39^{high} durante la progresión tumoral (días 10, 17 y 24 p.i.; n=3-6). Resultados representativos de 2-3 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; El análisis estadístico muestra comparación de medias entre día 10 p.i. vs. días 17 y 24 (* para células dendríticas, # para NK y † para mieloides monocíticas). #P≤0,05; †P≤0,05; ††P≤0,01; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

1.5 Estado de activación y diferenciación de LiTCD8⁺CD39⁺ en modelos experimentales murinos de cáncer.

La presencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 en el contexto de la respuesta inmune antitumoral ha sido descrita previamente por Parodi, Hilchey y Pulte y colaboradores^{55, 112, 113}. Sin embargo, en estos reportes previos no se realizó estudio alguno sobre el fenotipo de esta población celular, sobre su estado de activación, diferenciación, funcionalidad y otros parámetros que pudiesen clarificar cómo se originan estas células y cuál sería su posible rol en el MAT. Además, la generación de esta población celular no había sido reportada en modelos experimentales murinos de cáncer que permitiesen un estudio más profundo de la misma. Por ello, con el objetivo de ahondar en la caracterización de LiTCD8⁺CD39⁺ intratumorales se analizó la expresión de distintas moléculas de superficie que son indicativas del estado de activación y/o diferenciación en el que se encuentran. Para ello, se obtuvieron los tumores de animales inyectados con la línea B16F10-OVA y se estudió en LiTCD8⁺CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} la expresión de CD44, una molécula de adhesión a ácido hialurónico que es indicadora de un estado activado de LiT, y de CD62L, otra molécula de adhesión que solo se expresa en LiT vírgenes y de memoria central y que permite la extravasación de dichas células hacia el parénquima de los órganos linfáticos secundarios. El análisis combinado de la expresión de CD44 y CD62L permite determinar el fenotipo virgen, de memoria central o memoria efectora de LiT (Figura 10A). Mediante CF se pudo observar que LiTCD8⁺CD39^{high} intratumorales eran CD44⁺CD62L⁻ (Figura 10B), indicando un estado de diferenciación homogéneo de la subpoblación, compatible con un fenotipo de memoria efectora, es decir, una población de LiT que han sido presumiblemente activados. En cuanto a LiTCD8⁺CD39^{int}, la mayor proporción de esta población también mostró un fenotipo de memoria efectora, mientras que la subpoblación de LiTCD8⁺CD39⁻ intratumorales reveló ser una población más heterogénea, incluyendo una alta frecuencia de células de memoria efectora, pero también, si bien minoritaria (alrededor 20%), una población con fenotipo de memoria central (CD44⁺CD62L⁺). Los escasos LiTCD8⁺ vírgenes (CD44⁻CD62L⁺) que se encontraron infiltrando los tumores mostraron también formar parte de la subpoblación CD39⁻. De manera similar, al analizar el estado de diferenciación de LiTCD8⁺CD39^{int} en un órgano linfoide como el bazo, estos mostraron poseer fenotipos de memoria central y

memoria efectora (Figura 10C), no estando representadas células vírgenes en esta subpoblación, las cuales sí estaban presentes (y de forma predominante) en LiTCD8⁺CD39⁻. Estos resultados permitieron inferir que la expresión de la ectoenzima CD39 se asocia a LiTCD8⁺ activados, ya sean de memoria central o memoria efectora, pero aquellos que adquieren una expresión CD39^{high} sólo presentan un fenotipo de memoria efectora. Por otro lado, los LiT vírgenes no expresan la enzima.

Dentro de las poblaciones de LiTCD8⁺ efectores (CD44⁺CD62L⁻) se realizó un análisis más detallado evaluando la expresión de las moléculas KLRG-1 y CD127. Como se mencionó en la Introducción, utilizando estas dos moléculas se distinguen varias subpoblaciones efectoras diferentes (Figura 10A): KLRG-1⁺CD127⁻, llamadas SLECs; KLRG-1⁻CD127⁻, llamadas EEC ó células efectoras tempranas, que componen una subpoblación recientemente activada; KLRG-1⁻CD127⁺, denominadas MPECs y las células KLRG-1⁺CD127⁺, cuyo estado de diferenciación corresponde a estadios intermedios no completamente definidos^{38, 116}. Dentro de la población CD44⁺CD62L⁻ (memoria efectora) de LiTCD8⁺CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} se estudió la expresión de KLRG-1 y CD127, observándose que en LiTCD8⁺CD39^{high} una frecuencia significativamente mayor de células eran KLRG-1⁺CD127⁻ o SLECs (Figura 11D). Esto indica que esta población efectora estaría especializada para responder contra el tumor, y no tendría gran potencial de generar células de memoria. Dentro de la población de LiTCD8⁺CD39^{int} se encontraron a su vez subpoblaciones con fenotipos de células SLECs, EECs y MPECs, mientras que en los LiTCD8⁺CD39⁻ predominó el fenotipo MPEC. Esta última observación concuerda con el análisis previo de expresión de CD44 y CD62L, donde se determinó que la subpoblación de LiTCD8⁺CD39⁻ poseía una alta frecuencia de células de memoria central. Es interesante destacar además que los LiTCD8⁺CD39^{int} mostraron fenotipos intermedios entre LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{high} lo cual, sumado a que LiT vírgenes no expresan CD39, permite inferir que estas células podrían componer un estado previo de diferenciación antes de llegar al fenotipo CD39^{high}.

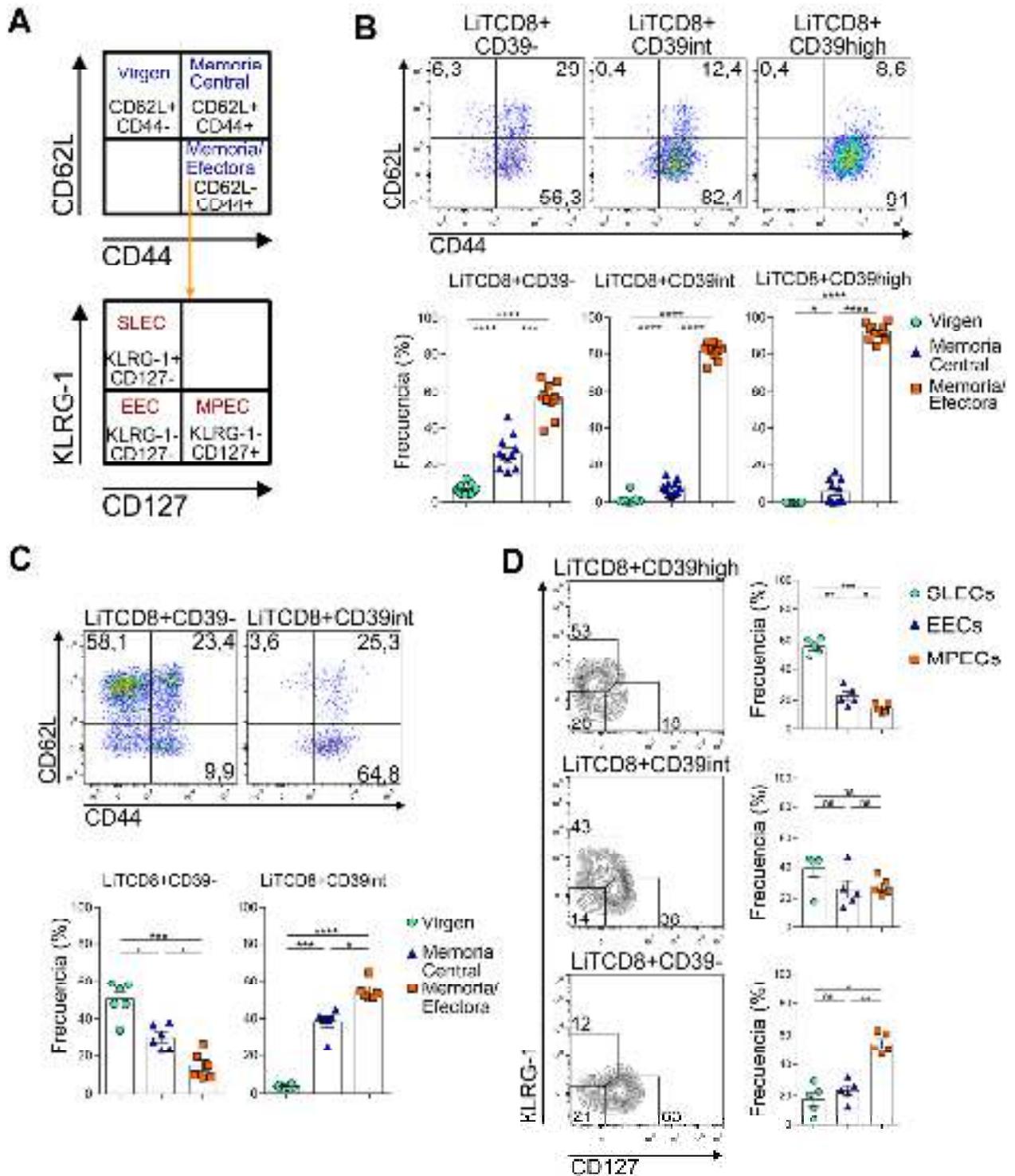


Figura 10: LiTCD8+CD39^{high} muestran un fenotipo de células efectoras de corta vida. **A**, El esquema muestra los distintos fenotipos de diferenciación de LiT caracterizados en base a la expresión de CD44, CD62L, KLRG-1 y CD127. **B**, "Dot plots" representativos y gráficos de barras muestran la frecuencia de células vírgenes, de memoria central y memoria/efectora en LiTCD8+CD39-, CD39^{int} y CD39^{high} de tumores B16F10-OVA (n=11). **C**, Frecuencia de células vírgenes, de memoria central y memoria/efectora en LiTCD8+CD39- y CD39^{int} en bazo de ratones con tumores B16F10-OVA (n=6). **D**, Frecuencia de SLECs, EECs y MPECs en LiTCD8+CD39-, CD39^{int} y CD39^{high} de tumores B16F10-OVA (n=5). Resultados representativos de 2-5 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

Otra molécula que refleja el estado de activación en los LiTCD8⁺ es la propia proteína CD8. Esta molécula es un marcador de LiT citotóxicos, sin embargo, su nivel de expresión varía considerablemente, observándose una marcada disminución en la expresión superficial de la misma tras recibir estimulación reciente a través del TCR¹¹⁷. Al contrario de lo esperado teniendo en cuenta el estado de activación de LiTCD8⁺CD39^{high}, al analizar la intensidad de expresión de CD8α en LiTCD8⁺ intratumorales se pudo determinar que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} poseían menor expresión de esta molécula que LiTCD8⁺CD39^{high} (Figura 11A). De hecho, los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron niveles de expresión de CD8α similares a los de LiTCD8⁺CD39⁻ de bazo. Resultados similares fueron observados en LiTCD8⁺ de tumores de los modelos 4T1, MCA-OVA y CT26 (Figura 11B). Estas observaciones plantean numerosos interrogantes acerca de si la expresión de CD8α en LiTCD8⁺CD39^{high} disminuyó previamente y al momento del estudio ya se encontraba elevada nuevamente o si estas células son capaces de responder a estímulos a través del TCR en el MAT.

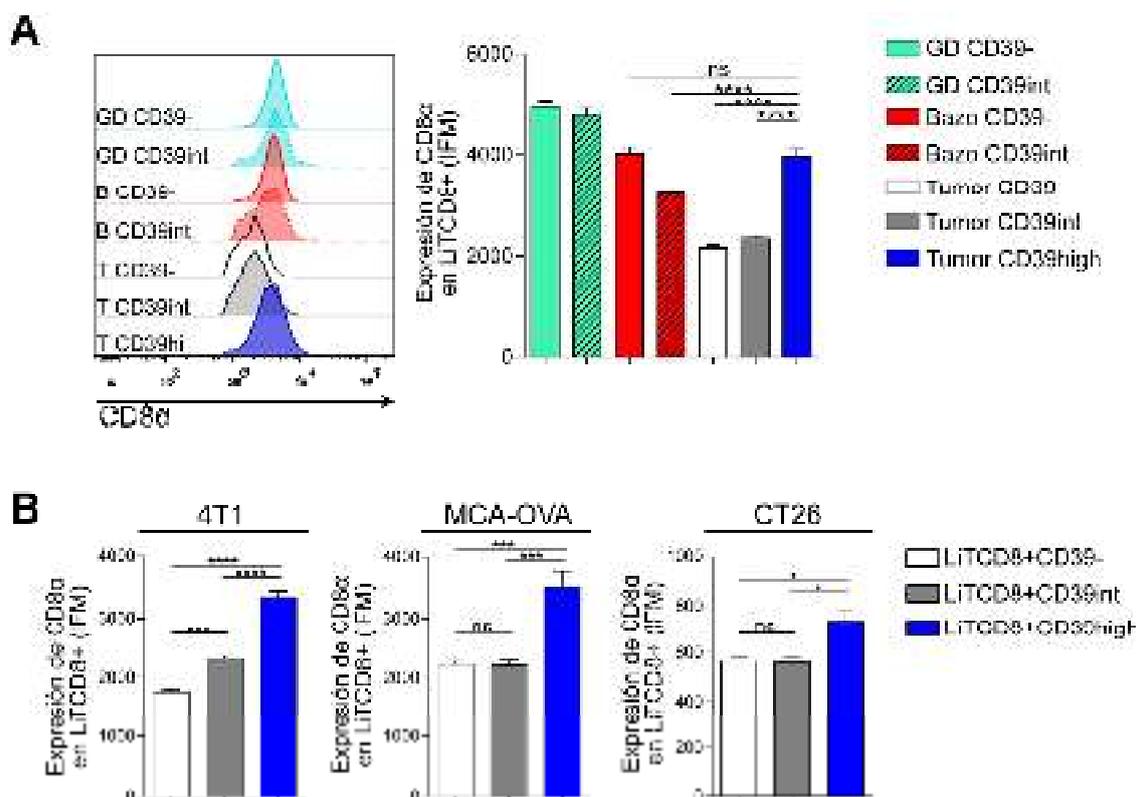


Figura 11: LiTCD8⁺CD39^{high} mantienen una alta expresión de CD8α a pesar de poseer un fenotipo de células efectoras activadas. **A**, El histograma representativo y el gráfico de barras muestran la intensidad de expresión de CD8α *ex vivo* en distintas subpoblaciones de LiTCD8⁺ de bazos (B), GDs y tumores (T) de ratones con tumores B16F10-OVA (n=6). **B**, Los gráficos de barras muestran la intensidad de expresión de CD8α en LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores 4T1, MCA-OVA y CT26 (n=4-5). Resultados representativos de 2-5 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

1.6 Rol de la activación específica de antígeno en la generación de LiTCD8⁺CD39⁺ intratumorales.

Debido a que el estudio del estado de diferenciación de LiTCD8⁺CD39^{high} reveló que estas células poseen un fenotipo efector, se evaluó el rol de la activación específica de antígeno en la inducción de esta subpoblación celular. Para ello, aprovechando la ventaja que ofrece la línea B16F10-OVA, se utilizó un dextrámero H-2Kb-OVA para identificar aquellos LiTCD8⁺ del MAT específicos para un péptido de la OVA. Este abordaje permitió estudiar la expresión de la ectoenzima en una subpoblación de células que estaba siendo estimulada de manera específica por un antígeno expresado por las células tumorales. Mediante CF fue posible determinar que alrededor del 2 al 10% de los LiTCD8⁺ intratumorales eran específicos para OVA (Figura 12A). Como control de que la marcación con el dextrámero fuese específica paralelamente se realizaron tinciones en otra muestra con un dextrámero cargado con el péptido SIY, el cual es irrelevante para los LiTCD8⁺ intratumorales en este modelo experimental. Posteriormente, al evaluar la expresión de CD39 en los LiTCD8⁺ específicos para OVA se pudo determinar que una frecuencia mayoritaria de los mismos exhibía una alta expresión de la ectoenzima (CD39^{high}). Por otro lado, alrededor de un 20% de LiTCD8⁺ intratumorales específicos para OVA presentó una expresión intermedia de CD39 (CD39^{int}), mientras que prácticamente no se detectaron LiTCD8⁺ específicos para este antígeno que fuesen CD39⁻. Además, la mayoría de los LiTCD8⁺ específicos para OVA mostraron no expresar CD73 (Figura 12B). Como confirmación del estado activado de la población específica se observó que estas células poseían un fenotipo enteramente de memoria efectora CD44⁺CD62L⁻ (Figura 12C). Estos resultados permitieron asociar la especificidad del TCR de LiTCD8⁺ por antígenos tumorales a una alta expresión de CD39.

Por otro lado, se ha demostrado que las moléculas de adhesión CD11a y CD49d aumentan su expresión en LiT que han sido activados a través del TCR, participando incluso en su diferenciación a células efectoras ^{118, 119, 120, 121}. Aunque estas moléculas no han sido formalmente establecidas como marcadores de LiT específicos de antígenos tumorales, se ha reportado que CD11a y CD49d aumentan su expresión luego de la interacción de su TCR con sus respectivos péptidos presentados en moléculas del CMH, pero no debido a otros estímulos no específicos. Al examinar la expresión de CD11a y CD49d en LiTCD8⁺CD39⁻, CD39^{int}

y CD39^{high} se observó que a mayor expresión de CD39 se detectaba un mayor porcentaje de LiTCD8⁺ coexpresando ambas moléculas (Figura 12D), lo cual nuevamente asoció la alta expresión de la enzima a una activación a través del TCR.

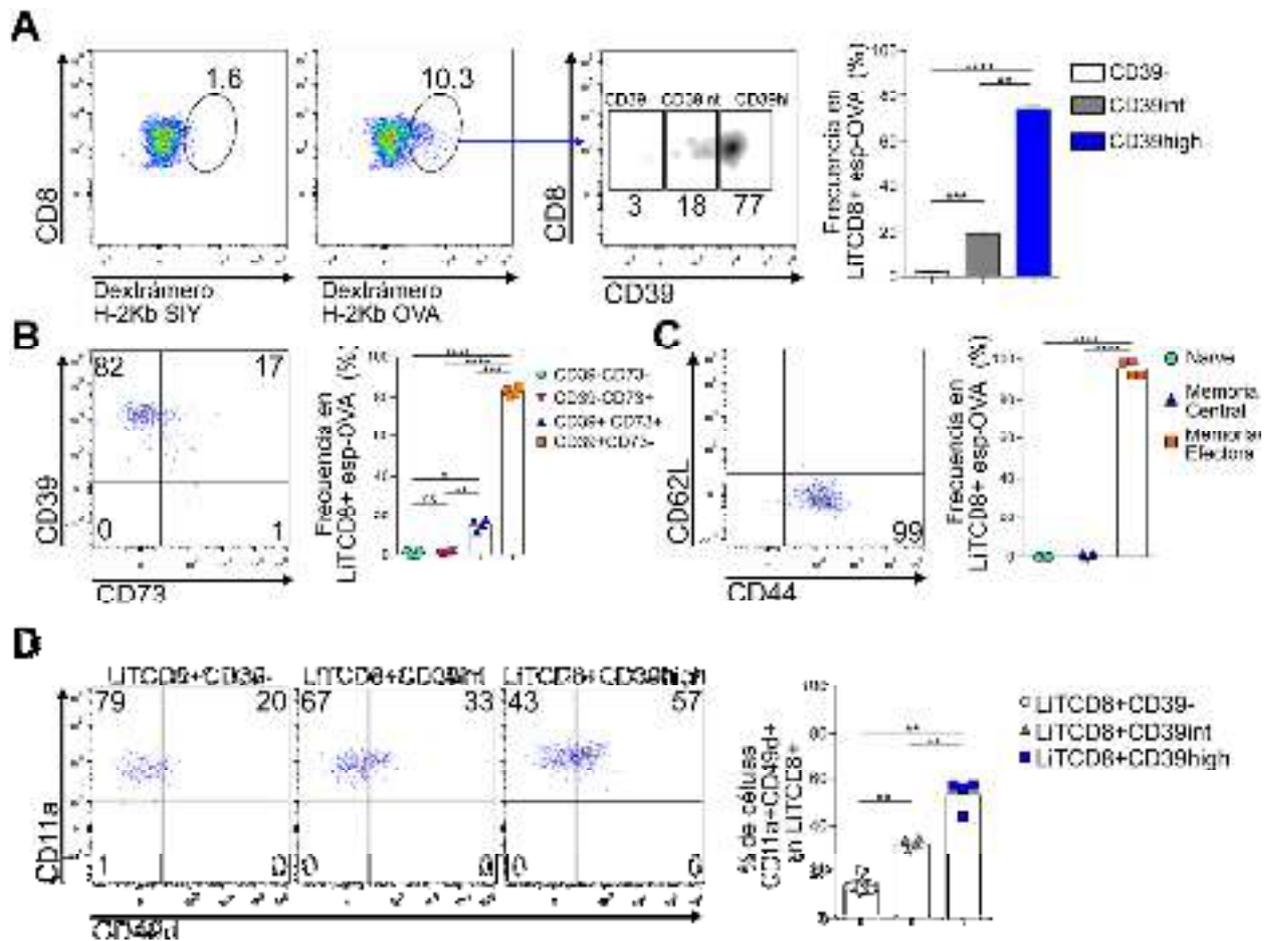
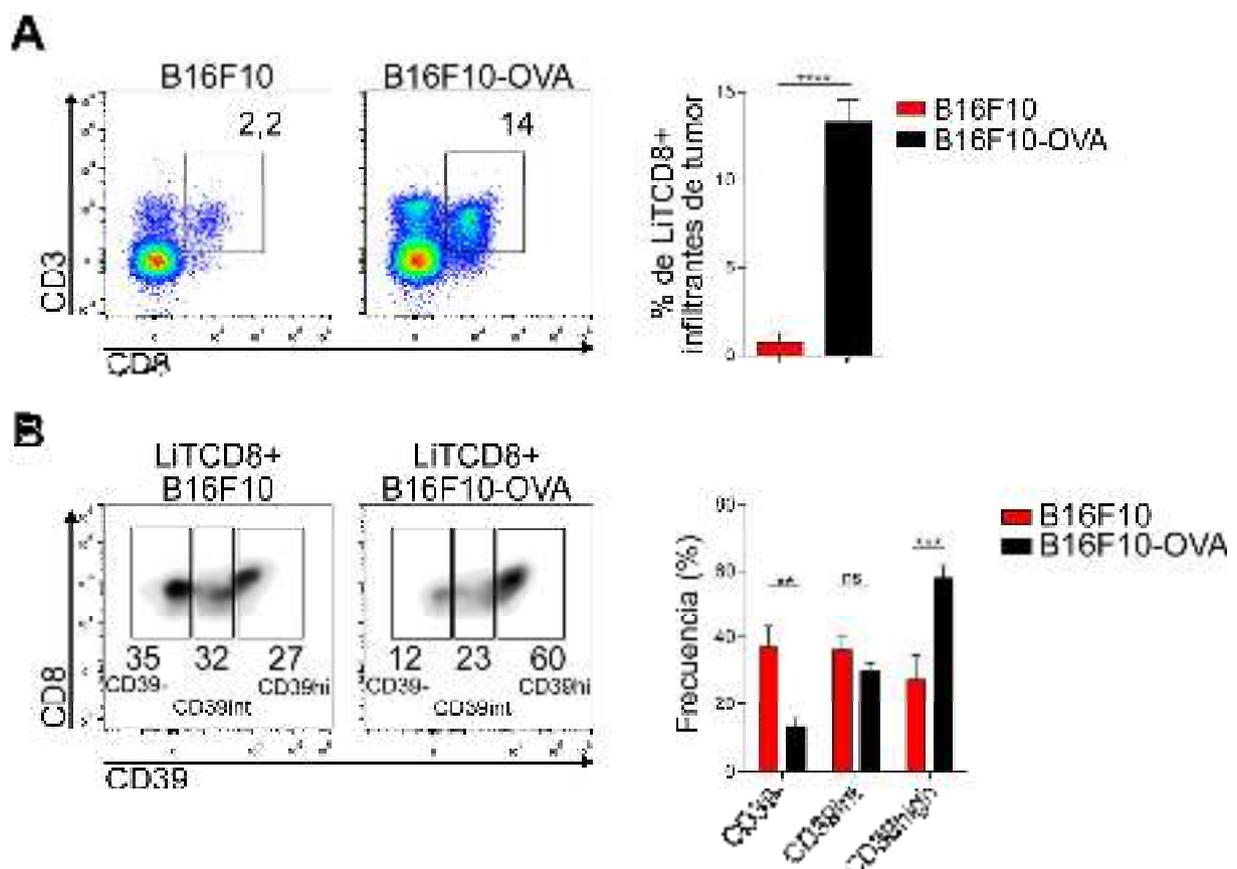


Figura 12: La alta expresión de CD39 se asocia a LiTCD8⁺ específicos para antígenos tumorales. **A**, Los “Dot plots” representativos y el gráfico de barras muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ específicos para OVA (izquierda), identificados con un dextrámero H-2Kb OVA conjugado con el fluorocromo PE en tumores B16F10-OVA (como control se usó un dextrámero cargado con un péptido irrelevante). A la derecha se muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ específicos para OVA CD39⁻, CD39^{int} ó CD39^{high} (n=6). **B**, Frecuencia de LiTCD8⁺ específicos para OVA que expresan CD39 y CD73 (n=4). **C**, Frecuencia de LiTCD8⁺ específicos para OVA vírgenes (CD44⁺CD62L⁺), de memoria central (CD44⁺CD62L⁻) y de memoria efectora (CD44⁺CD62L⁻) (n=4). **D**, Frecuencia de LiTCD8⁺ CD39⁻, CD39^{int} ó CD39^{high} totales que coexpresan las moléculas de adhesión CD11a y CD49d (n=4). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

Estos resultados llevaron a hipotetizar que posiblemente tumores con mayor grado de inmunogenicidad serían capaces de inducir una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high}, de manera similar a lo que ocurre con la expresión de receptores inhibitorios como PD-1 en pacientes con tipos de cáncer muy inmunogénicos^{122, 123}. Para determinar si diferencias en la inmunogenicidad de los tumores afectan la

generación de LiTCD8⁺CD39^{high} se utilizó el modelo experimental B16F10-OVA, el cual se comparó con el modelo B16F10 que, al no expresar OVA, es menos inmunogénico. Así, se obtuvieron los tumores de ambos modelos en el día 17 p.i. y se pudo determinar que los tumores de los animales inyectados con la línea B16F10-OVA se encontraban significativamente más infiltrados por LiTCD8⁺ que los tumores de animales inyectados con la línea B16F10, lo cual evidenció una inducción de una respuesta inmune más potente (Figura 13A). Luego, al comparar la población de LiTCD8⁺ de ambos modelos se observó una frecuencia significativamente mayor de LiTCD8⁺CD39^{high} en tumores B16F10-OVA, mientras que en los tumores B16F10 se encontró una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁻ (Figura 13B). Todos estos resultados permitieron asociar la inmunogenicidad de los tumores a la generación de LiTCD8⁺CD39⁺.



En esta primera parte de resultados se observó que:

- En los modelos experimentales murinos de cáncer B16F10-OVA, 4T1, CT26 y MCA-OVA una alta frecuencia de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores adquieren la expresión de la ectoenzima CD39, mientras que en bazo y GDs el porcentaje de LiTCD8⁺ que expresan esta ectoenzima es muy bajo. Estos resultados indicarían que la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ podría deberse a señales que reciben en el MAT.
- La expresión de CD73 en LiTCD8⁺ depende de la cepa de ratones estudiada y del origen histológico de las líneas celulares inoculadas.
- Los LiTCD8⁺CD39⁺ muestran una expresión dual de la ectoenzima, distinguiéndose una población con expresión intermedia (CD39^{int}) y otra con alta expresión (CD39^{high}). Esta última se encuentra exclusivamente en tumores y no en órganos linfoides.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} se encuentran más representados en el MAT que los LiTregs CD39^{high}, lo cual podría indicar que los primeros poseen un rol relevante en la modulación del balance de ATP y adenosina en el MAT.
- La frecuencia de LiTCD8⁺CD39^{high} aumenta con la progresión tumoral, a expensas de una disminución en el porcentaje de LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, lo cual podría deberse a la evolución de un MAT inmunosupresor.
- Otras poblaciones leucocitarias también experimentan un incremento en la expresión de CD39 en el MAT, siendo muy notable en las células NK.
- La expresión de CD39 en LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores se asocia a un estado de diferenciación de células de memoria efectoras, con un predominio de células efectoras de corta vida en LiTCD8⁺CD39^{high} y de células efectoras precursoras de memoria en LiTCD8⁺CD39⁻.
- La inmunogenicidad de los tumores impacta en la expresión de CD39 en LiTCD8⁺: los LiTCD8⁺ específicos para el antígeno tumoral OVA mostraron una elevada expresión de CD39 y, a su vez, tumores más inmunogénicos favorecen una mayor inducción de LiTCD8⁺CD39^{high}.

Estado funcional de LiTCD8⁺CD39⁺ en el contexto de la respuesta inmune antitumoral:

2.1 Producción de citoquinas proinflamatorias, potencial citotóxico y capacidad proliferativa.

La capacidad de LiTCD8⁺CD39⁺ para producir citoquinas proinflamatorias en el MAT fue evaluada mediante la estimulación de LiT intratumorales *ex vivo* con PMA/Iono. De esta manera, pudo evaluarse mediante CF el contenido intracelular de IFN γ , TNF α e IL-2, tres citoquinas proinflamatorias que se utilizan regularmente para analizar el estado funcional de LiTCD8⁺ ^{37, 124}. Como puede apreciarse en la Figura 14A, una alta frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} fueron capaces de producir IFN γ , sin embargo, la población LiTCD8⁺CD39^{high} mostró un porcentaje de células IFN γ ⁺ mayor que las otras dos subpoblaciones, lo cual coincide con resultados mencionados anteriormente que señalaban a estas células como efectoras. Sin embargo, dentro de la población de LiTCD8⁺CD39^{high} se encontró una frecuencia significativamente menor de células productoras de TNF α e IL-2 que en LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}. Más aún, al comparar la frecuencia de células capaces de producir tanto IFN γ como TNF α , que son indicadoras de una capacidad polifuncional en LiTCD8⁺, se observaron en LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} valores mayores que en LiTCD8⁺CD39^{high} (Figura 14B). Al evaluar la producción de estas citoquinas dentro de la población de LiTCD8⁺ específica para OVA, se pudo observar que los LiTCD8⁺CD39^{high} específicos poseían una mayor frecuencia de células productoras de IFN γ , pero menor porcentaje de células productoras de TNF α e IL-2 que LiTCD8⁺CD39^{int} (Figura 14C). Para evaluar la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de LiTCD8⁺CD39^{high} utilizando un estímulo semejante al que se podría hallar en el MAT (ya que PMA/Ionomicina causan una activación policlonal muy potente), se purificaron mediante el uso de perlas magnéticas LiTCD8⁺ intratumorales y se los estimuló con un péptido de OVA (SIINFEKL) o con un péptido irrelevante (SIYRYYGL) como control, en ausencia de células presentadoras de antígenos. Este tipo de estímulo específico indujo alrededor de un 10% de células productoras de IFN γ en LiTCD8⁺CD39^{high} (Figura 14D), lo cual

coincide con los resultados mostrados en la Figura 12A, donde se podía detectar un porcentaje similar de LiTCD8⁺ específicos para OVA en los tumores y donde se observó que la gran mayoría de las células específicas para OVA eran CD39^{high}. De acuerdo a lo observado al estimular con PMA/Iono, la estimulación con el péptido específico fue incapaz de promover un incremento significativo de células productoras de TNF α e IL-2 en la población de LiTCD8⁺CD39^{high}, comparando con células no estimuladas o estimuladas con el péptido control.

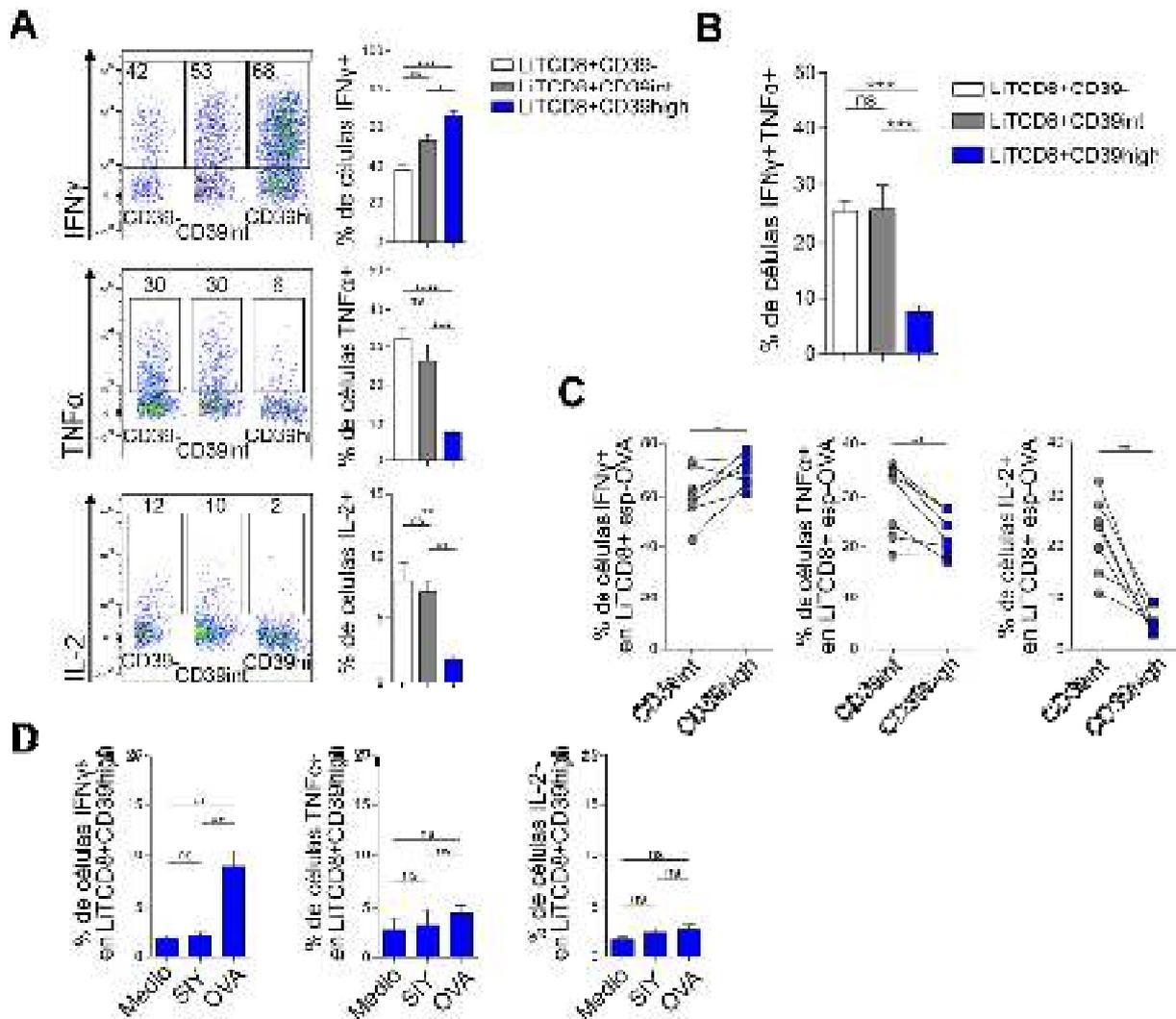


Figura 14: LiTCD8⁺CD39^{high} son capaces de responder a la estimulación produciendo IFN γ , pero no TNF α ni IL-2. **A**, Los "Dot plots" representativos y los gráfico de barras muestran la frecuencia de células productoras de IFN γ , TNF α e IL-2 en las tres subpoblaciones de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA indicadas luego de la estimulación *ex vivo* con PMA/Iono por 5 h a 37° C (n=5). **B**, El gráfico de barras muestra la frecuencia de células coproductoras de IFN γ y TNF α en LiTCD8⁺ intratumorales CD39⁻, CD39^{int}, o CD39^{high}, luego de estimular las células como en **A** (n=5). **C**, Los gráficos de líneas muestran la comparación en las células productoras de IFN γ , TNF α e IL-2 entre LiTCD8⁺ intratumorales específicos para OVA que expresan CD39 con intensidad intermedia (CD39^{int}) y alta (CD39^{high}) luego de estimular las células como en **A** (n=7). **D**, Los gráficos de barra muestran la frecuencia de células productoras de IFN γ , TNF α e IL-2 en LiTCD8⁺CD39^{high} intratumorales, luego purificar los LiTCD8⁺ con perlas magnéticas y estimularlos con péptido OVA, o con el péptido SIY como control durante 5 h a 37° C(n=4). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes. Datos presentados como media \pm EEM; ns: no significativo; *P \leq 0,05; **P \leq 0,01;

El potencial citotóxico de los LiTCD8⁺ intratumorales fue evaluado analizando el contenido de granzima B intracelular y la expresión superficial de la molécula CD107a (indicadora de degranulación) luego de estimulación con PMA/Iono. En concordancia con su fenotipo altamente productor de IFN γ , los LiTCD8⁺CD39^{high} exhibieron mayor porcentaje de células CD107a⁺ y granzima B⁺ que los LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} (Figura 15). Estos resultados permitieron asociar la alta expresión de CD39 a un fenotipo Tc1 con alto potencial citotóxico, pero como fue demostrado previamente, con reducida capacidad de producir TNF α e IL-2.

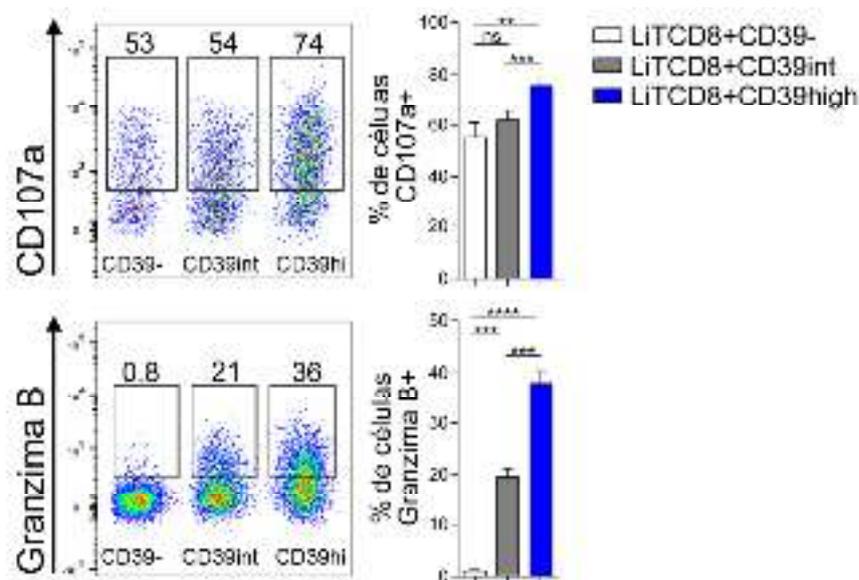


Figura 15: LiTCD8⁺CD39^{high} poseen un alto potencial citotóxico. Los “Dot plots” representativos y los gráfico de barras muestran la frecuencia de células CD107a⁺ y granzima B⁺ en las tres subpoblaciones de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA, definidas por la expresión de CD39, luego de la estimulación *ex vivo* con PMA/Iono durante 5 h a 37° C (n=6). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; **P≤0,01; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

El análisis del potencial proliferativo de LiTCD8⁺ intratumorales se abordó evaluando la expresión intracelular de Ki-67, un factor de transcripción asociado a un ciclo celular activo. La expresión de Ki-67 fue estudiada en LiTCD8⁺ purificados de tumores de animales inyectados con la línea B16F10-OVA *ex vivo* y también luego de estimularlos *in vitro* durante 72 h con anticuerpos agonistas dirigidos contra el TCR y la molécula coestimuladora CD28. Los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron un mayor porcentaje de células Ki-67⁺ que los LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} cuando fueron estudiados luego de su purificación (Figura 16A). Sin embargo, al estimular la población de LiTCD8⁺ intratumorales *in vitro* los LiTCD8⁺CD39⁻ mostraron un mayor

porcentaje de células Ki-67⁺, mientras que LiTCD8⁺CD39^{int} y CD39^{high} mostraron una menor capacidad de responder a la re-estimulación, lo cual puede asociarse a un fenotipo terminalmente diferenciado en estas células (Figura 16A). Por otro lado, en la subpoblación de LiTCD8⁺ específicos para OVA, los LiTCD8⁺CD39^{int} y CD39^{high} mostraron *ex vivo* una frecuencia similar de células Ki-67⁺, aunque luego de la re-estimulación se indujo una mayor proliferación en los LiTCD8⁺CD39^{int} que en los LiTCD8⁺CD39^{high}, asociando por lo tanto una mayor expresión de la ectoenzima a una menor respuesta linfoproliferativa (Figura 16B).

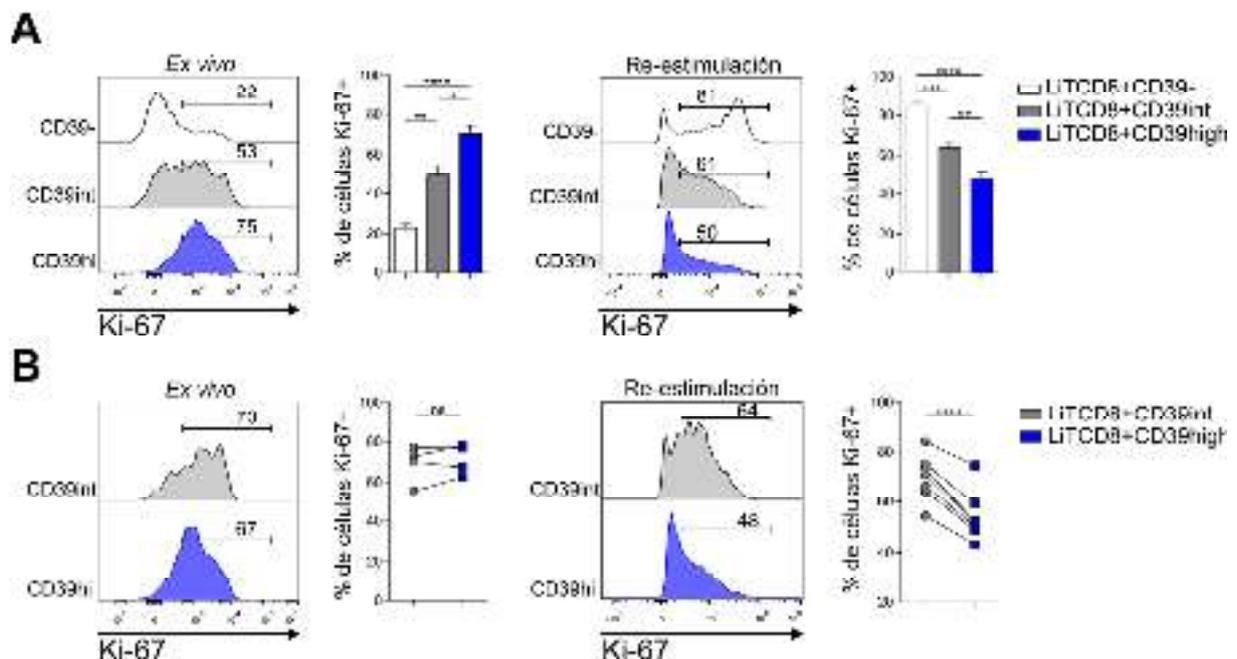


Figura 16: LiTCD8⁺CD39^{high} poseen un menor potencial proliferativo que LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39^{int}. **A**, Los histogramas representativos y los gráfico de líneas muestran la frecuencia de células Ki-67⁺ en las tres subpoblaciones indicadas de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA purificados con perlas magnéticas, tanto *ex vivo* como luego de la estimulación *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 durante 72 h a 37°C (n=4-7). **B**, Los histogramas representativos y los gráficos de líneas muestran la frecuencia de células Ki-67⁺ en LiTCD8⁺ intratumorales específicos para OVA CD39^{int} y CD39^{high}, tanto *ex vivo* como luego de la estimulación *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 durante 72 h a 37°C (4-7). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; **P≤0,01; ***P≤0,001; **** P≤0,0001.

Con el fin de determinar si los LiTCD8⁺CD39^{high} generados en ambientes con distinto grado de inmunogenicidad mantienen un perfil funcional similar se compararon: la producción de citoquinas, el potencial citotóxico y la capacidad proliferativa de estas células en los modelos B16F10-OVA y B16F10 (Figura 17). Los LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores B16F10-OVA mostraron mayores porcentajes de células IFNγ⁺, Granzima B⁺ y Ki-67⁺ que aquellos obtenidos de tumores B16F10, lo cual podría reflejar una respuesta de LiTCD8⁺ citotóxica más potente. No obstante, en ambos modelos el porcentaje de células TNFα⁺ e IL-2⁺ fue similar.

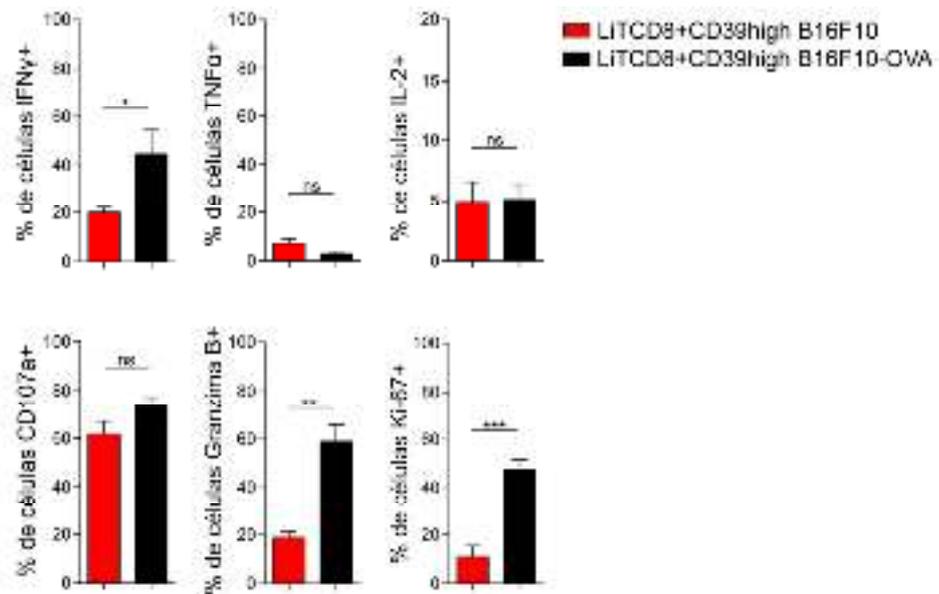


Figura 17: La inmunogenicidad de los tumores afecta el perfil efector de LiTCD8⁺CD39^{high}. Los gráficos de barras muestran la frecuencia de células IFN γ ⁺, TNF α ⁺, IL-2⁺, CD107a⁺, granzima B⁺ y Ki-67⁺ en LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores B16F10 y B16F10-OVA luego de la estimulación con PMA/Iono/Bref A/Mon para medir las citoquinas, CD107a y granzima B, y con anti-CD3/anti-CD28 para medir Ki-67 (n=4). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media \pm EEM; ns: no significativo; **P \leq 0,01; ***P \leq 0,001.

2.2 Estado de activación de vías de señalización involucradas en la regulación del metabolismo.

El metabolismo de LiT ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años ya que se ha determinado que cada estado de diferenciación, como así también la funcionalidad del LiT, están íntimamente ligados al metabolismo energético de la célula ^{116, 125}. La molécula mTOR, como se ha descrito en la Introducción, funciona como un sensor de los nutrientes disponibles en el microambiente donde se encuentra la célula, y a través de la fosforilación de distintas proteínas sustrato controla procesos biológicos esenciales en LiT efectores, como la proliferación celular, la síntesis de proteínas y la promoción de la glicólisis ¹²⁵. Por otro lado, la quinasa AMPK también actúa como sensor, pero particularmente detectando estrés metabólico por disminución en la disponibilidad de ATP y un aumento en la concentración de AMP ¹²⁵. Basándonos en estos datos bibliográficos estudiamos el estado de activación de ambos interruptores metabólicos en la población de LiTCD8⁺CD39⁺ infiltrantes de tumor, mediante el uso de anticuerpos marcados dirigidos contra los aminoácidos fosforilados de las quinasas. Así, encontramos que, de acuerdo con su estado de diferenciación, los LiTCD8⁺CD39^{high} analizados *ex vivo*

exhibieron mayores niveles de mTOR fosforilado en la Serina 2448 (fosforilación activante) que los LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} (Figura 18A, izquierda). A su vez, los LiTCD8⁺CD39^{high} también mostraron una mayor frecuencia de células P-S6⁺, una proteína que se encuentra río abajo en la cascada de activación de mTOR (Figura 18A, centro). Por otro lado, los LiTCD8⁺CD39^{high} también mostraron mayores niveles de P-AMPK que la población de LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, lo cual indicaría que esta subpoblación celular se encontraría bajo estrés metabólico (Figura 18A, derecha). Para finalmente definir si los LiTCD8⁺CD39^{high} pueden responder a una re-estimulación fosforilando mTOR y S6, LiTCD8⁺ intratumorales purificados se estimularon con anti-CD3/anti-CD28 durante 48 h. Si bien los LiTCD8⁺CD39^{high} evaluados *ex vivo* presentaban mayor fosforilación de mTOR y S6, luego de la estimulación policlonal pudo observarse que estas células fallaban en aumentar la fosforilación de estas proteínas a niveles comparables a los observados en LiTCD8⁺CD39⁻ (Figura 18B). Estos resultados podrían indicar que efectivamente los LiTCD8⁺CD39^{high} se encuentran bajo estrés metabólico, coincidiendo con su reducida capacidad proliferativa al ser re-estimuladas.

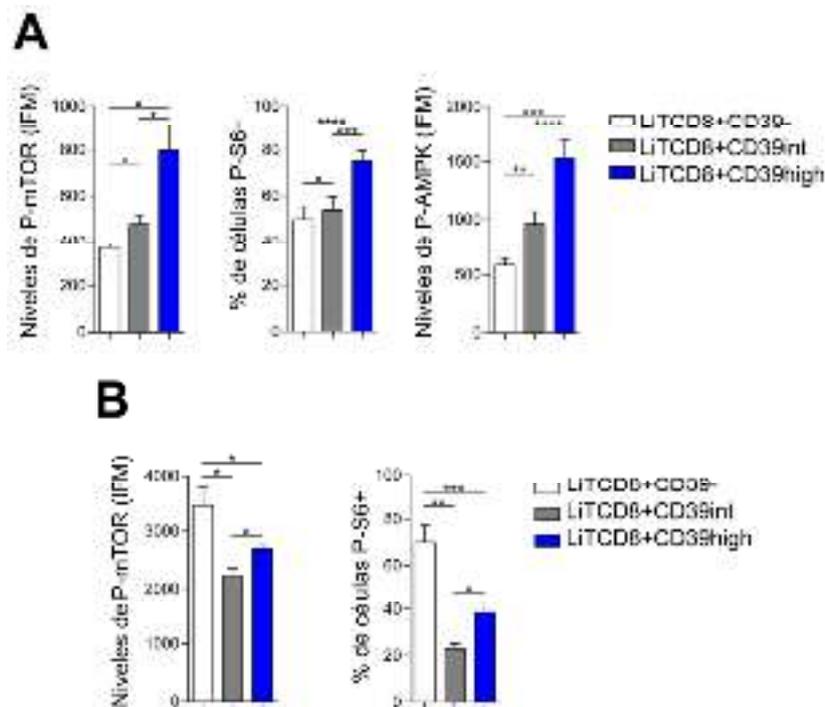


Figura 18: LiTCD8⁺CD39⁺ exhiben una menor respuesta metabólica que LiTCD8⁺CD39⁻ cuando son re-estimulados. **A**, Los gráficos de barras muestran los niveles de P-mTOR, P-AMPK y la frecuencia de células P-S6⁺ *ex vivo* en las subpoblaciones indicadas de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA (n=7). **B**, Los gráficos de barras muestran los niveles de P-mTOR y la frecuencia de células P-S6⁺ en las subpoblaciones indicadas de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores luego de su re-estimulación *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 (n=5-6). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ****P≤0,0001.

2.3 Expresión de receptores inhibitorios.

Los LiT exhaustos se generan en condiciones de inflamación crónica debido a estimulación constante a través de su TCR y a otras señales que reciben en el MAT o en órganos infectados por virus o parásitos ^{67, 126}. Como se mencionó en la Introducción, estas células están caracterizadas por un aumento gradual en la expresión de distintos RIs en su superficie, entre ellos PD-1, Tim-3 y TIGIT, y por la pérdida progresiva de sus funciones efectoras. En los resultados mostrados previamente se observó que los LiTCD8⁺CD39^{high} están presentes exclusivamente en el MAT y que su inducción está fuertemente relacionada a la estimulación específica de antígeno. De hecho, estas células aumentan su frecuencia en el MAT durante la progresión tumoral en modelos experimentales y mostraron indicios de haber sido fuertemente activadas. Más aún, al evaluar su funcionalidad fue destacable su alta capacidad de producir IFN γ , aunque a la vez mostraron ser deficientes productoras de IL-2 y TNF α . Posterior a la re-estimulación los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron una menor capacidad proliferativa en comparación con los LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, junto con una baja fosforilación de mTOR y S6. Todos estos resultados indican que la alta expresión de CD39 se asociaría a una subpoblación de LiT intratumorales con características de agotamiento. Para confirmar esta hipótesis se evaluó la expresión de distintos receptores inhibitorios en LiTCD8⁺ obtenidos de tumores B16F10-OVA. En este estudio se pudo observar que los LiTCD8⁺CD39^{high} poseían una expresión significativamente mayor de los cinco receptores inhibitorios evaluados (PD-1, Tim-3, LAG-3, TIGIT y 2B4) comparado con la población de LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} (Figura 19A). También se detectó que solo PD-1 fue expresado por LiTCD8⁺CD39^{int}, lo cual coincide con nuestros resultados previos que señalan a estas células como una subpoblación activada con un fenotipo intermedio entre LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{high}. La alta expresión de múltiples RIs en LiTCD8⁺CD39^{high} también fue observada en otros modelos experimentales murinos como 4T1, MCA-OVA y CT26 (Figura 19B), sugiriendo que la asociación entre la expresión de CD39 y RIs es un fenómeno conservado en diferentes MATs. Al evaluar la expresión de RIs en la subpoblación de LiTCD8⁺ específicos para OVA también fue posible determinar que aquellos con un fenotipo CD39^{high} poseían mayor expresión de Tim-3 y LAG-3 que los LiTCD8⁺CD39^{int}, mientras que la gran mayoría

de LiTCD8⁺ específicos para OVA expresaba PD-1, independientemente si eran CD39^{int} o CD39^{high} (Figura 19C).

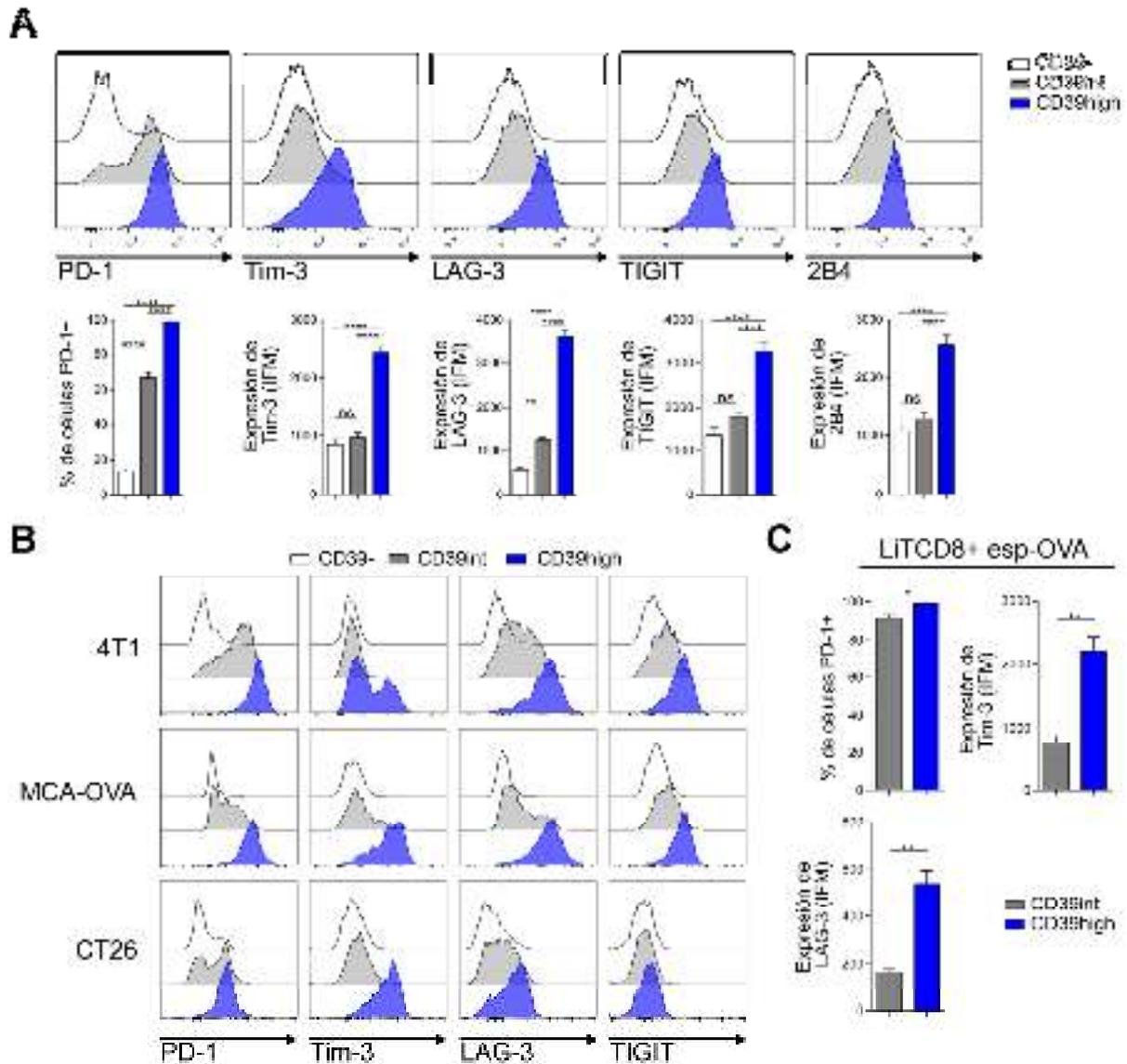


Figura 19: LiTCD8⁺CD39^{high} exhiben alta expresión de múltiples RIs. **A**, Histogramas y gráficos de barras muestran la expresión de RIs en LiTCD8⁺ CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} obtenidos de tumores B16F10-OVA (n=6). **B**, Histogramas representativos muestran la expresión de RIs en LiTCD8⁺ CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} obtenidos de tumores 4T1, MCA-OVA y CT26 (representativo de un n=5). **C**, Los gráficos de barras muestran la expresión de RIs en LiTCD8⁺ CD39^{int} y CD39^{high} específicos para OVA, obtenidos de tumores B16F10-OVA (n=4). Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01;

Analizando estos resultados se puede destacar el contraste en la expresión de algunos RIs en LiTCD8⁺. Tal es el caso de Tim-3, el cual fue exclusivamente expresado por LiTCD8⁺CD39^{high} en todos los modelos experimentales, indicando

una clara asociación entre la presencia de este receptor y una alta expresión de CD39.

Consistentemente con la ausencia de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ en bazo y GDs de ratones con tumores, no se observó expresión significativa de RIs en $\text{LTCD8}^+\text{CD39}^-$ ni en CD39^{int} de esos órganos (Figura 20). Por otro lado, utilizando los modelos de cáncer murinos B16F10 y B16F10-OVA se determinó que una mayor inmunogenicidad de los tumores no causaba efectos en la intensidad de expresión de PD-1 y Tim-3 en $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$, aunque sí un aumento significativo en los niveles de LAG-3 y TIGIT (Figura 21). Estos resultados demuestran que la inmunogenicidad de los tumores es capaz de afectar tanto la expresión de CD39 como la de algunos RIs, resaltando un comportamiento similar entre este conjunto de moléculas inmunoregulatorias.

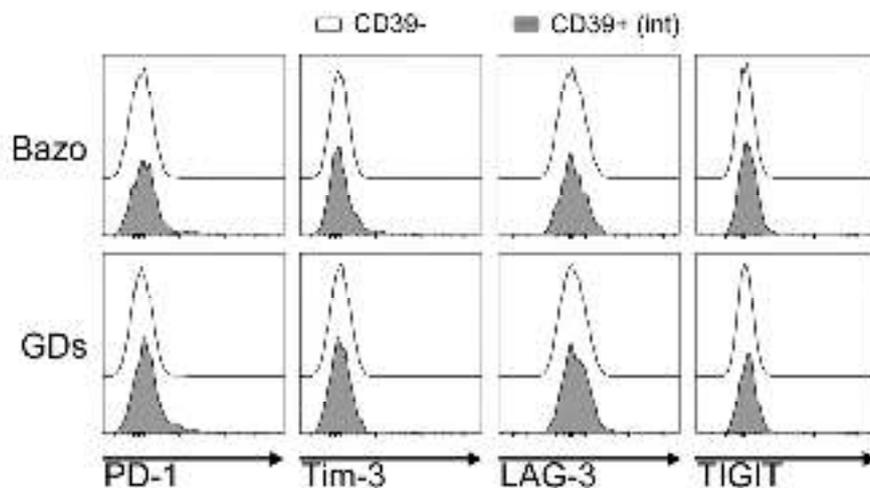


Figura 20: $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ de órganos linfoides no expresan RIs. Histogramas representativos muestran la expresión de RIs en $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$ y CD39^+ de GDs y bazos de ratones con tumores B16F10-OVA (Representativo de un $n=6$).

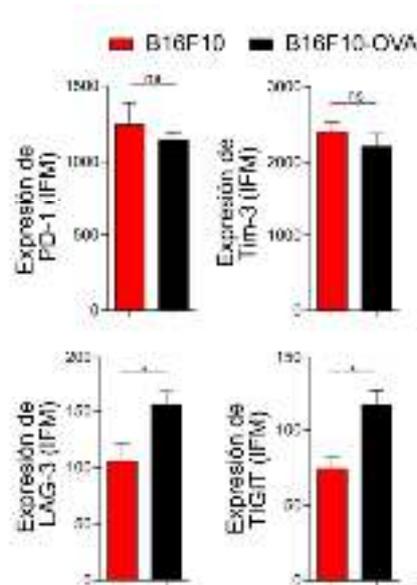


Figura 21: Tumores de alta inmunogenicidad promueven mayor expresión de LAG-3 y TIGIT en LiTCD8⁺CD39^{high}. Los gráficos de barra muestran la comparación en la expresión de IRs en LiTCD8⁺CD39^{high} obtenidos de tumores B16F10 y B16F10-OVA al día 17 p.i (n=4). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05.

2.4 Expresión de factores de transcripción asociados a células efectoras y agotadas.

Además de la alta expresión de IRs se han definido perfiles de expresión factores de transcripción asociados a agotamiento. Así, Paley y col. encontraron que LiTCD8⁺ terminalmente agotados mostraban un fenotipo Eomes^{high}T-bet^{low}, mientras que LiT exhaustos “progenitores”, en un estado previo al agotamiento terminal, poseían un fenotipo Eomes^{high}T-bet^{high} ⁷³. Por otro lado, también se ha observado que los LiT exhaustos exhiben una alta y sostenida expresión de Blimp-1, un factor de transcripción que participa en la diferenciación de LiT ⁷². Al analizar el perfil de factores de transcripción en LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores de animales inyectados con la línea B16F10-OVA se pudo determinar que los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraban mayor expresión de Eomes, T-bet y Blimp-1 que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} (Figura 22). La alta expresión de Eomes y Blimp-1 coincidió con lo observado por Paley y col. en modelos de infecciones virales crónicas. Sin embargo, en el MAT los LiTCD8⁺CD39^{high} mantuvieron elevados niveles de T-bet, lo cual podría explicar la producción sostenida de IFN γ por parte de estas células.

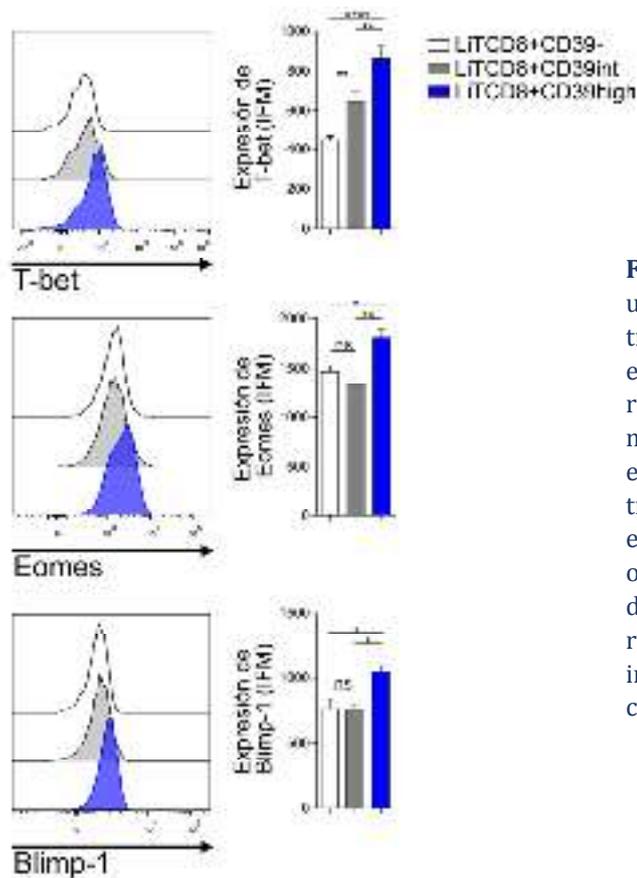


Figura 22: LiTCD8⁺CD39^{high} muestran una alta expresión de factores de transcripción asociados a células efectoras y exhaustas. Los histogramas representativos y los gráficos de barra muestran la comparación en la expresión de los factores de transcripción Eomes, T-bet y Blimp-1 en LiTCD8⁺ CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} obtenidos de tumores B16F10-OVA al día 17 p.i. (n=5). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo;

2.5 Evaluación de CD39 como marcador de LiTCD8⁺ exhaustos en el microambiente tumoral.

En estudios previos se han establecido marcadores clásicos para identificar a LiT exhaustos en el contexto de la respuesta inmune antitumoral. Así, Sakuishi y col. propusieron a los RIs PD-1 y Tim-3 en los modelos experimentales CT26, B16F10 y 4T1⁸³. Con el objetivo de determinar si CD39 puede ser utilizado como un nuevo marcador de agotamiento en el MAT, identificamos primero a LiTCD8⁺ exhaustos en base a la coexpresión de PD-1 y Tim-3 (Figura 23A, izquierda). Posteriormente, evaluamos la expresión de CD39 en estas células. En este análisis los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ exhibieron una expresión significativamente mayor de CD39 comparada con la de los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻ y LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻, las cuales mostraron una expresión intermedia y baja de la enzima, respectivamente (Figura 23A, derecha). Más aún, de forma similar a los LiTCD8⁺CD39^{high}, los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ mostraron un bajo porcentaje de células CD73⁺ (Figura 23B). Esta correlación entre la expresión de CD39, PD-1 y Tim-3 permitió, posteriormente, purificar por FACS LiTCD8⁺CD39^{high} identificándolos con anticuerpos dirigidos contra estos RIs, de

manera que al realizar ensayos funcionales con las células purificadas no hubiese anticuerpos unidos a CD39 que pudiesen afectar su actividad enzimática. Con el fin de confirmar el estado de agotamiento de $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^+$, las tres subpoblaciones definidas por la expresión de PD-1 y Tim-3 fueron purificadas y reestimuladas *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 recombinante, y luego se analizó la expresión de T-bet, Ki-67 y la producción de IFN γ . El análisis post estímulo mostró en la subpoblación de $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^+$ una menor expresión de T-bet y frecuencia de células IFN γ^+ que en $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$ y $\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$, y también un menor potencial proliferativo demostrado por la baja frecuencia de células Ki-67 $^+$, todas características de una población terminalmente agotada (Figura 23C y D).

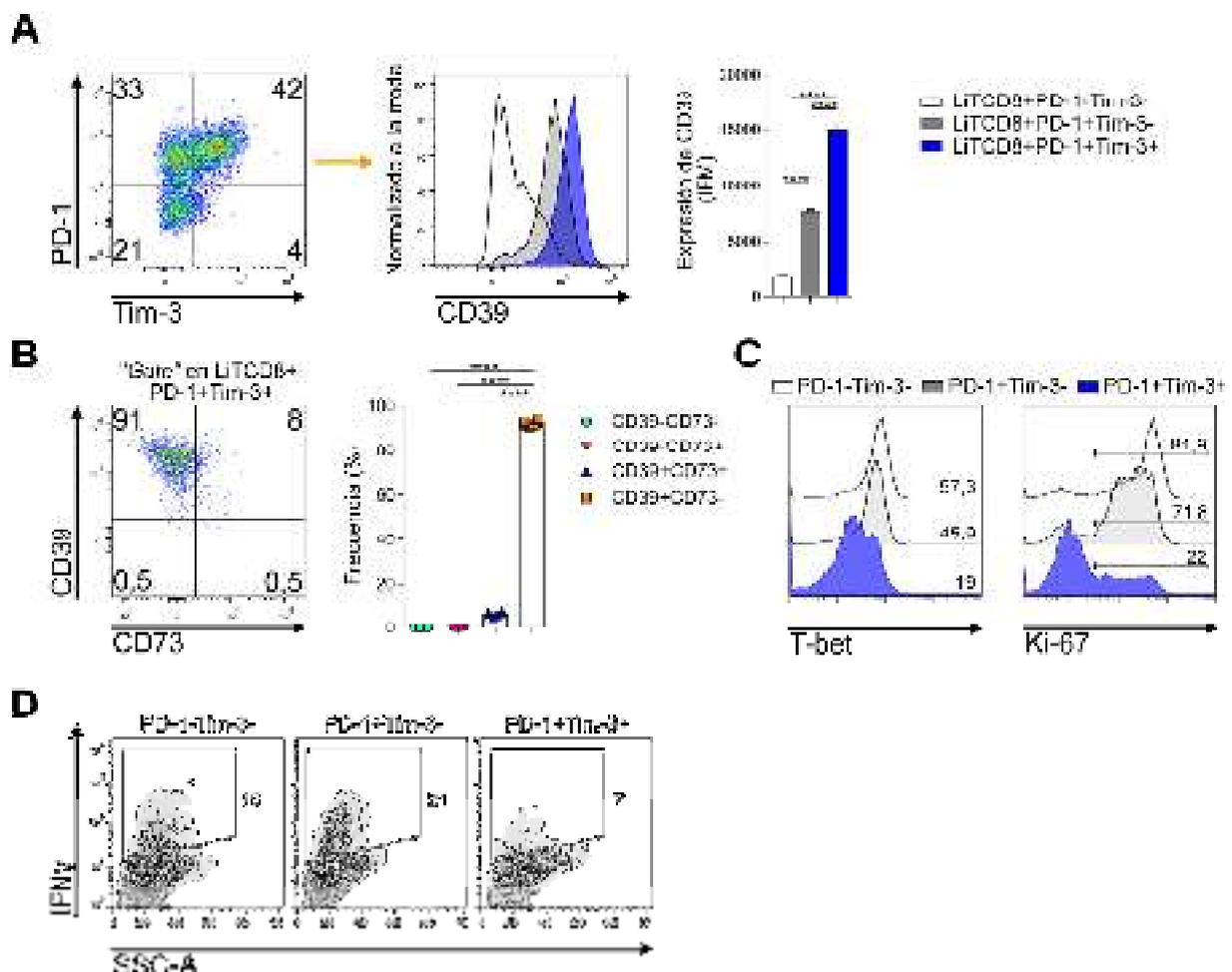


Figura 23: CD39 es un marcador de LiTCD8^+ exhaustos en el MAT. **A**, El “Dot plot” representativo (izquierda) muestra la identificación de LiTCD8^+ exhaustos infiltrantes de tumores B16F10-OVA en base a la coexpresión de PD-1 y Tim-3. El histograma representativo y el gráfico de barras (centro y derecha) muestran la expresión de CD39 en $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$, $\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$ y $\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^+$ infiltrantes de tumores B16F10-OVA (n=6). **B**, el “Dot plot” representativo y el gráfico de barras muestran la expresión de CD39 y CD73 en $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^+$ infiltrantes de tumores B16F10-OVA (n=6). **C**, Los histogramas representativos muestran la expresión de T-bet y la frecuencia de células Ki-67 $^+$ en $\text{LiTCD8}^+\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$, $\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^-$ y $\text{PD-1}^+\text{Tim-3}^+$ intratumorales que fueron sorteados y estimulados *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 recombinante durante 72h. **D**, Los “Density plots” representativos muestran la frecuencia de

células productoras de IFN γ en LiTCD8⁺ PD-1⁻Tim-3⁻, PD-1⁺Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁺ intratumorales que fueron sorteados y estimulados como en C. Resultados representativos de 2-4 experimentos independientes. En A y B datos presentados como media \pm EEM; **** $P\leq 0,0001$.

Conclusiones parciales 2

En esta segunda parte de resultados se observó que:

- Al recibir un estímulo policlonal los LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores exhiben una alta frecuencia de células productoras de IFN γ , pero un reducido porcentaje de células TNF α ⁺ e IL-2⁺ comparado con LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, lo cual se traduce en una menor polifuncionalidad de los primeros.
- La estimulación de LiTCD8⁺CD39^{high} con un péptido de OVA induce un aumento en la frecuencia de células productoras de IFN γ , pero no favorece un aumento significativo de células TNF α ⁺ e IL-2⁺.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores muestran un mayor potencial citotóxico que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores muestran una proliferación activa y una alta fosforilación de mTOR y S6 al ser estudiados *ex vivo*. Sin embargo, luego de su re-estimulación *in vitro* con un estímulo policlonal estas células muestran una menor respuesta proliferativa y menor fosforilación de las proteínas mencionadas que los LiTCD8⁺CD39⁻. Esto podría asociarse a un fenotipo disfuncional o terminalmente diferenciado en los LiTCD8⁺CD39^{high}.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} poseen altos niveles de AMPK fosforilada, lo cual podría indicar que estas células se encuentran bajo estrés energético.

- En todos los modelos experimentales estudiados los LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores muestran mayores niveles de expresión de RIs que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, lo cual concuerda con un fenotipo exhausto.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} poseen mayores niveles de expresión de los factores de transcripción asociados con agotamiento Eomes y Blimp-1 que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, y mayores niveles de T-bet, un factor asociado a células efectoras.
- Los LiTCD8⁺CD39^{high} pueden ser identificados en base a la coexpresión de PD-1 y Tim-3, ambos marcadores clásicos de LiT exhaustos, lo cual permite proponer a CD39 como un nuevo marcador de LiT disfuncionales.

Resultados 3

Rol regulatorio de CD39 en LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores.

3.1 Actividad enzimática de CD39 expresado por LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores.

Para abordar el estudio del efecto de la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ primero se evaluó la actividad enzimática de la ectoenzima, ya que la misma puede ser afectada por diferentes modificaciones postraduccionales de la proteína⁹³. Para ello, se purificaron LiTCD8⁺ intratumorales en base a la expresión de PD-1 y Tim-3, de manera de no interferir con la actividad enzimática de CD39 como podría ocurrir al utilizar anticuerpos dirigidos contra la ectoenzima. Así, mediante FACS se obtuvieron separadamente LiTCD8⁺ PD-1⁻Tim-3⁻, PD-1⁺Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁺, de manera de tener representadas en el experimento a las poblaciones CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high}. Además, también se purificaron LiTCD8⁺ de bazo de ratones sanos que no fueron inyectados con la línea tumoral para ser utilizados como controles. Para analizar la capacidad de estas células de hidrolizar ATP extracelular, se incubaron las células de cada subpoblación con ATP exógeno y luego de 10 minutos se analizó la cantidad de ATP remanente en el sobrenadante de los cultivos. Como se puede observar en la Figura 24A los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (CD39^{high}) tuvieron la mayor capacidad para hidrolizar ATP extracelular de las cuatro poblaciones analizadas. Además, acorde con la expresión de CD39 de cada subpoblación, los LiTCD8⁺PD-

1⁺Tim-3⁻ mostraron un mayor porcentaje de hidrólisis de ATP que los LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ y que LiTCD8⁺ de bazo. En este experimento fue llamativa la similitud entre la magnitud del porcentaje de hidrólisis de ATP y la intensidad de expresión de CD39 observada en cada una de estas células en la Figura 23A. Al repetir el mismo ensayo, pero incubando las células durante un periodo más prolongado con ATP (60 min), se pudo observar que los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ hidrolizaron el metabolito hasta niveles casi indetectables en los sobrenadantes, mientras que en sobrenadantes de LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ y LiTCD8⁺ de bazo aún quedaba más del 50% de ATP remanente (Figura 24B). En este experimento no se examinó la subpoblación de LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻, ya que no fue posible su purificación en cantidades suficientes para realizar múltiples ensayos debido a complicaciones técnicas.

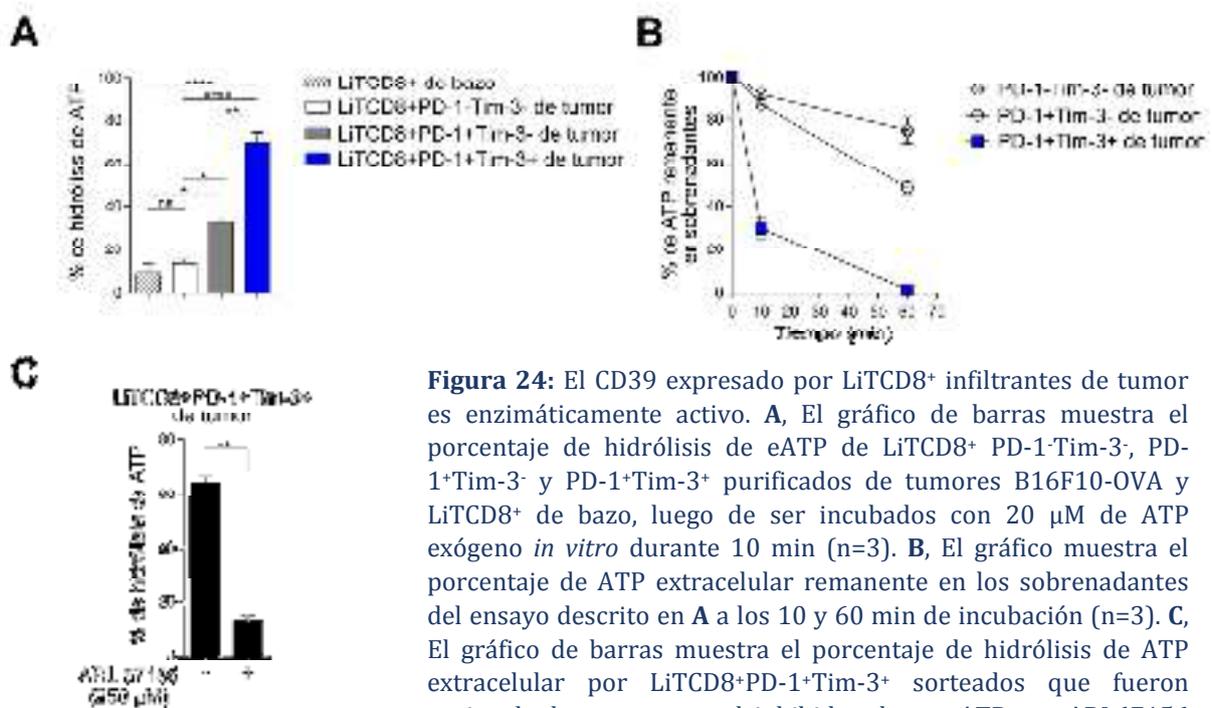


Figura 24: El CD39 expresado por LiTCD8⁺ infiltrantes de tumor es enzimáticamente activo. **A**, El gráfico de barras muestra el porcentaje de hidrólisis de eATP de LiTCD8⁺ PD-1⁻Tim-3⁻, PD-1⁺Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁺ purificados de tumores B16F10-OVA y LiTCD8⁺ de bazo, luego de ser incubados con 20 μM de ATP exógeno *in vitro* durante 10 min (n=3). **B**, El gráfico muestra el porcentaje de ATP extracelular remanente en los sobrenadantes del ensayo descrito en **A** a los 10 y 60 min de incubación (n=3). **C**, El gráfico de barras muestra el porcentaje de hidrólisis de ATP extracelular por LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ sorteados que fueron preincubados, o no, con el inhibidor de ectoATPasas ARL67156 (n=2). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Datos presentados como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01; ****P≤0,0001.

Para confirmar que la hidrólisis de ATP extracelular observada por parte de LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ correspondía a la expresión de CD39 y no a otros mecanismos que consuman este metabolito, se realizaron ensayos utilizando el inhibidor de ectoATPasas ARL67156. Este compuesto es un análogo del ATP, no hidrolizable, que bloquea el sitio activo de ATPasas extracelulares inhibiendo su función, y que es incapaz de atravesar la membrana plasmática^{127, 128}. Los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ fueron preincubados con ARL67156 durante 16 h previo a adicionar ATP en los

últimos 10 minutos. Como muestra la Figura 24C la preincubación de las células con el inhibidor redujo notoriamente la capacidad de las mismas de hidrolizar ATP, llegando a niveles de hidrólisis comparables a los observados para LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ y LiTCD8⁺ de bazo en la Figura 24A. Rutinariamente, en estos experimentos se controló que al momento de adicionar el ATP exógeno la viabilidad de las células en ambas condiciones fuese similar. Estos resultados, sumados a reportes previos que indican que en LiT no hay otras ectoATPasas que contribuyan sustancialmente a la señalización purinérgica en LiT ⁹⁴, permitieron concluir que la hidrólisis observada por LiTCD8⁺ exhaustos se debía a la expresión de CD39.

3.2 Rol regulatorio de LiTCD8⁺CD39^{high} sobre la proliferación y producción de citoquinas de LiTCD8⁺ respondedores.

Dado el rol inmunoregulatorio que se le ha atribuido a CD39 en el contexto de la respuesta inmune antitumoral ¹⁰⁰, se realizaron ensayos para determinar si la subpoblación de LiTCD8⁺CD39^{high} exhaustos era capaz de modular la funcionalidad de otras células. Estudios previos demostraron que CD39 puede afectar el estado de activación de distintos leucocitos a través de la eliminación de ATPe, el cual constituye una importante señal proinflamatoria, especialmente en el MAT ¹⁰⁰.

Como primera aproximación al estudio de la capacidad inmunoregulatoria de LiTCD8⁺CD39^{high} se realizó un ensayo de supresión *in vitro*. En este ensayo fueron purificados por FACS las subpoblaciones de LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (CD39^{high}) y LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ (CD39⁻ o de baja expresión). La subpoblación de LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁻ no pudo ser utilizada en estos experimentos debido a la baja recuperación de la misma con los métodos de purificación utilizados, por lo cual las comparaciones se realizaron entre las dos poblaciones con mayor diferencia en su expresión de CD39 y en su estado de agotamiento. Por otro lado, se obtuvieron LiTCD8⁺ purificados de bazos de ratones sanos que no fueron inyectados con la línea tumoral que poseían el alelo polimórfico CD45.1, de manera que luego en el cocultivo se pudiese diferenciar por CF a los LiTCD8⁺ intratumorales (que tienen el polimorfismo CD45.2) de los de bazo. Estos LiTCD8⁺ de bazo se utilizaron como células “respondedoras” (Rp), es decir, fueron cultivados con anti-CD3/anti-CD28 de manera que la estimulación indujera en ellas una respuesta proliferativa y producción de citoquinas. Así, se cocultivaron LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ y PD-1⁻Tim-3⁻

con LiTCD8⁺ Rp (diseño experimental en Figura 25A). Luego se determinó si los LiTCD8⁺ intratumorales eran capaces de modular la proliferación y producción de citoquinas de los Rp. Luego de 72 h de cocultivo las células Rp fueron identificadas mediante el marcador CD45.1 por CF y se evaluó su proliferación por dilución del colorante CFSE y su producción de IFN γ y TNF α . Los resultados mostraron que ninguna de las dos poblaciones de LiTCD8⁺ intratumorales fue capaz de modificar la proliferación de LiTCD8⁺ Rp, como se muestra en el panel representativo en la Figura 25B. Sin embargo, se pudo observar que LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ producían una disminución significativa en la frecuencia de LiTCD8⁺ Rp productores de IFN γ (Figura 25C). Por el contrario, LiTCD8⁺PD-1⁻Tim3⁻ favorecieron un aumento en la frecuencia de Rp IFN γ ⁺.

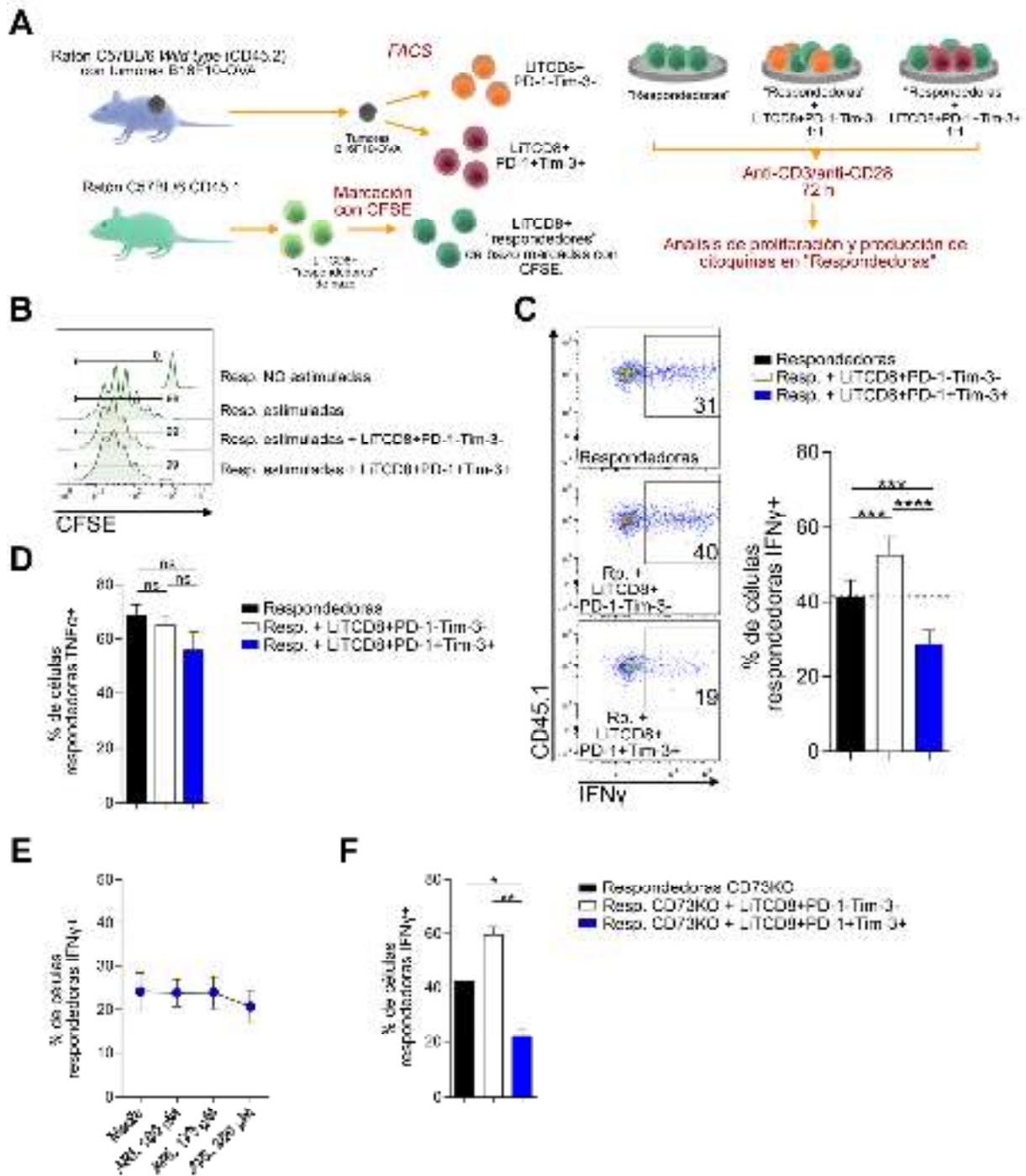


Figura 25: LiTCD8⁺ exhaustos (CD39^{high}) son capaces de modular la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺ Rp. **A**, Esquema del diseño experimental del cocultivo: mediante FACS se purificaron LiTCD8⁺ PD-1⁻Tim-3⁻, PD-1⁺Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA y LiTCD8⁺ de bazos de ratones libres de tumores como células Rp. Las células Rp fueron marcadas con CFSE y luego se cocultivaron como se indica, en una relación 1:1 y en presencia de anti-CD3/anti-CD28 por 72 h. **B**, El histograma representativo muestra la proliferación de LiTCD8⁺ Rp en cada condición, por dilución del colorante CFSE. **C**, Frecuencia de LiTCD8⁺ Rp productores de IFN γ en cada condición de cocultivo (n=11). **D**, Frecuencia de LiTCD8⁺ Rp productores de TNF α en cada condición (n=7). **E**, Frecuencia de LiTCD8⁺ Rp productores de IFN γ obtenidos del cocultivo de Rp con LiTCD8⁺ PD-1⁺Tim-3⁺ en presencia de distintas concentraciones del inhibidor de CD39, ARL67156 (n=6). **F**, Frecuencia de LiTCD8⁺ CD73KO Rp productores de IFN γ en cada condición (n=3). Resultados de 2-6 experimentos independientes. En **C-F** datos presentados como media \pm EEM; ns: no significativo; *P \leq 0,05; **P \leq 0,01; ***P \leq 0,01; ****P \leq 0,0001.

Estos hallazgos indicarían que LiTCD8⁺ exhaustos serían capaces de modular la producción de IFN γ por parte de otros LiTCD8⁺. Por otro lado, la producción de TNF α no fue significativamente modificada en LiTCD8⁺ Rp (Figura 25D).

Para evaluar si la alta expresión de CD39 en estas células era la responsable de este fenómeno de modulación se realizaron otros dos experimentos. Por un lado, se realizó un ensayo *in vitro* siguiendo las mismas condiciones descritas anteriormente, pero con el agregado de distintas concentraciones del fármaco inhibidor de CD39, ARL67156. Por otro lado, el experimento fue repetido pero utilizando LiTCD8⁺ Rp provenientes de una cepa de ratones deficiente en CD73 (CD73KO), de manera de evitar la conversión del AMP generado por CD39 en adenosina. Sorpresivamente, el bloqueo de la actividad enzimática de CD39 no fue capaz de aumentar la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺ Rp cocultivados con LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (Figura 25E), como tampoco el hecho de que las células Rp no expresasen CD73 (Figura 25F). Estos resultados indican que LiTCD8⁺ exhaustos CD39^{high} poseen otros mecanismos regulatorios independientes de CD39 que causan una reducción en la producción de IFN γ en células Rp en condiciones *in vitro*.

En esta tercera parte de resultados se observó que:

- Los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (CD39^{high}) infiltrantes de tumores exhiben mayor capacidad para hidrolizar ATP extracelular *in vitro*, al compararlos con LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ (CD39⁻), PD-1⁺Tim-3⁻ (CD39^{int}) y con LiTCD8⁺ de bazo de ratones controles.
- Los LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (CD39^{high}) infiltrantes de tumores son capaces de modular la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺ respondedores, mientras que los LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ (CD39⁻) favorecen una mayor producción de la citoquina en las células respondedoras.
- CD39 no está involucrado en la modulación de la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (CD39^{high}), lo cual indicaría que estas células poseen otros mecanismos regulatorios aún no dilucidados.

LiTCD8⁺CD39⁺ en tumores y ganglios linfáticos metastásicos de pacientes con cáncer.

4.1 Expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ en tumores primarios, ganglios drenantes y sangre periférica de pacientes con cáncer.

El conocimiento sobre el infiltrado particular de células del sistema inmune, y su funcionalidad, en tumores de pacientes con cáncer ha cobrado cada vez más importancia en los últimos años para el pronóstico y el diseño de terapias ²⁸. Con el fin de extrapolar las observaciones realizadas en modelos experimentales a pacientes y poder contribuir así a una mejor comprensión acerca de los mecanismos involucrados en la respuesta inmune antitumoral y en la generación del MAT, se estudió la presencia y el fenotipo de LiTCD8⁺CD39⁺ en pacientes con cáncer de mama. Para llevar a cabo el estudio se reclutó pacientes con carcinomas mamarios invasores (ductales y lobulillares), que no habían recibido terapia neoadyuvante ni ningún otro tipo de tratamiento. Se obtuvieron secciones de tumores primarios, ganglios linfáticos drenantes metastásicos (GD-Ms), GDs no metastásicos (GD-NMs) y sangre periférica. Además, se recibieron muestras de pacientes con melanoma, que fueron utilizadas para comparar con los resultados obtenidos en pacientes con cáncer de mama. Mediante CF pudo observarse en tumores primarios de pacientes con cáncer de mama poblaciones definidas de LiTCD8⁺ que expresaban CD39 ó CD73 (Tabla 1 y Figura 26A). A diferencia de los modelos experimentales murinos, no se pudieron diferenciar dos poblaciones con distinta expresión de CD39 (CD39^{int} y CD39^{high}) en todas las muestras de pacientes y por lo tanto el análisis comparativo solo se realizó entre células CD39⁻ y CD39⁺. Por otro lado, y de forma similar a los resultados obtenidos en el modelo B16F10-OVA, prácticamente no se detectaron LiTCD8⁺ coexpresando ambas ectoenzimas. Luego de analizar piezas tumorales de 9 pacientes con cáncer de mama se determinó que una media del **18,5±4,3%** (Media±EEM) de los LiTCD8⁺ intratumorales expresaban CD39 (Tabla 1). Por otro lado, en esas mismas muestras se determinó que una media del **11,2±1,7%** (Media±EEM) de los LiTCD8⁺ expresaban CD73. En GDs se discriminó entre GD-Ms

y GD-NMs mediante un estudio histopatológico que luego fue confirmado en el laboratorio por CF a través de la detección de células que expresan el marcador EpCAM, asociado a células tumorales metastásicas (Figura 26B). Luego, se evaluó la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en ambos, GDs-Ms y GDs-NMs (Figura 26C). Al analizar pares Ms/NMs de 12 pacientes se observó que en los GD-Ms la frecuencia de estas células era significativamente mayor (Figura 26D, izquierda), indicando que la presencia de células tumorales, o el microambiente generado por ellas, favorecería la inducción de esta subpoblación que expresa CD39. Por otro lado, el porcentaje de LiTCD8⁺CD73⁺ se vio ligeramente disminuido en GD-Ms, comparado con GD-NMs (Figura 26D, derecha). Cuando se estudiaron las muestras de pacientes con melanoma se observaron resultados similares (Figura 26E y F), indicando que el aumento en la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en GD-Ms podría ser un fenómeno común en tumores de distintos orígenes histológicos. En cuanto a LiTCD8⁺ de sangre periférica de pacientes con cáncer de mama, no se detectaron LiTCD8⁺CD39⁺ (Figura 26G), indicando que la inducción de estas células se daría de forma localizada en tumores primarios y sitios de metástasis. Sin embargo, en sangre una alta proporción de los LiTCD8⁺ sí expresaban CD73.

TABLA 1

Paciente (muestra de tumor de mama)	% de células CD39 ⁺ en LiTCD8 ⁺
1	6,48
2	16,5
3	42,5
4	11,7
5	12,2
6	6,98
7	21,8
8	18,3
9	37,0

Frecuencias de células CD39⁺ en LiTCD8⁺ determinadas por CF en muestras de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama.

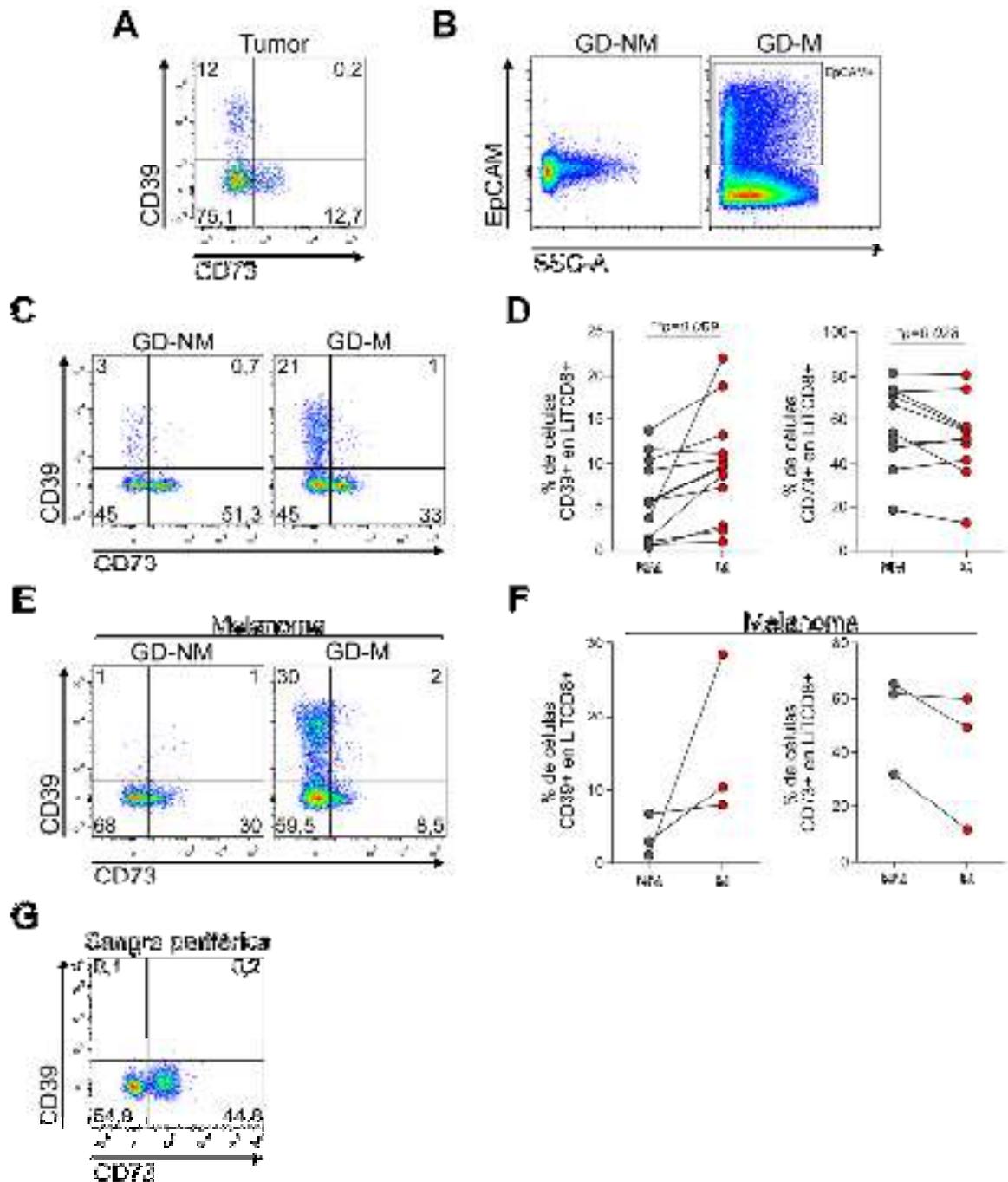


Figura 26: LiTCD8⁺CD39⁺ infiltran tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer. **A,** El “Dot plot” representativo muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73 en un tumor primario de una paciente con cáncer de mama (1 de 9 muestras de tumor primario, ver Tabla 1). **B,** Los “Dot plots” muestran la presencia de células EpCAM⁺ (células tumorales metastásicas) en un GD-M de una paciente con cáncer de mama, en comparación con un GD-NM. **C,** “Dot plots” representativos muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73 en GDs-Ms y NMs de una paciente con cáncer de mama. **D,** Frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 (izquierda) o CD73 (derecha), en GDs-Ms y NMs de pacientes con cáncer de mama (n=12). **E,** “Dot plots” representativos muestran la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73 en GDs-Ms y NMs de un paciente con melanoma. **F,** Frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 (izquierda) o CD73 (derecha) en GDs-Ms y NMs de pacientes con melanoma (n=3). **G,** “Dot plot” representativo muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73 en sangre periférica una paciente con cáncer de mama (1 de 12 muestras de sangre periférica). En **D** y **F** las líneas indican que las muestras están apareadas.

4.2 Estado de diferenciación y expresión de receptores inhibitorios asociados a agotamiento en LiTCD8⁺CD39⁺ de pacientes con cáncer.

La presencia de LiTCD8⁺CD39⁺ ha sido reportada previamente en varios tipos de tumores en pacientes, como en linfomas foliculares, leucemias linfocíticas crónicas y carcinomas renales, entre otros^{55, 112, 113}. Sin embargo, en estos estudios el fenotipo y la funcionalidad de estas células del MAT de pacientes no habían sido examinados. Para evaluar el estado de diferenciación de LiTCD8⁺CD39⁺ infiltrantes de tumor se utilizaron los marcadores CCR7 (receptor de quimiocinas que atrae LiT a las “zonas T” de órganos linfoides) y la molécula CD45RA, expresada por células vírgenes y EMRA (Células de memoria efectora terminalmente diferenciadas) (Figura 27A). Como se observa en los “*dot plots*” representativos en la Figura 27B, tanto en tumores primarios como en GD-Ms una alta frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ presentaron un fenotipo de memoria efectora. Sin embargo, a diferencia de lo observado en tumores primarios, los LiTCD8⁺CD39⁺ de GD-Ms también mostraron un cierto porcentaje de células de memoria central y vírgenes. En cuanto a LiTCD8⁺CD39⁻, la mayor parte de estas células infiltrantes de tumor mostraron un fenotipo de memoria central y memoria efectora, mientras que en GD-Ms se observó una importante frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁻ vírgenes. En LiTCD8⁺ de sangre periférica, se analizó el fenotipo de los LiTCD8⁺CD73⁺, ya que no se encontraron frecuencias significativas de LiTCD8⁺CD39⁺ en ese tejido. Así, se observó que estas células exhibían un fenotipo predominantemente virgen, lo cual podría explicar por qué se encuentran menos representadas en GD-Ms y en tumores, donde el microambiente es más inflamatorio y donde los LiTCD8⁺ se encontrarían activados (Figura 27C).

Por otro lado, y de manera similar a lo observado en LiTCD8⁺ intratumorales en los modelos experimentales murinos, los LiTCD8⁺CD39⁺ infiltrantes de tumor mostraron una mayor expresión de la molécula CD8α que LiTCD8⁺CD39⁻, indicando que estas células podrían estar respondiendo de manera diferente a la estimulación en el MAT (Figura 28).

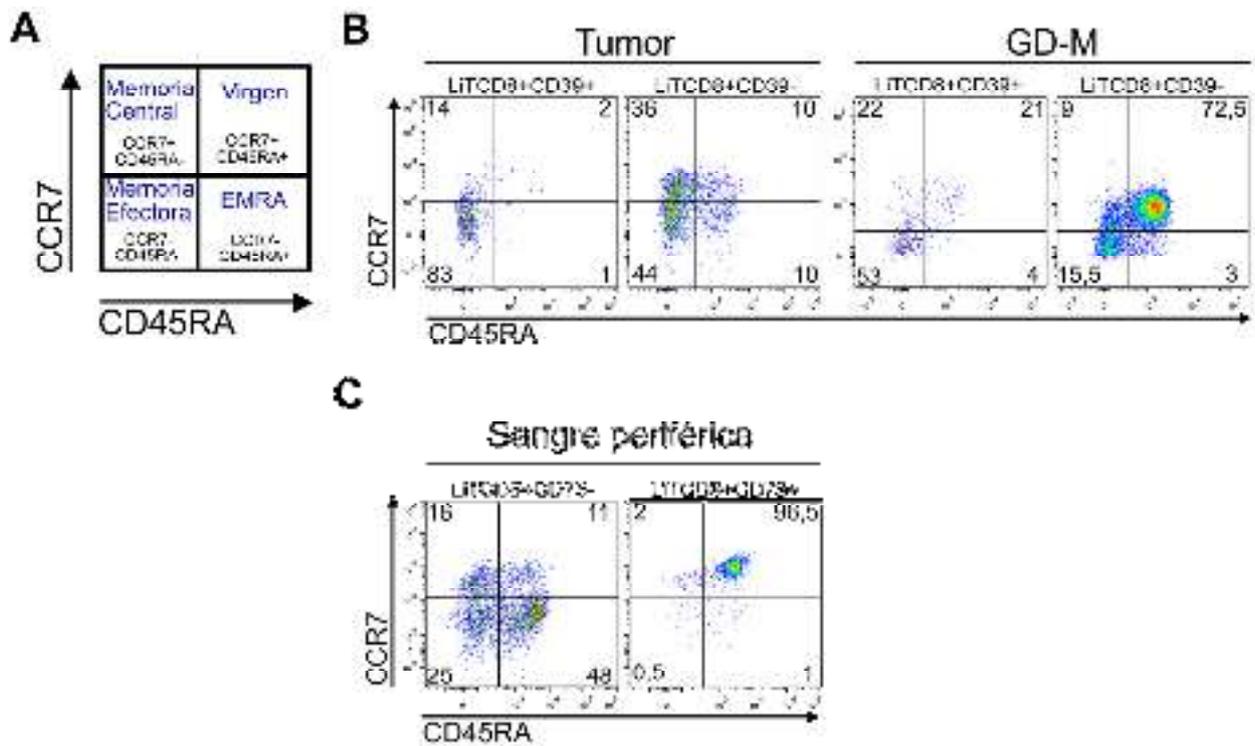


Figura 27: LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer de mama poseen principalmente un fenotipo de células de memoria/efectoras. **A**, El esquema de los distintos fenotipos de diferenciación de LiT humanos caracterizados en base a la expresión de CCR7 y CD45RA. **B**, "Dot plots" representativos muestran la frecuencia de células vírgenes, de memoria central, memoria efectora y EMRA en LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39⁺ de tumores primarios y GDs-Ms de pacientes con cáncer de mama. **C**, "Dot plot" representativo muestra la frecuencia de células vírgenes, de memoria central, memoria efectora y EMRA en LiTCD8⁺CD73⁻ y CD73⁺ de sangre periférica de una paciente con cáncer de mama.

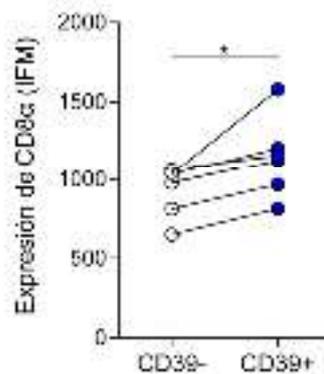


Figura 28: LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores primarios de pacientes con cáncer exhiben mayor expresión de CD8 α que LiTCD8⁺CD39⁻. El gráfico de líneas muestra la intensidad de expresión de la molécula CD8 α en LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39⁺ de tumores primarios de pacientes con cáncer de mama (n=6). Las líneas indican que las comparaciones están apareadas para cada paciente. *P<0,05.

Para evaluar si los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ de pacientes con cáncer de mama mostraban un fenotipo asociado a agotamiento como el que se observó en los modelos experimentales murinos, se procedió a analizar la expresión de distintos RIs en esta población celular. Para ello, se comparó la expresión de RIs solo en células de memoria efectora, que son las que pueden entrar en el proceso de agotamiento (descartando de los análisis linfocitos vírgenes, que no expresan RIs, identificándolos por la coexpresión de CD45RA y CD27 ó CCR7). En la Figura 29A y B se puede observar que tanto en tumores primarios como en GD-Ms los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ mostraron una expresión significativamente mayor de PD-1 y TIGIT que $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$. Además, especialmente en GD-Ms la expresión de otro RI, BTLA, también se encontró aumentada en la subpoblación de LiTCD8^+ que expresaba CD39. Otros RIs como Tim-3 y LAG-3 no fueron detectados en LiTCD8^+ de pacientes con cáncer de mama. Haciendo un estudio de coexpresión de RIs se detectó que tanto en tumores primarios como en GD-Ms, los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ poseían una mayor proporción de células coexpresando 2 o más receptores inhibitorios comparado con la población de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$ (Figura 29C). Al analizar los GD-Ms de pacientes con melanoma pudo observarse que en estas muestras los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ también exhibían mayor expresión de PD-1 y TIGIT que $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$ (Figura 29D). Estos resultados en conjunto indican que en pacientes con cáncer CD39 se encuentra asociado a la expresión de marcadores de agotamiento.

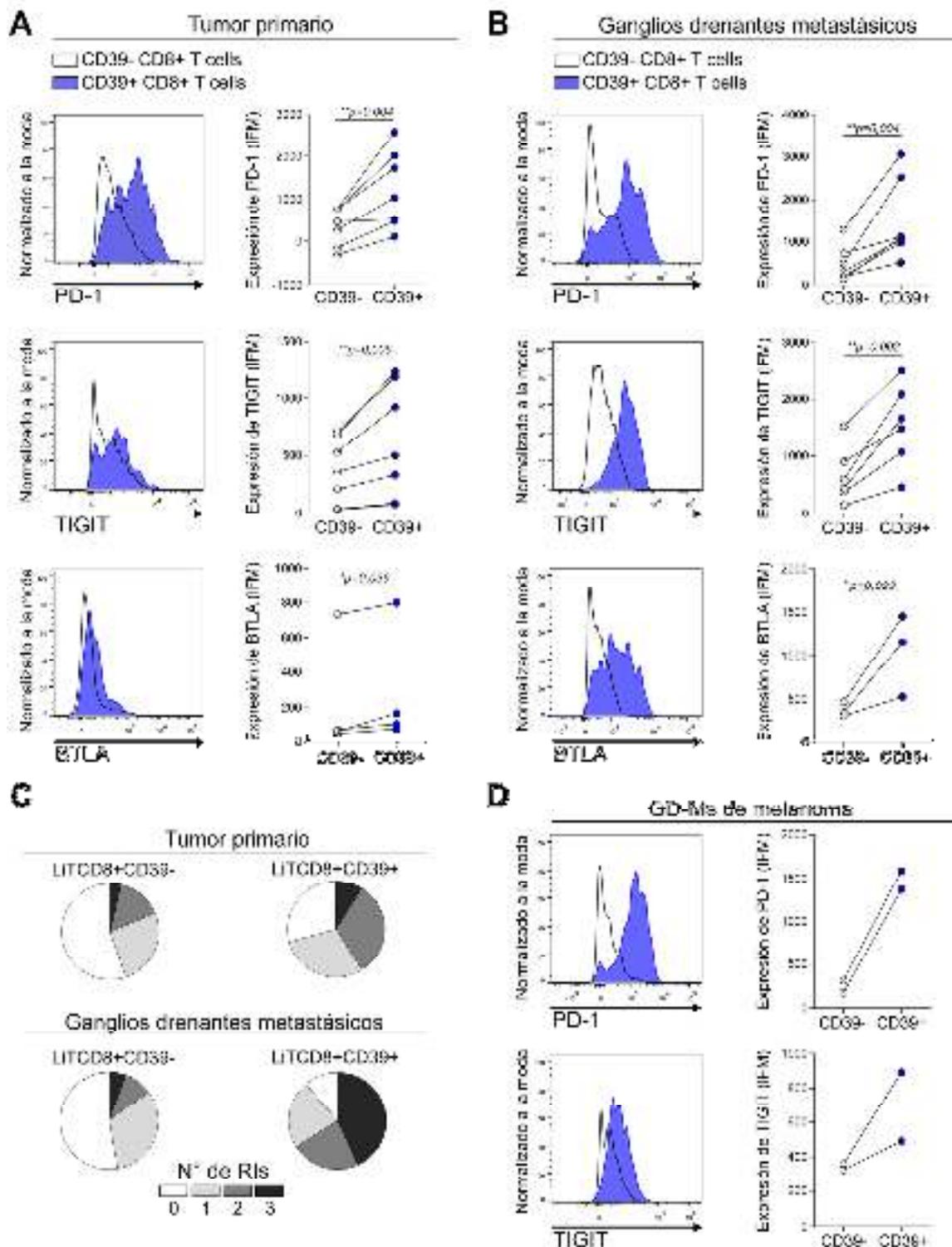


Figura 29: LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores y ganglios linfáticos drenantes de pacientes con cáncer de mama muestran alta expresión de RIs. **A** y **B**, Histogramas y gráficos muestran la intensidad de expresión de PD-1, TIGIT y BTLA en LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ de tumores primarios (**A**) y GDs-Ms (**B**) de pacientes con cáncer de mama (n=3-7). **C**, Los gráficos de torta muestran la proporción de LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ que expresan de 0 a 3 RIs en tumores primarios y GDs-Ms de pacientes con cáncer de mama (n=3-4). **D**, Histogramas y gráficos muestran la intensidad de expresión de PD-1 y TIGIT en LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ de GDs-Ms de pacientes con melanoma (n=2). En **A**, **B** y **D** las líneas indican que las comparaciones están apareadas para cada paciente.

4.3 Producción de citoquinas proinflamatorias y potencial citotóxico.

Luego de observar que LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores y GD-Ms de pacientes con cáncer exhibían alta expresión de RIs se evaluó la funcionalidad de estas células para corroborar que se encontraban en un estado de agotamiento. Para ello, se estimularon *ex vivo* células obtenidas de ambos tejidos y se analizó la capacidad de LiTCD8⁺ de producir IFN γ , TNF α e IL-2, como así también su capacidad para degranular. Este estudio se realizó sobre las poblaciones de LiTCD8⁺ no vírgenes (eliminando del análisis los LiTCD8⁺CD45RA⁺CD27⁺), para evaluar la funcionalidad de células efectoras y de memoria, capaces de responder al estímulo produciendo citoquinas. En la Figura 30A se observa que los LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores primarios exhibieron un reducido porcentaje de células productoras de IFN γ y TNF α , al compararlos con LiTCD8⁺CD39⁻, mientras que no se observaron diferencias significativas en la producción de IL-2 entre ambas subpoblaciones. Por otro lado, de forma similar a lo observado en el modelo murino B16F10-OVA, los LiTCD8⁺CD39⁺ mostraron un alto potencial citotóxico, evidenciado por una mayor frecuencia de células CD107a⁺ luego de la estimulación. En cuanto a LiTCD8⁺ de GD-Ms, se pudo observar que la expresión de CD39 en estas células estaba asociada a menor frecuencia de células productoras de las tres citoquinas evaluadas, incluso IL-2, y también mantenían una mayor frecuencia de células CD107a⁺ (Figura 30B). Tanto en tumores como en GDs-Ms aquellos LiTCD8⁺ que expresaban CD39 también mostraron una frecuencia significativamente menor de células doble productoras de IFN γ y TNF α que los LiTCD8⁺CD39⁻, evidenciando aún más un fenotipo con menor funcionalidad (Figura 30C). En GD-Ms de dos pacientes con melanoma pudo también analizarse la frecuencia de células TNF α ⁺, IL-2⁺ y CD107a⁺, obteniéndose resultados similares a los observados en pacientes con cáncer de mama (Figura 30D). Todos estos resultados indican que en pacientes con cáncer los LiTCD8⁺CD39⁺ son inducidos en sitios anatómicos donde se encuentran células tumorales y que además poseen un fenotipo exhausto que incluye expresión de RIs y reducida capacidad de producir citoquinas proinflamatorias.

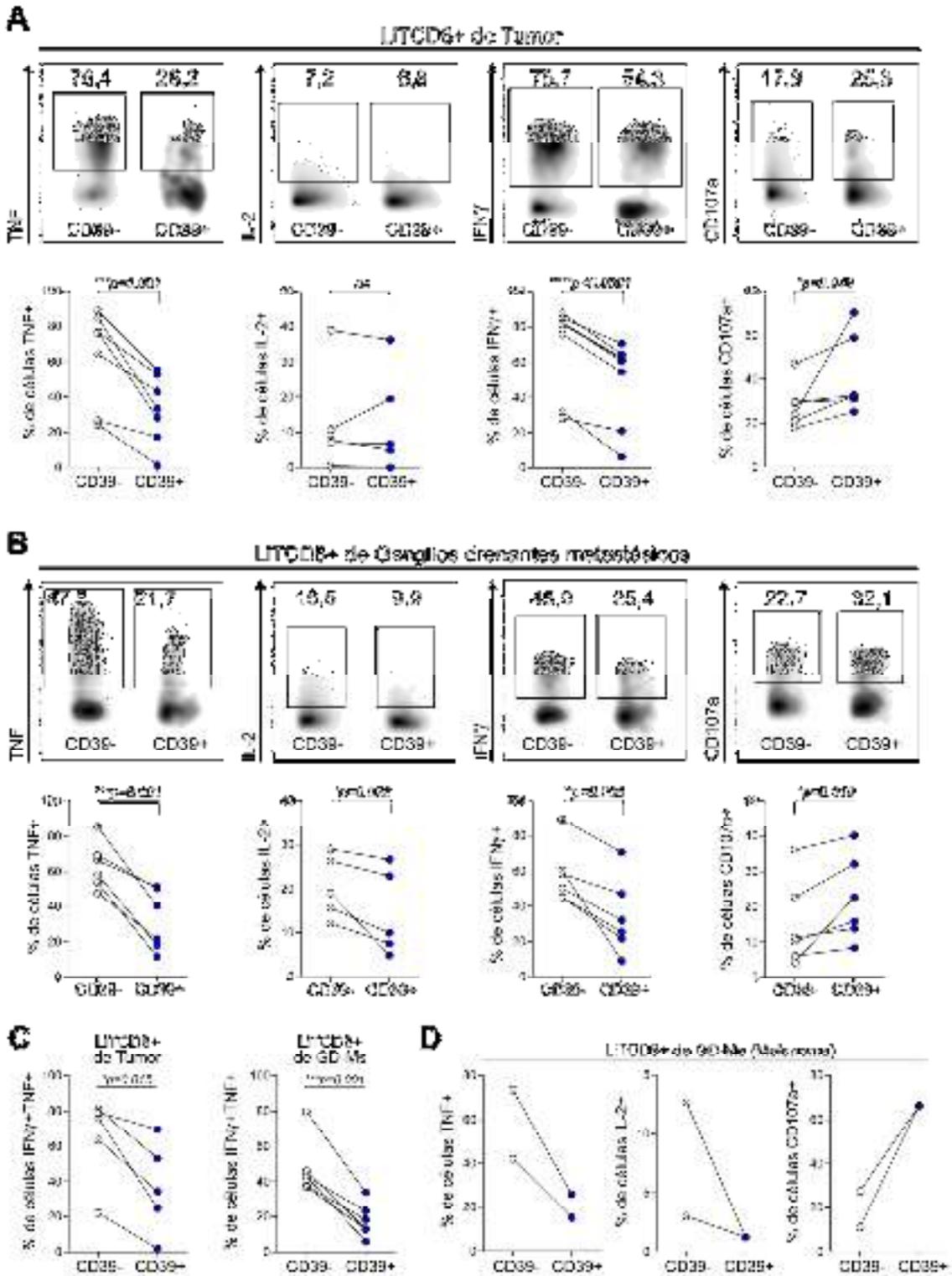


Figura 30: LiTCD8⁺CD39⁺ de pacientes con cáncer de mama muestran una menor capacidad de producir citoquinas proinflamatorias que LiTCD8⁺CD39⁻. **A** y **B**, "Density plots" y gráficos muestran la frecuencia de células TNF α ⁺, IL-2⁺, IFN γ ⁺ y CD107a⁺ en LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ de tumores primarios (**A**) y GDs-Ms (**B**) de pacientes con cáncer de mama luego de ser estimulados *ex vivo* con PMA/Iono (n=5-7). **C**, Los gráficos muestran la frecuencia de células coproductoras de IFN γ y TNF α en LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ de tumores primarios y GDs-Ms de pacientes con cáncer de mama, luego de ser estimulados como en **A** (n=5). **D**, gráficos muestran la frecuencia de células TNF α ⁺, IL-2⁺ y CD107a⁺ en LiTCD8⁺ CD39⁻ y CD39⁺ de GDs-Ms de pacientes con melanoma luego de ser estimulados como en **A** (n=2). En **A-D** las líneas indican que las comparaciones están apareadas para cada paciente.

En esta cuarta parte de resultados se observó que:

- En muestras de tumores y GDs de pacientes con cáncer se encuentran poblaciones definidas de LiTCD8⁺ que expresan CD39 y CD73, no observándose células que coexpresen ambas enzimas a la vez. Por otro lado, en sangre periférica de pacientes no se detectan LiTCD8⁺ que expresen CD39. Estos resultados señalan la localización restringida de los LiTCD8⁺CD39⁺ a zonas donde están presentes o se encuentran muy cercanas las células tumorales.
- En GD-Ms se observa una mayor frecuencia de LiTCD8⁺ que expresan CD39 que en GD-NMs, indicando que las células tumorales o el microambiente que generan favorece una mayor inducción de la ectoenzima en estas células.
- Los LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores primarios y GD-Ms muestran un fenotipo de células de memoria efectoras, junto con una mayor expresión de los RIs PD-1, TIGIT y BTLA que los LiTCD8⁺CD39⁻, lo cual indicaría que estas células se encuentran agotadas.
- Los LiTCD8⁺CD39⁺ de tumores primarios y GD-Ms de pacientes con cáncer muestran una menor frecuencia de células productoras de IFN γ , TNF α e IL-2 que LiTCD8⁺CD39⁻ al recibir un estímulo policlonal. Esto concuerda con un fenotipo disfuncional en los LiTCD8⁺ que expresan la ectoenzima.

Factores y señales involucradas en la inducción de CD39 en LiTCD8⁺

5.1 Inducción de CD39 en LiTCD8⁺ por citoquinas involucradas en la generación de LiT exhaustos.

Como pudo determinarse previamente en la **Sección 1.3** de resultados, la estimulación antígeno específica juega un rol crucial en la inducción de LiTCD8⁺CD39^{high} en el MAT. Dichos resultados asociaron que una alta inmunogenicidad de los tumores y un tiempo prolongado de exposición al MAT conlleva a una mayor expresión de la ectoenzima. Con el objetivo de determinar si una señalización de corto tiempo a través del TCR era capaz de gatillar la expresión de CD39, se estimularon LiTCD8⁺ purificados de GDs de ratones con tumores B16F10-OVA con anti-CD3/anti-CD28 durante 72 h. Luego de la estimulación la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ fue de $4,8 \pm 0,95\%$ (Media \pm EEM, n=6), un valor que no superó lo observado en GDs *ex vivo* ($6,06 \pm 0,70\%$; Media \pm EEM, n=10). La sola estimulación través del TCR y CD28 durante tres días no fue suficiente para inducir una mayor expresión de CD39 en LiTCD8⁺ murinos. En trabajos previos se observó que citoquinas como TGF β , IL-6 e IL-27 eran capaces de favorecer la expresión de CD39 en distintas poblaciones leucocitarias^{60, 61, 96, 97}. El TGF β es producido por muchas células inmunosupresoras, entre ellas los LiTregs y se ha demostrado su presencia en tumores B16F10 y su importancia en el MAT supresor, como también en la progresión tumoral en pacientes^{17, 129, 130, 131}. Por otro lado, otros grupos de investigación demostraron que las citoquinas IL-6, IL-27 y TGF β están involucradas en la inducción de agotamiento^{62, 68, 132}. Teniendo en cuenta que en esta tesis doctoral se describe una asociación entre la expresión de CD39 y marcadores de agotamiento, se procedió a evaluar si IL-6, IL-27 y TGF β eran capaces de inducir la expresión de CD39 en la población de LiTCD8⁺. Para determinar si IL-6 e IL-27 son producidas por células en ratones inyectados con la línea B16F10-OVA, se analizó la presencia de células productoras de ambas en GDs y tumores (Figura 31A). Como muestra la imagen representativa, en ambos tejidos pudieron observarse células productoras de las mismas. Luego, se evaluó en LiTCD8⁺ intratumorales la

fosforilación del factor de transcripción STAT3 el cual es activado, entre otros estímulos, por la señalización gatillada por IL-6 e IL-27^{96, 100}. Mediante CF pudo observarse que LiTCD8⁺CD39^{high} de tumores de animales inyectados con la línea B16F10-OVA mostraban mayores niveles de fosfo-STAT3 (P-STAT3) que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, indicando que estas células podrían haber sido estimuladas por estas citoquinas en el MAT (Figura 31B). A continuación, se prosiguió a estimular LiTCD8⁺ de GDs *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de IL-27, IL-6 ó TGFβ recombinantes, o con las tres citoquinas a la vez y se comparó con LiTCD8⁺ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 solamente. El agregado de IL-27 favoreció un aumento significativo en la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺, el cual fue incluso mayor al combinar IL-27 e IL-6 (Figura 31C). En cuanto a TGFβ, esta citoquina no fue capaz de inducir un aumento significativo en el porcentaje de células CD39⁺ en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, cabe destacar que en presencia de TGFβ una frecuencia significativamente mayor de LiTCD8⁺CD39⁺ coexpresaron CD73, incluso cuando se lo utilizó combinado con IL-6 e IL-27 (Figura 31D). De hecho, en todas las demás condiciones ensayadas, la frecuencia de células CD73⁺ fue menor a la observada *ex vivo* en LiTCD8⁺ de GDs (ver Figura 3B), incluso cuando los LiTCD8⁺ fueron estimulados solo con anti-CD3/anti-CD28. Estos resultados muestran que, en ratones C57BL/6, los LiTCD8⁺ pierden la expresión de CD73 luego de la activación, lo cual puede explicar por qué en la progresión tumoral la frecuencia de LiTCD8⁺CD73⁺ disminuye con el tiempo. Además, estas observaciones permiten inferir que la variabilidad en la expresión de CD73 en distintos tipos de tumores murinos podría deberse a un balance distinto de citoquinas en cada MAT que favorezca una expresión diferencial de esta enzima. Teniendo en cuenta que en este trabajo se demostró que la expresión de CD39 se asocia con el estado de agotamiento, se analizó la expresión de RIs en los LiTCD8⁺ estimulados con anti-CD3/anti-CD28 en presencia de las distintas citoquinas. Llamativamente, la estimulación con IL-27 *in vitro* produjo un incremento leve, pero estadísticamente significativo, en la frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ que expresaban PD-1 y Tim-3 (Figura 32A). Sin embargo, al combinar IL-27 con otras citoquinas no se produjo aumento de la expresión de estos RIs. En el caso de TGFβ este efecto puede deberse a que la activación de LiTCD8⁺ es afectada por esta citoquina; en este sentido los LiTCD8⁺ estimulados en presencia de TGFβ mostraron menor

proliferación (menor expresión de Ki-67) que los LiTCD8⁺ en las otras condiciones ensayadas (Figura 32B).

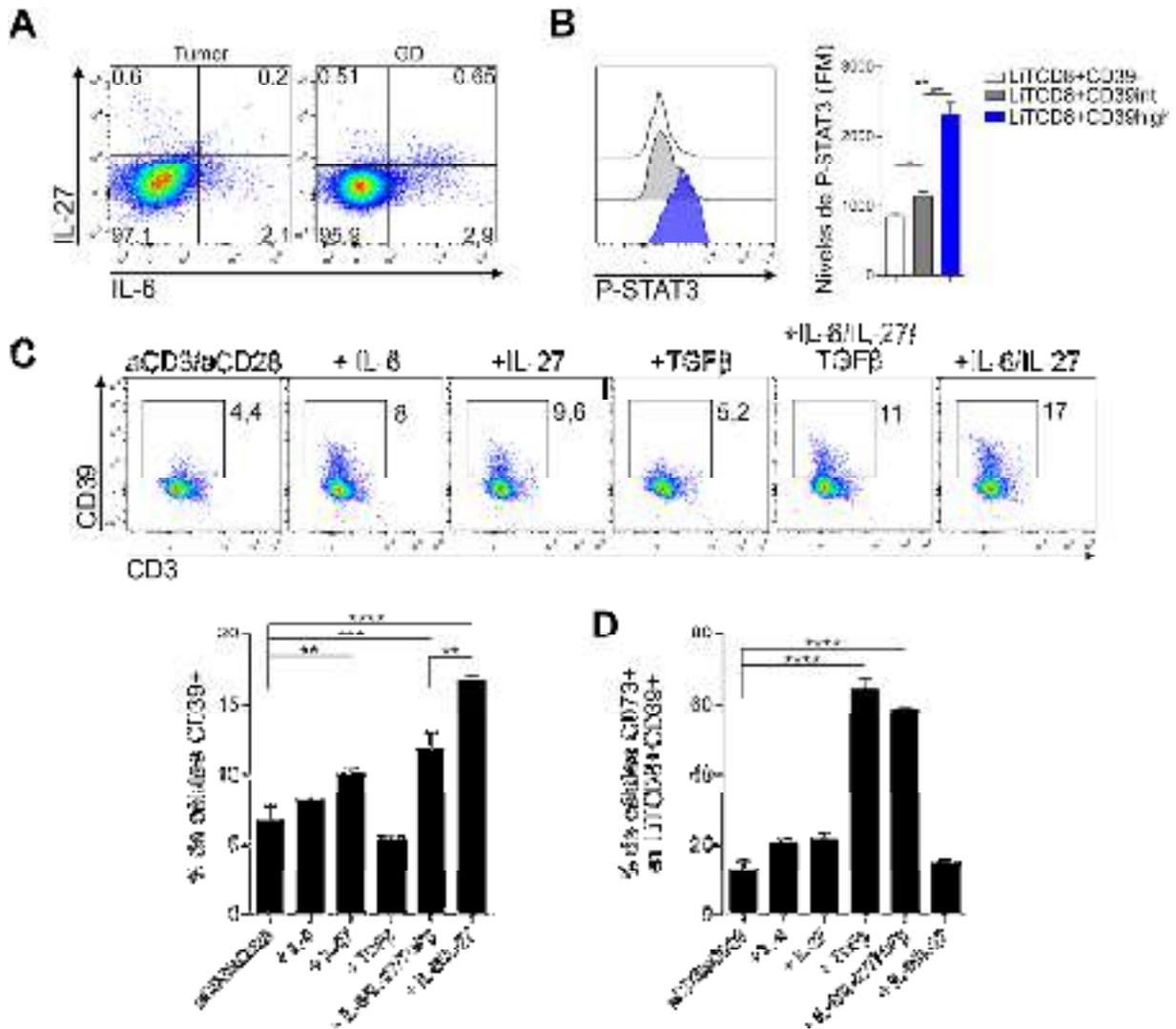


Figura 31: IL-27 e IL-6 promueven la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ murinos. **A**, Los “dot plots” representativos muestran la presencia de células productoras de IL-27 e IL-6 en tumores y GDs de ratones con tumores B16F10-OVA. **B**, El histograma y el gráfico muestran los niveles de P-STAT3 en LiTCD8⁺CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} de tumores B16F10-OVA (n=4). **C**, Los “dot plots” y el gráfico de barras muestran el porcentaje de células CD39⁺ generadas al estimular *in vitro* LiTCD8⁺, purificados de GDs de ratones con tumores B16F10-OVA, con anti-CD3/anti-CD28 y las citoquinas recombinantes indicadas (n=4). **D**, El gráfico de barras muestra la frecuencia de células CD73⁺ en LiTCD8⁺CD39⁺ generados *in vitro* con los estímulos indicados (n=4). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. En **A**, **C** y **D** los datos se presentan como media±EEM; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001;

Por otro lado, la IL-6 no afectó la proliferación de los LiTCD8⁺; sin embargo, es importante tener en cuenta que esta es una citoquina muy pleiotrópica, por lo que es probable que desencadene otros mecanismos que impiden el aumento de la expresión de RIs en estas condiciones experimentales.

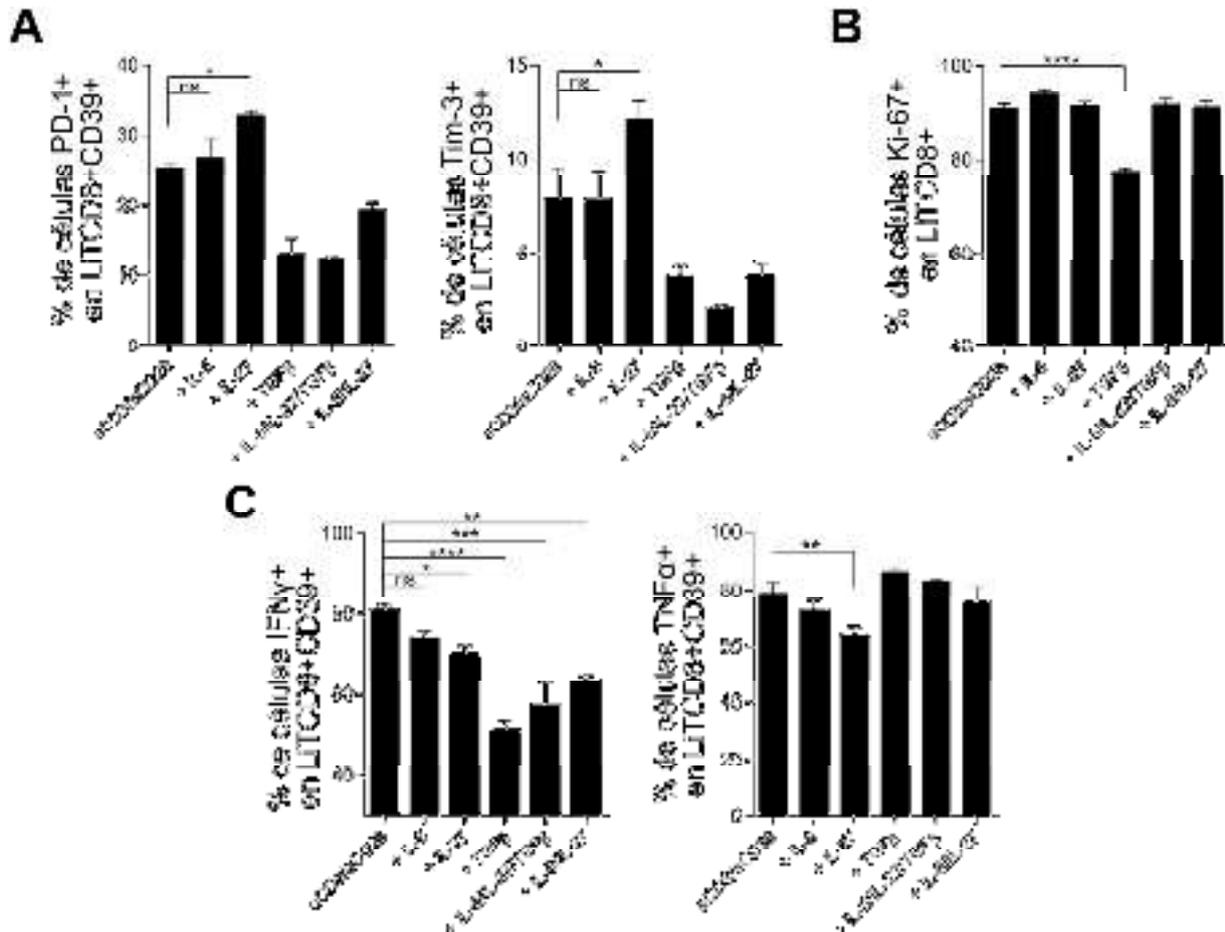


Figura 32: IL-27 induce PD-1 y Tim-3 *in vitro* en LiTCD8⁺CD39⁺ y una leve disminución en la producción de citoquinas inflamatorias. **A**, Los gráficos muestran el porcentaje de células PD-1⁺ (izquierda) y Tim-3⁺ (derecha) inducidas en LiTCD8⁺CD39⁺ *in vitro* con los estímulos indicados a partir de LiTCD8⁺ de GDs de ratones con tumores B16F10-OVA (n=4). **B**, El gráfico muestra la frecuencia de LiTCD8⁺ Ki-67⁺ luego de ser estimulados como se indica en **A** (n=4). **C**, Los gráficos muestran el porcentaje de células IFNγ⁺ (izquierda) y TNFα⁺ (derecha) en LiTCD8⁺CD39⁺ como se describe en **A** (n=4). Resultados representativos de 2 experimentos independientes. Los datos se presentan como media±EEM; ns: no significativo; *P≤0,05; **P≤0,01; ***P≤0,001; ****P≤0,0001.

Posteriormente se evaluó la funcionalidad de LiTCD8⁺CD39⁺ murinos inducidos *in vitro*. La estimulación de LiTCD8⁺ a través del TCR y CD28 en combinación con citoquinas resultó en una reducción en el porcentaje de células IFNγ⁺ en aquellas condiciones donde IL-27 ó TGFβ estaban presentes (Figura 32C), siendo más evidente con TGFβ. Por otro lado, en la mayoría de las condiciones evaluadas los LiTCD8⁺CD39⁺ mostraron una alta frecuencia de células productoras de TNFα. No obstante, cuando los LiTCD8⁺ fueron estimulados con anti-CD3/anti-CD28 e IL-27 solamente, el porcentaje de LiTCD8⁺CD39⁺ productores de TNFα se mostró reducido.

La inducción de CD39 también fue evaluada en LiTCD8⁺ de pacientes con cáncer. Para ello, se utilizaron LiTCD8⁺ de sangre periférica de pacientes con cáncer de

mama que, como se indicó previamente, no expresan CD39 (Figura 26G). En una primera aproximación, se estimularon células mononucleares de sangre periférica con anti-CD3/anti-CD28 por 72 h, lo cual indujo un marcado aumento en la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ (Figura 33A). Los LiTCD8⁺CD39⁺ inducidos no coexpresaban CD73, de forma similar a lo observado en los LiTCD8⁺ detectados en tumores primarios y GDs de pacientes con cáncer de mama (Figuras 26A y C). Luego, se procedió a estimular LiTCD8⁺ purificados de sangre periférica (es decir, en ausencia de otras células mononucleares que puedan aportar otras señales) con anti-CD3/anti-CD28. Llamativamente, al estimular LiTCD8⁺ humanos en las condiciones mencionadas también se observó un aumento en la frecuencia de células CD39⁺CD73⁻, comparando con LiTCD8⁺ no estimulados (Figura 33B y Tabla 2), aunque el porcentaje de células CD39⁺ fue menor al observado cuando se estimuló el conjunto de células mononucleares de sangre periférica. Estos resultados muestran que, a diferencia de lo que ocurre estimulando LiTCD8⁺ murinos, la estimulación de LiTCD8⁺ humanos a través de su TCR y CD28 es suficiente para gatillar la expresión de CD39.

Posteriormente evaluamos si IL-6 e IL-27 eran capaces de incrementar la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ humanos *in vitro*. Así, observamos mayores porcentajes de LiTCD8⁺CD39⁺ cuando las células fueron cultivadas en presencia de estas citoquinas, especialmente al utilizar ambas en forma simultánea (Figura 33B y Tabla 2). Además, se observó que la estimulación en presencia de IL-6 e IL-27 aumentó la expresión de PD-1 en estas células en los tres pacientes estudiados (Figura 33C y Tabla 2), mientras que la expresión de otros RIs como TIGIT y Tim-3 aumentó en LiTCD8⁺ estimulados, pero de manera diferencial en cada paciente y en cada condición.

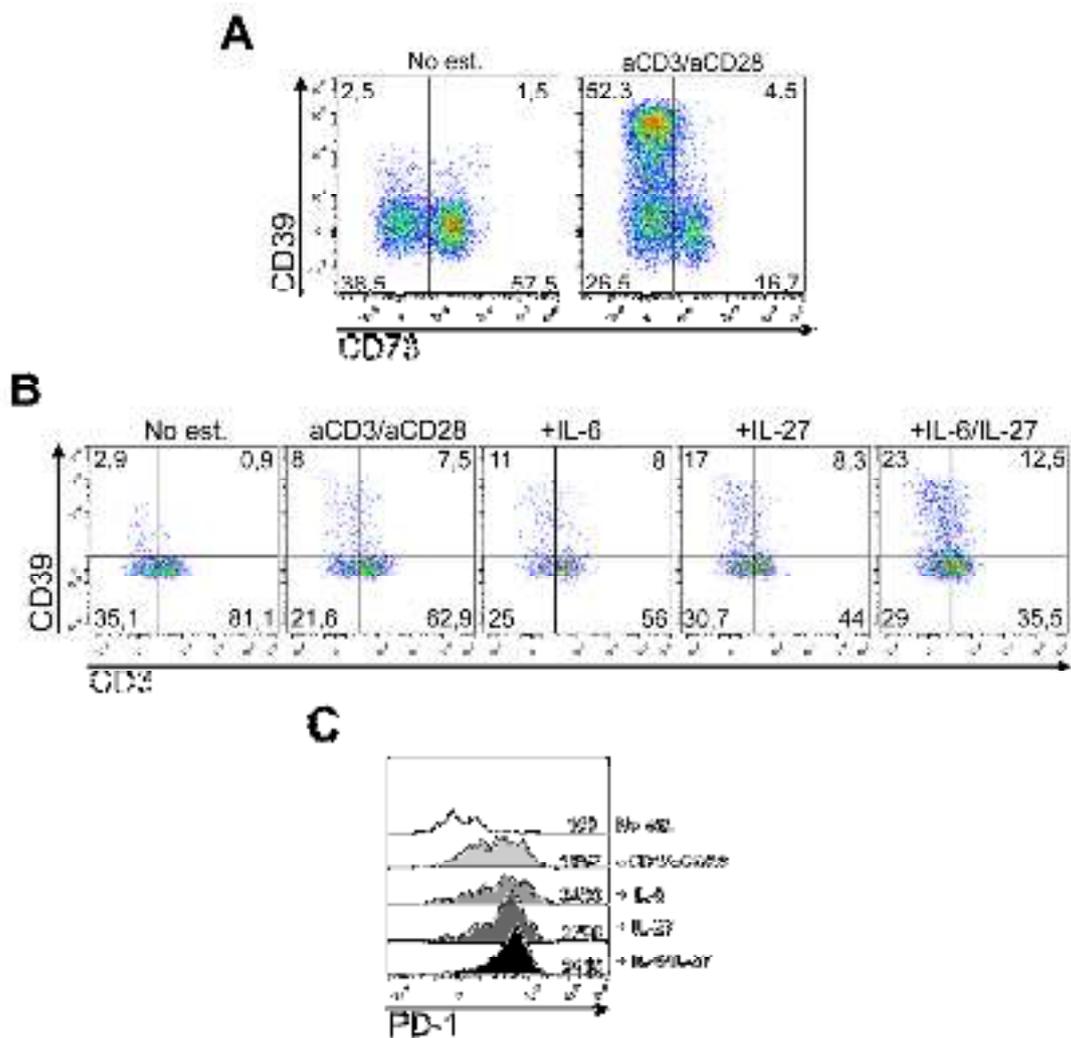


Figura 33: IL-27 e IL-6 promueven la generación de LiTCD8⁺CD39⁺ humanos *in vitro*. **A**, Los “dot plots” representativos muestran la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ de células mononucleares de sangre periférica de una paciente con cáncer de mama, estimuladas con anti-CD3/anti-CD28 o mantenidas en cultivo sin estimular (No est.) (Representativo de 4 pacientes diferentes). **B**, Los “dot plots” representativos muestran la expresión de CD39 y CD73 en LiTCD8⁺ purificados a partir de células mononucleares de sangre periférica de una paciente con cáncer de mama, estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y distintas citoquinas recombinantes o mantenidos en cultivo sin estimular (No est.) (Representativo de 3 pacientes diferentes, ver Tabla 2). **C**, El histograma representativo muestra la expresión de PD-1 en LiTCD8⁺ purificados de sangre periférica de una paciente con cáncer de mama, estimulados con anti-CD3/anti-CD28 y distintas citoquinas recombinantes o mantenidos en cultivo sin estimular (No est.).

TABLA 2

	Medio				aCD3/aCD28				IL-6				IL-27				IL-6/IL-27			
	CD39	PD-1	TIGIT	Tim-3	CD39	PD-1	TIGIT	Tim-3	CD39	PD-1	TIGIT	Tim-3	CD39	PD-1	TIGIT	Tim-3	CD39	PD-1	TIGIT	Tim-3
Paciente 35	6,8	2,72	3,1	5	23,5	18,6	62,1	4,5	24,5	20,3	69,5	8,5	26,4	23,3	39,6	7,8	30,2	32,2	60,7	8
Paciente 34	2,4	0,3	5,3	3,5	0,6	15,9	44,0	0	9,1	16,0	51,9	7,8	11,2	21,5	39,0	0,1	12,5	21	41,1	9,1
Paciente 30	3,75	1,2	5,4	2,3	15,5	33,1	25	13,1	19,1	36,5	27,3	12,2	25,2	49,3	32,3	16,6	35,4	63	25,4	18,1

Frecuencias de células CD39⁺, PD-1⁺, TIGIT⁺ y Tim-3⁺ en LiTCD8⁺ purificados de sangre periférica de tres pacientes con cáncer de mama estimulados *in vitro* con anti-CD3/anti-CD28 y las citoquinas indicadas, o mantenidos en cultivo sin estimular (Medio).

5.2 Rol de la hipoxia como inductora de la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ en el microambiente tumoral.

Durante la progresión tumoral se generan zonas con baja concentración de O₂ debido a la incapacidad de los vasos sanguíneos neoformados de nutrir todo el tejido tumoral, el cual posee una alta tasa de consumo de esta molécula ¹³³. En estos focos hipóxicos el fenotipo de las células tumorales y de los leucocitos infiltrantes es profundamente afectado, activándose vías de señalización particulares, como aquellas que involucran al factor de transcripción HIF-1 α , el cual controla el metabolismo y la funcionalidad de las células en esas condiciones ¹³⁴. Además, se ha reportado que en estos focos se producen grandes cantidades de citoquinas y quimiocinas que llevan al reclutamiento de leucocitos, la mayoría de los cuales poseen fenotipos protumorales ^{134, 135}. En otros estudios previos se demostró además que la hipoxia y el HIF-1 α son capaces de afectar la expresión de las ectoenzimas CD39 y CD73 ^{99, 136, 137}. Para evaluar si la generación de focos hipóxicos podría estar involucrada en la inducción de LiTCD8⁺CD39⁺ se utilizó la sonda Hypoxyprobe-1. Esta sonda tiene la capacidad de reaccionar con proteínas que contienen cisteínas en células que se encuentran en zonas con concentraciones de oxígeno menores a 14 μ M. Al reaccionar, forma aductos que luego pueden ser detectados con anticuerpos específicos. Para realizar el ensayo, la sonda fue administrada en ratones inyectados con la línea tumoral B16F10-OVA (Ver Materiales y Métodos). Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de tejido tumoral de ratones y mediante inmunohistofluorescencia se evaluó la presencia de células CD45⁺ (leucocitos) y CD39⁺ en zonas de hipoxia. Como se puede observar en la Figura 34A (arriba), la gran mayoría de células CD45⁺ coexpresaron CD39, lo cual coincidió con las observaciones realizadas mediante CF (Figura 7). Además, una gran cantidad de leucocitos o células CD39⁺ se encontraban asociadas a focos hipóxicos. Sin embargo, estos resultados no permitieron determinar si los focos hipóxicos inducían CD39 o si reclutaban leucocitos que ya expresaban la ectoenzima, entre otros motivos porque también fue posible observar células CD39⁺ localizadas por fuera de los focos.

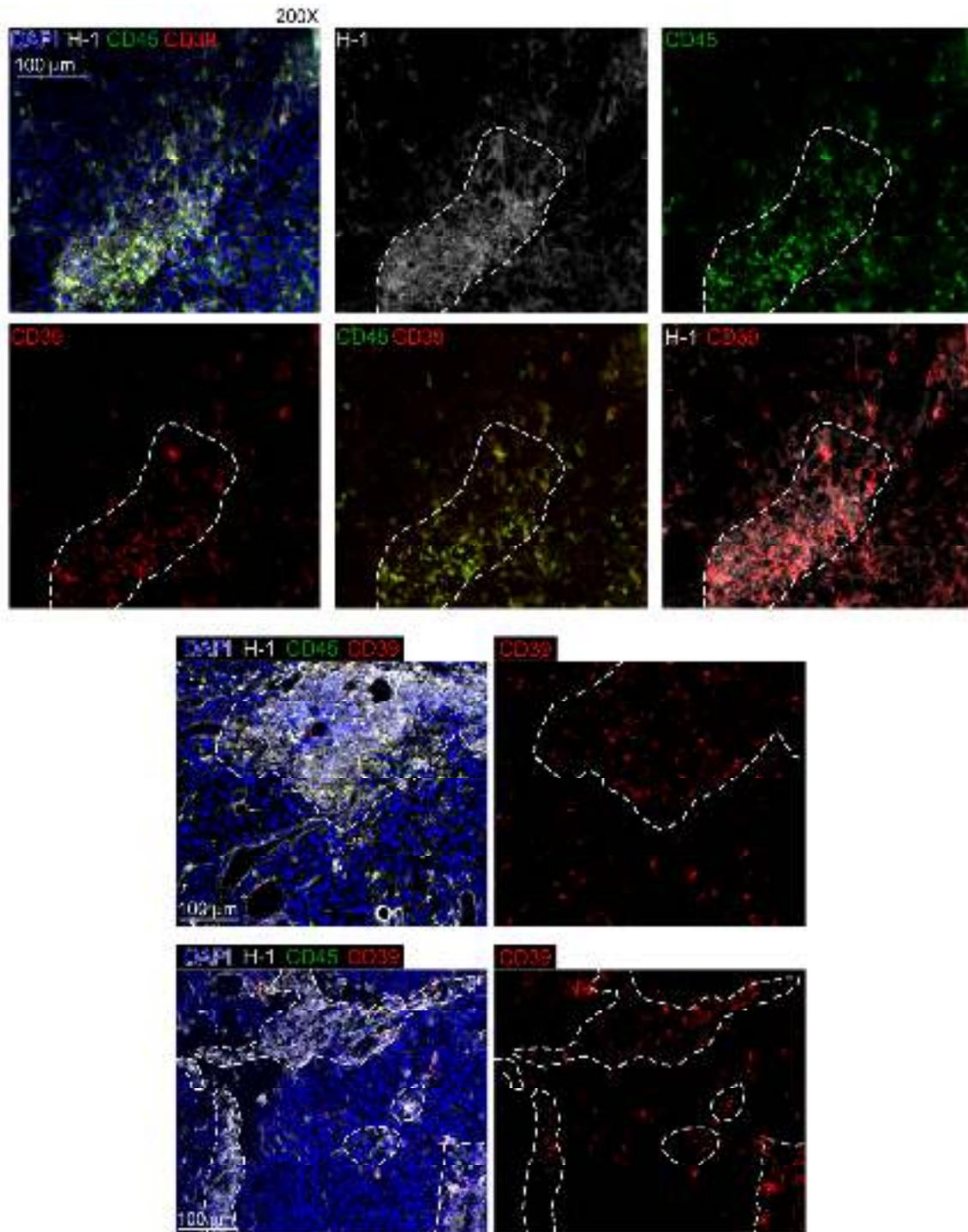


Figura 34: Células CD45⁺CD39⁺ se asocian a zonas de hipoxia. **A,** Cortes histológicos de tumores B16F10-OVA fueron evaluados por microscopía de fluorescencia. Se observan tres regiones del tejido tumoral, en azul los núcleos teñidos con DAPI, en verde las células CD45⁺ infiltrantes, en gris las zonas de hipoxia detectadas con anticuerpos dirigidos a aductos de la sonda Hypoxyprobe-1 (H-1) y en rojo las células CD39⁺ (200X). En el panel superior pueden verse todas las marcas individuales y los “merge”. En los paneles central e inferior solo se muestran los “merge” de todas las marcas y la marca de células CD39⁺ individual. Las líneas punteadas delimitan las zonas de hipoxia en base a la marcación con H-1.

Mediante CF, se pudo determinar que LiTCD8⁺CD39^{high} exhibían *ex vivo* una mayor cantidad de aductos de la sonda comparados con LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int} (Figura 35A), indicando que la alta expresión de CD39 por estas células puede estar relacionada a un mayor tiempo de exposición a hipoxia en el MAT. Esto concuerda con la observación de que los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron mayor fosforilación de AMPK que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, lo cual es un indicador de estrés metabólico (Figura 18). Para evaluar el posible rol de la hipoxia en la inducción de CD39 se estimularon *in vitro* LiTCD8⁺ obtenidos de ganglios y bazos de ratones con tumores B16F10-OVA o libres de tumores con anti-CD3/anti-CD28 en condiciones hipóxicas (Ver Materiales y Métodos). En estas condiciones experimentales no fue posible inducir una mayor expresión de CD39 en LiTCD8⁺, sin embargo, no se descartó la posibilidad de que exposiciones más prolongadas a bajas concentraciones de O₂ podría ser necesaria para inducir la ectoenzima (Figura 35B).

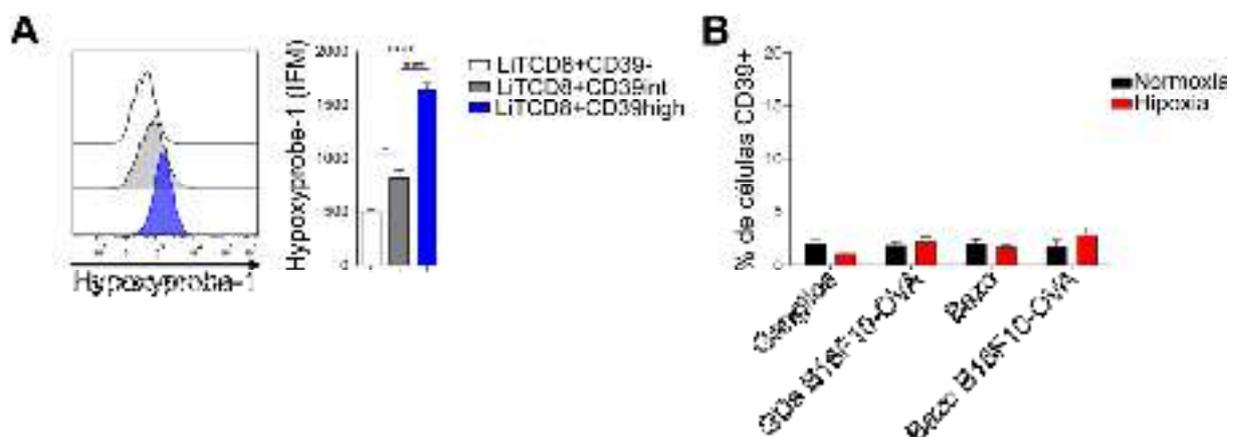


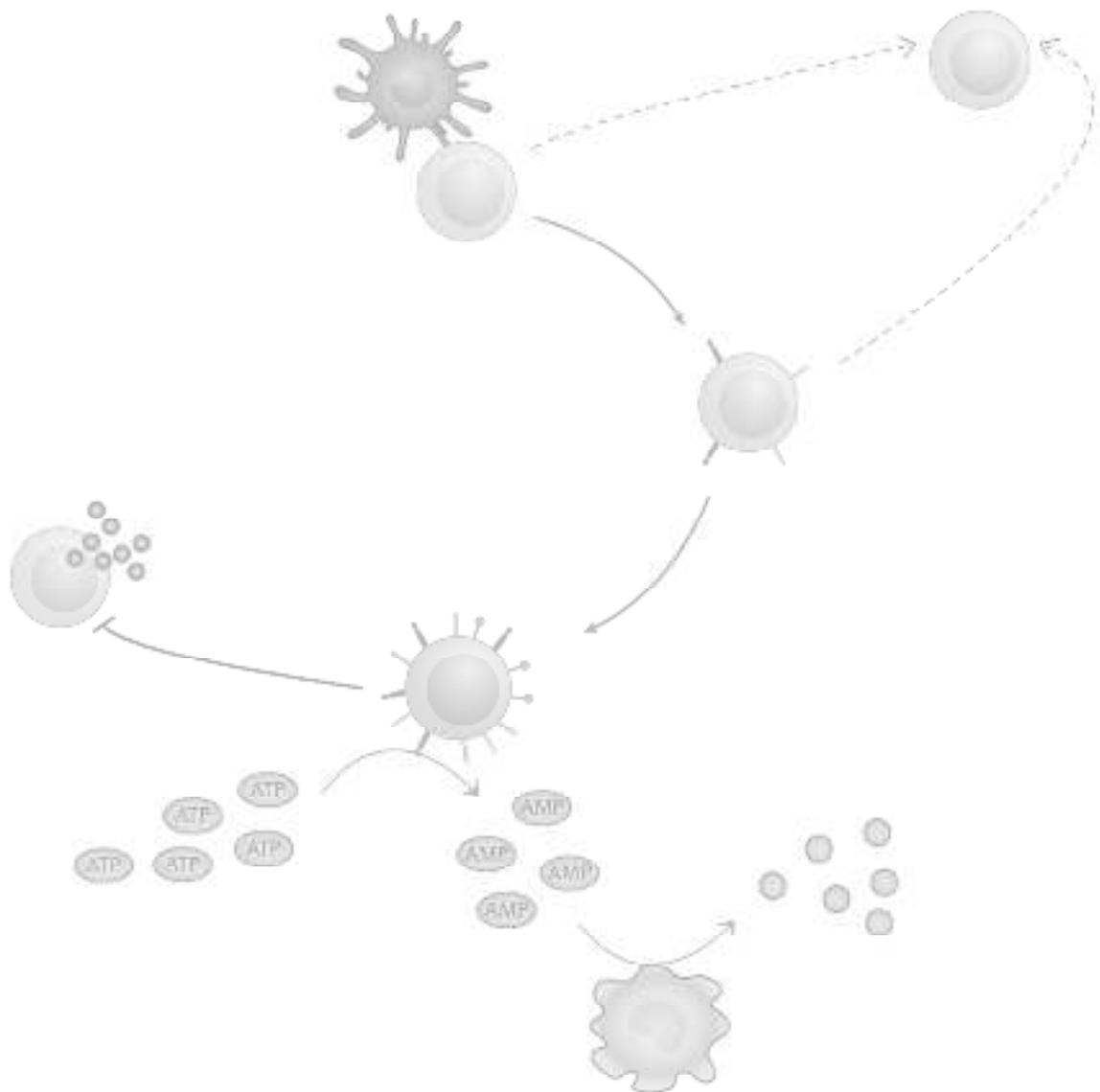
Figura 35: La alta expresión de CD39 en LiTCD8⁺ intratumorales se asocia a hipoxia. **A**, El histograma y el gráfico muestran la intensidad de marcación con aductos de H-1 por CF en LiTCD8⁺ CD39⁻, CD39^{int} y CD39^{high} infiltrantes de tumores B16F10-OVA (n=3). **B**, El gráfico muestra el porcentaje de células CD39⁺ por CF inducidas al estimular con anti-CD3/anti-CD28 a LiTCD8⁺ purificados de órganos linfoides de ratones con tumores B16F10-OVA o libres de tumores durante 72 h, pasando las últimas 24 h en una cámara de hipoxia (n=4). Los datos se presentan como media±EEM; *P≤0,05; ***P≤0,001; ****P≤0,0001.

En conjunto, estos resultados muestran una asociación entre la expresión de CD39 y las zonas de hipoxia, lo cual postula a los ambientes hipóxicos como posibles inductores de la ectoenzima, aunque estudios más profundos podrían ayudar a dilucidar su verdadero rol en la biología del LiTCD8⁺.

En esta quinta parte de resultados se observó que:

- Los LiTCD8⁺CD39^{high} murinos infiltrantes de tumores poseen alto niveles de STAT3 fosforilado en comparación con LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}, indicando que estas células podrían haber recibido señales a través de receptores de citoquinas que activan a este factor de transcripción.
- La estimulación de LiTCD8⁺ murinos con anti-CD3 y anti-CD28 *in vitro* no genera una mayor inducción de CD39. Sin embargo, el agregado de IL-6 e IL-27 a los cultivos de LiTCD8⁺ estimulados favorece la generación de LiTCD8⁺CD39⁺. Esto indicaría que estas citoquinas podrían estar involucradas en la expresión de CD39 en la población de LiTCD8⁺ presentes en focos inflamatorios.
- El agregado de IL-27 a los cultivos de LiTCD8⁺ murinos estimulados también favorece la generación de LiTCD8⁺ que expresan PD-1 y Tim-3, lo cual permite hipotetizar que esta citoquina está involucrada en la inducción de LiTCD8⁺ exhaustos.
- La estimulación de LiTCD8⁺ de sangre periférica de pacientes con anti-CD3 y anti-CD28 *in vitro* es capaz de inducir la expresión de CD39 en LiTCD8⁺, mientras que el agregado de IL-6 e IL-27 a los cultivos favorece una mayor inducción de la ectoenzima. Estas citoquinas también favorecen una mayor expresión de PD-1 en los LiTCD8⁺. Estos resultados resaltan el rol de la estimulación a través del TCR, la coestimulación y las citoquinas en la inducción de CD39 en humanos.
- Estudios preliminares muestran que la hipoxia podría estar involucrada en la inducción de LiTCD8⁺CD39⁺ ya que en cortes histológicos de tumores murinos se observa una acumulación de leucocitos CD39⁺ en focos hipóxicos. A su vez, los LiTCD8⁺CD39^{high} muestran una alta unión a la sonda Hypoxyprobe-1, la cual reacciona con proteínas de células que se encuentran en zonas hipóxicas.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

En los últimos años una gran cantidad de estudios han permitido establecer que las células tumorales y las células del sistema inmune interactúan de múltiples maneras dando como resultado final la generación de un microambiente inmunosupresor que favorece el crecimiento neoplásico¹³⁸. En este contexto, se ha puesto en relevancia el rol crítico llevado a cabo por las ectoenzimas CD39 y CD73 en la generación de dicho microambiente. La expresión de estas moléculas en el MAT se ha atribuido en la mayoría de los casos a células tumorales o a poblaciones celulares inmunoregulatorias, principalmente LiTregs⁹². En contraposición, los LiTCD8⁺ han sido considerados como el principal brazo armado de la respuesta inmune antitumoral, siendo asociados a un buen pronóstico clínico cuando se encuentran infiltrando tumores de pacientes con cáncer²⁸. Sin embargo, varios reportes han demostrado que ciertas subpoblaciones de LiTCD8⁺ poseen fenotipos regulatorios y disfuncionales durante procesos de inflamación crónica^{51, 124}.

En este trabajo de tesis doctoral se exploró y profundizó en el estudio de una subpoblación de LiTCD8⁺ que expresan la ectoenzima inmunoregulatoria CD39 en el contexto del MAT. Mediante el uso de diferentes modelos experimentales murinos de cáncer se demostró que esta subpoblación de LiTCD8⁺ aparece exclusivamente en tumores y no en órganos linfoides secundarios. Más aún, la alta expresión de CD39 en estas células fue asociada a un fenotipo disfuncional concordante con agotamiento. En tumores y GD-Ms de pacientes con cáncer de mama y melanoma también se observaron LiTCD8⁺CD39⁺ que, en coincidencia con lo observado en los modelos experimentales, mostraron un fenotipo exhausto. En otros tejidos periféricos de pacientes con cáncer estas células se encontraron en baja frecuencia, o estuvieron incluso ausentes. Estas observaciones llevaron a concluir que tanto en modelos experimentales murinos como en pacientes con cáncer las señales propias del MAT inducen la expresión de CD39 en LiTCD8⁺. Además, el hecho de que los LiTCD8⁺CD39⁺ estuvieron presentes en todos los modelos experimentales y en pacientes permite inferir que la expresión de la ectoenzima por estas células podría cumplir un rol importante en la progresión tumoral.

El análisis de LiT infiltrantes de tumor en animales inyectados con la línea tumoral B16F10-OVA permitió distinguir dos subpoblaciones de LiTCD8⁺CD39⁺ de acuerdo

al nivel de expresión de la ectoenzima: la población de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{int}}$ y la $\text{CD39}^{\text{high}}$. Además, se detectó que la frecuencia de los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ aumentaba acorde al crecimiento del tumor. A su vez, el porcentaje de células $\text{CD39}^{\text{high}}$ en la población de LiTCD8^+ demostró ser independiente de la carga de células tumorales inyectada inicialmente. Esto podría reflejar que para la inducción de esta subpoblación celular es más importante el tiempo de exposición en el MAT que la cantidad de células tumorales en el foco tumoral inicial. Queda por evaluar si los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ son partícipes en la generación del MAT o si sólo se inducen como consecuencia de las señales que reciben allí. Una hipótesis interesante a comprobar es que los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ podrían generarse como resultado de la estimulación que reciben los LiTCD8^+ en el MAT y que ellos a su vez colaboren amplificando los mecanismos inmunoregulatorios, favoreciendo así la progresión del tumor en un proceso de retroalimentación positiva. Un análisis general en las poblaciones leucocitarias infiltrantes de tumores de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA demostró que otros tipos celulares también expresaban CD39. En algunas poblaciones celulares, como en las células NK, mieloides monocíticas y células dendríticas la expresión de la ectoenzima también estaba asociada a la progresión del tumor. Estos resultados ponen incluso en mayor relevancia a la inducción de CD39 como un mecanismo de evasión de la respuesta inmune en el MAT.

Al estudiar el estado de activación de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ en ratones inyectados con la línea B16F10-OVA se determinó que estos eran principalmente células efectoras, predominando en $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ un fenotipo de SLECs ($\text{KLRG-1}^+\text{CD127}^-$), el cual se ha asociado a células con alto potencial citotóxico y productoras de citoquinas inflamatorias. Al analizar la funcionalidad de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ se observó una alta frecuencia de células $\text{IFN}\gamma^+$, granzima B^+ y CD107a^+ luego de su estimulación *ex vivo*, lo cual en principio podría definirlos como LiTCD8^+ Tc1. Sin embargo, la reducida producción de IL-2 y $\text{TNF}\alpha$ por parte de estas células llevó a la hipótesis de que los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ no eran solo células efectoras recientemente activadas, sino que además podrían haber ingresado en el proceso de agotamiento. Esta hipótesis fue respaldada por el hecho de que estas células mostraron un menor potencial proliferativo frente a la re-estimulación que $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$ y CD39^{int} , observaciones realizadas tanto en la población total de LiTCD8^+ infiltrantes de tumores, como así también en la subpoblación específica para el antígeno OVA expresado por las células tumorales. Acorde a esto, los $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ también

mostraron una menor capacidad de activar la vía de la quinasa mTOR frente al re-estímulo de las células *in vitro*, la cual es crucial para la funcionalidad efectora y para la activación del ciclo celular en estas células ¹²⁵. Además, los LiTCD8⁺CD39^{high} mostraron mayores niveles de la enzima AMPK fosforilada *ex vivo*, lo cual comúnmente se atribuye a una deficiencia energética y a estrés metabólico. P-AMPK es capaz de inhibir la activación de mTOR, de manera de inhabilitar las vías que consumen ATP y promover vías catabólicas que suministren energía a la célula. Es importante destacar que la activación de la vía de AMPK es también crucial para el fenotipo inmunoregulatorio de algunas células como los LiTregs ya que al inhibir a mTOR evita la adquisición de un metabolismo que promueva la diferenciación a células efectoras ¹²⁵. Todos estos hallazgos señalarían a los LiTCD8⁺CD39^{high} como células con insuficiencias bioenergéticas, las cuales perjudicarían la respuesta proliferativa de los mismos.

Por otro lado, se ha establecido que el agotamiento altera la capacidad de los LiTCD8⁺ de adquirir un programa transcripcional de memoria. Esto significa que en caso de erradicar al foco tumoral o a una infección viral, no se generarían LiTCD8⁺ polifuncionales que puedan persistir para proteger al organismo en el futuro ⁶⁷. En este sentido, el estudio del estado de diferenciación de LiTCD8⁺ intratumorales mostró que menos de un 10% de los LiTCD8⁺CD39^{high} eran células de memoria central, y dentro de las células efectoras la mayoría eran SLECs, es decir, células efectoras sin capacidad de generar memoria. Por otro lado, más de un 20% de los LiTCD8⁺CD39⁻ poseían un fenotipo de memoria central, y entre los LiTCD8⁺CD39⁻ de memoria efectora la mayoría eran MPECs. En cuanto a los LiTCD8⁺CD39^{int}, estos poseían frecuencias similares de SLECs y MPECs, lo cual podría significar que estas células poseen la capacidad de ejercer una fuerte respuesta efectora y, en caso de erradicar al antígeno, podrían también generar células de memoria. Estos resultados ponen de manifiesto que los LiTCD8⁺CD39^{int} podrían constituir una población protectora frente a tumores, también teniendo en cuenta que son células con cierta capacidad de producir IFN γ , TNF α , IL-2 y granzima B. Los estudios realizados en la subpoblación de LiTCD8⁺ específicos para OVA respaldan esta teoría, ya que los LiTCD8⁺CD39^{int} específicos mostraron mayor producción de TNF e IL-2 y mayor respuesta proliferativa frente a un re-estímulo *in vitro* que LiTCD8⁺CD39^{high} específicos.

Fue también llamativa en este trabajo la expresión diferencial de la molécula CD8 α en las distintas subpoblaciones de LiTCD8 $^+$. Estas células suelen disminuir la expresión de CD8 α y del TCR cuando son estimuladas. Sin embargo, por mecanismos aún no dilucidados los LiTCD8 $^+$ CD39 high , que según su fenotipo son células activadas, mostraron una mayor expresión superficial de CD8 α que LiTCD8 $^+$ CD39 $^-$ y CD39 int . Una posible explicación para esta observación sería que estas células no responden normalmente a nuevas estimulaciones a través del TCR, aunque otro tipo de experimentos deberían realizarse para confirmar esta hipótesis. Otra posibilidad es que los LiTCD8 $^+$ CD39 high se formen como resultado de una división asimétrica de los LiTCD8 $^+$ durante su expansión. Estudios realizados por Pollizzi y col. demostraron en un modelo de infección que durante la primera ronda de división de un LiTCD8 $^+$ activado se pueden distinguir una célula CD8 high y otra CD8 low . Estas células poseen una funcionalidad diferente debido a que durante la división hay una repartición asimétrica del contenido citoplasmático de las células, lo cual afecta su posterior fenotipo ¹³⁹. Los autores demostraron que los LiTCD8 high se corresponden con células efectoras, con alta capacidad de producir IFN γ y elevada expresión de moléculas citotóxicas. Por otro lado, los LiTCD8 low muestran una menor función efectora inicial, pero luego fueron capaces de persistir en el tiempo generando LiTCD8 $^+$ de memoria, lo cual coincide con el fenotipo de células efectoras precursoras de memoria observado en LiTCD8 $^+$ CD39 $^-$ y CD39 int , que poseen menor expresión de CD8 α que los LiTCD8 $^+$ CD39 high .

El resultado que finalmente permitió definir a los LiTCD8 $^+$ CD39 high como células exhaustas fue la expresión de distintos RIs. De hecho, los LiTCD8 $^+$ CD39 high pudieron ser identificados también en base a la coexpresión de PD-1 y Tim-3, ambos marcadores que fueron utilizados previamente por otros investigadores para la identificación de LiT exhaustos en cáncer ⁸³. A su vez, los LiTCD8 $^+$ PD-1 $^+$ Tim-3 $^-$ intratumorales, que han sido descritos como células efectoras aún no exhaustas ^{67, 83}, mostraron una expresión intermedia de la ectoenzima, lo cual probaría que los LiTCD8 $^+$ CD39 int son células efectoras que aún no han ingresado en el proceso de agotamiento.

Como se mencionó en la Introducción, en modelos de infecciones virales crónicas los LiTCD8 $^+$ terminalmente exhaustos poseen un fenotipo T-bet low Eomes high Blimp-1 high ⁶⁷. Este fenotipo es similar al observado en LiTCD8 $^+$ CD39 high que infiltran tumores murinos con la excepción de T-bet, el cual se mostró altamente expresado

por esta subpoblación. Considerando que el agotamiento es un estado que se adquiere de forma progresiva, los LiTCD8⁺CD39^{high} podrían encontrarse en un paso previo al agotamiento terminal. De hecho, al estimular *in vitro* LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺ (que son CD39^{high}) con anti-CD3/anti-CD28 e IL-2 recombinante, finalmente estas células alcanzaron un estado terminal con menor expresión de T-bet y menor frecuencia de células IFN γ ⁺ que LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁻, además de un marcado arresto en el ciclo celular.

Analizando la población de LiTCD8⁺ infiltrantes de tumor de pacientes con cáncer se observó que los LiTCD8⁺CD39⁺ también exhibían una frecuencia reducida de células productoras de citoquinas inflamatorias, junto con una alta expresión de RIs. Particularmente, dentro de la población de LiTCD8⁺ CD39⁺ se encontró una menor frecuencia de células productoras de IFN γ comparada con la población de LiTCD8⁺CD39⁻, lo cual difiere con lo observado en los modelos murinos. Si bien no se profundizó en los mecanismos que puedan explicar estas diferencias en la capacidad de producir esta citoquina, se puede especular que podrían estar involucrados un prolongado tiempo de exposición de dichas células al MAT y/o la existencia de señales inhibitorias que al ser gatilladas en los LiT alteren la capacidad de la célula para producir citoquinas. En conjunto, estos resultados permitieron concluir que LiTCD8⁺CD39⁺ de pacientes con cáncer comprenden una población celular que tiene una capacidad funcional comprometida respecto a la observada en LiTCD8⁺CD39⁻. En un futuro sería interesante evaluar la especificidad para antígenos tumorales tanto en la población de LiTCD8⁺CD39⁻ como en la CD39⁺ en pacientes con cáncer, y comparar la funcionalidad en esas poblaciones específicas. Estos estudios podrían cobrar relevancia ya que CD39 podría utilizarse como un marcador de la funcionalidad de los LiTCD8⁺ que reaccionan contra el tumor.

En cuanto al potencial citotóxico de los LiTCD8⁺, en muestras de pacientes una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ movilizaron CD107a a su superficie luego de la estimulación comparado con LiTCD8⁺CD39⁻. Esto coincide con lo observado en el modelo experimental de animales inyectados con la línea tumoral B16F10-OVA donde LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumor exhibían una alta frecuencia de células CD107a⁺ y granzima B⁺. Este elevado potencial citotóxico en LiTCD8⁺CD39⁺ podría ser importante para contener la diseminación de células tumorales. Sin embargo, la elevada expresión de granzima B y la movilización de CD107a no indican de por sí

que estas células pueden efectivamente destruir células tumorales, lo cual debería evaluarse mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro*.

Mientras que CD39 fue expresado por LiTCD8⁺ en todos los modelos experimentales estudiados y en pacientes, la ectoenzima CD73 solo fue coexpresada por LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores 4T1 y MCA-OVA en ratones. Estas variaciones en la expresión de CD73 podrían ser explicadas por el perfil genético de las distintas cepas de ratones utilizadas y/o por el origen histológico de los tumores. Por otro lado, se ha demostrado que la expresión y función de CD73 incrementan bajo condiciones hipóxicas e inflamatorias, y mediante la estimulación con TGFβ⁹⁷,¹³⁷. En contraste, citoquinas tales como IL-4, IL-12, IL-21 e IFNγ previenen la expresión de esta enzima⁹⁷. Es posible entonces que cada modelo experimental posea un MAT particular, con un balance único de citoquinas y otros factores que afecte diferencialmente la expresión de CD73 en LiTCD8⁺. Un punto interesante a abordar a futuro es si la inoculación de una misma línea tumoral en distintos sitios anatómicos tendría efecto en la expresión de las ectoenzimas, lo cual podría ayudar a esclarecer el rol de otras células del estroma, como los fibroblastos, en la generación de distintos MATs. Las observaciones realizadas en ratones inyectados con la línea B16F10-OVA y en pacientes con cáncer, donde los LiTCD8⁺CD39⁺ no coexpresaban CD73, coinciden con estudios previos en pacientes con linfoma folicular y pacientes VIH⁺ donde también se reportaron LiTCD8⁺CD39⁺CD73⁻^{112, 140}. De hecho, en pacientes con VIH se observó que la disminución en la expresión de CD73 en LiTCD8⁺ se correlacionaba con agotamiento¹⁴⁰, lo cual concuerda con el fenotipo exhausto de LiTCD8⁺CD39⁺CD73⁻ que nosotros reportamos analizando muestras de pacientes con cáncer de mama.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral varios artículos fueron publicados por otros grupos de investigación en donde se describió la presencia de LiTCD8⁺CD39⁺ en diferentes contextos. En este sentido, Gupta y colaboradores demostraron que en sangre periférica de pacientes con infecciones virales crónicas como VIH y VHC se encontraban LiTCD8⁺ específicos para antígenos virales que expresaban CD39. Sin embargo, los LiTCD8⁺ específicos para antígenos de virus que causan infecciones agudas no expresaban dicha molécula. Un análisis más profundo de los LiTCD8⁺CD39⁺ en este contexto demostró que también expresaban PD-1 y que poseían un programa transcripcional acorde al de LiTCD8⁺ exhaustos. En este mismo trabajo, los autores observaron que en ratones infectados con una variante

del VCML, que genera una infección crónica, se generaban LiTCD8⁺PD-1⁺LAG-3⁺2B4⁺T-bet^{low}Eomes^{high} exhaustos, y que estos poseían una alta expresión de CD39, por lo cual propusieron a esta ectoenzima como un marcador de LiT terminalmente exhaustos ¹⁴¹. Este trabajo concuerda con lo observado y propuesto durante esta tesis doctoral, la cual expande estos descubrimientos y apoya la asociación entre la expresión de CD39 y el agotamiento de LiT como un fenómeno general en condiciones inflamatorias crónicas. Recientemente otros grupos demostraron que la presencia de LiTCD8⁺CD39⁺ se correlacionaba con una mortalidad temprana en pacientes coinfectados con VIH y *M. tuberculosis*, y con una mayor viremia y menor número de LiTCD4⁺ en pacientes VIH⁺ tratados con antiretrovirales ^{142, 143}. En otro trabajo reciente el grupo de Simon Robson reportó que en muestras de sangre y lamina propia de pacientes con enfermedad de Crohn se encontraba una mayor frecuencia de LiTCD8⁺CD39⁺ productores de IFN γ que en donantes sanos ¹⁴⁴. En este trabajo los LiTCD8⁺CD39⁺ fueron asociados a un rol perjudicial, debido a la producción exacerbada de IFN γ en el contexto de esta enfermedad inflamatoria crónica. En conjunto, estos trabajos evidencian el rol patogénico de esta subpoblación celular y ponen en relevancia la continuidad de su estudio como marcador para pronóstico clínico y como posible diana terapéutica.

Como se describió en la introducción, el ATPe es necesario para la apropiada activación de los LiT, mientras que la adenosina es capaz de suprimir respuestas inmunes a través de varios mecanismos ⁸⁹. Dado que la acción conjunta de CD39 y CD73 degrada ATP a adenosina, estas moléculas pueden ser consideradas como interruptores inmunológicos que cambian la actividad inflamatoria promovida por ATPe a un estado antiinflamatorio mediado por adenosina. En este sentido, en esta tesis se demostró que los LiTCD8⁺CD39^{high} se encuentran más representados en el MAT que los LiTregs CD39^{high}. Además, estos LiTCD8⁺ exhaustos demostraron una alta capacidad para hidrolizar ATPe en los ensayos *in vitro*. Estos resultados destacan el potencial que poseen los LiTCD8⁺ exhaustos que expresan CD39, para contribuir con el MAT inmunosupresor al modular el balance de ATP/adenosina en el mismo. Aunque estas células no coexpresan CD73 se ha demostrado que células CD39⁺ pueden producir adenosina actuando en colaboración con otras células CD73⁺ presentes en el mismo microambiente, como es el caso de los LiTr1 ⁶⁰. En este sentido, muchas poblaciones celulares del MAT de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA expresan CD73, entre ellas la mayoría de los LiTCD8⁺CD39⁻. La

hipótesis de que LiTCD8⁺CD39⁺ podrían modular la respuesta inmune frente a tumores está avalada por numerosos trabajos que demuestran el rol modulador de dicha población en diferentes modelos experimentales. En este sentido se puede mencionar el trabajo de Parodi y colaboradores, que demuestra que LiTCD8⁺CD39⁺ obtenidos de biopsias de pacientes con cáncer modulaban la proliferación de células mononucleares de sangre periférica en ensayos de cocultivo ⁵⁵. Además, Bai y colaboradores observaron que LiTCD8⁺CD39⁺ inducidos *in vitro* podían modular la producción de IFN γ en LiTCD8⁺ respondedores gracias a la generación de adenosina ¹⁴⁴. Más recientemente, Noble y colaboradores describieron que antígenos administrados a ratones en dosis tolerogénicas, es decir, de forma gradual y en ausencia de adyuvantes, generaban una población de LiTCD8⁺CD39⁺ capaces de modular la respuesta frente a los antígenos ¹⁴⁵. En este modelo experimental, los autores propusieron a la expresión de la ectoenzima en los LiTCD8⁺ como clave en modulación de la respuesta inmune frente a estos antígenos exógenos, indicando que efectivamente estas células podrían tener un efecto relevante en el control de la inmunidad. Finalmente, otro grupo reportó la presencia de una pequeña subpoblación de LiTCD8⁺Foxp3⁺CD39⁺ en donantes sanos, localizada preferentemente en órganos linfoides secundarios, que tendría la capacidad de regular la respuesta de LiTCD4⁺conv ¹⁴⁶. En esta tesis se determinó que LiTCD8⁺PD-1⁺Tim-3⁺(CD39^{high}) purificados de tumores de ratones también poseen una capacidad moduladora sobre la producción de IFN γ por parte de LiTCD8⁺ respondedores, aunque no sobre su proliferación. Sin embargo, el bloqueo de CD39 con el inhibidor ARL67156 no logró restablecer una alta frecuencia de células respondedoras productoras de esta citoquina en los cocultivos. Esto indica que, al menos en las condiciones experimentales ensayadas, la capacidad de modular la producción de IFN γ por los LiTCD8⁺ exhaustos no está mediada por esta ectoenzima. Evidentemente, esta población celular posee otros mecanismos moduladores que aún no han sido dilucidados. En contraste, los LiTCD8⁺PD-1⁻Tim-3⁻(CD39⁻) mostraron poseer un efecto proinflamatorio sobre LiTCD8⁺ respondedores, induciendo un mayor porcentaje de células IFN γ ⁺, al comparar con LiTCD8⁺ respondedores cultivados solos. Este resultado podría indicar que la presencia de LiTCD8⁺CD39⁻ en el MAT podría ser beneficiosa al promover una mayor producción de esta citoquina antitumoral. Al revisar todos estos hallazgos es tentador especular que el MAT induce la pérdida de funciones efectoras en LiTCD8⁺, mientras que

simultáneamente dispara la expresión de moléculas inmunoregulatorias en los mismos. Estos dos procesos podrían complementarse el uno al otro para transformar la inmunidad mediada por LiTCD8⁺ de antitumoral a otra protumoral. Sin embargo, sería también interesante examinar si en otros contextos patológicos los LiTCD8⁺CD39⁺ podrían cumplir un rol beneficioso, modulando respuestas inflamatorias exacerbadas. En este sentido, el trabajo de Noble y colaboradores demuestra que los LiTCD8⁺CD39⁺ podrían actuar como células tolerogénicas frente a antígenos contra los cuales una respuesta inflamatoria podría ser perjudicial para el hospedador ¹⁴⁵. Este estudio abre un campo en el cual se podría explorar el posible efecto antiinflamatorio de los LiTCD8⁺CD39⁺ en patologías autoinmunes y alergias.

Entre los posibles mecanismos que podrían estar involucrados en la inducción de CD39 en LiTCD8⁺ se encuentran las señales clásicas de activación de LiT, diversas citoquinas pro- y antiinflamatorias y la hipoxia. La IL-6, la IL-27 y el TGFβ han sido asociados a la expresión de CD39 en algunos tipos celulares (LiTCD4⁺ y células dendríticas principalmente), como también a la inducción de RIs y FTs relacionados al agotamiento en LiTCD8⁺ ^{61, 62, 68}. En un estudio realizado por Zhu y colaboradores, se observó particularmente que la IL-27 era capaz de inducir la expresión de Tim-3 en LiTCD8⁺ y que ratones deficientes en su receptor generaban una menor frecuencia de LiTCD8⁺ exhaustos que ratones WT luego de la inducción de tumores experimentales ⁶². Esta misma citoquina mostró también ser capaz de inducir CD39 en células dendríticas y en LiTCD4⁺ durante su diferenciación a Tr1 ^{60, 61}. Por otro lado, IL-6 y TGFβ han sido asociados a la inducción de factores de transcripción que participan en el proceso de agotamiento en LiTCD8⁺, y también a la inducción de CD39 en LiTCD4⁺ durante su polarización a LiTCD4⁺conv Th17 ^{68, 96}. Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que IL-6 e IL27, pero no TGFβ, inducen la expresión de CD39 en LiTCD8⁺ murinos estimulados con anti-CD3/anti-CD28, lo cual fue más evidente al combinar ambas citoquinas simultáneamente. Además, en aquellas condiciones donde solo se estimuló con IL-27 se observó además un incremento en la frecuencia de LiTCD8⁺PD-1⁺ y Tim-3⁺. Esto no ocurrió al utilizar IL-27 junto con IL-6, lo cual podría significar que la activación de otras vías de señalización por IL-6 reprime la inducción de RIs. Es importante destacar que, aunque fue posible inducir un mayor porcentaje de LiTCD8⁺CD39⁺ con estos estímulos, estos LiTCD8⁺ no mostraron un fenotipo CD39^{high}. Estas discrepancias

relacionadas con el grado de expresión de CD39 probablemente se deban a que en el MAT los estímulos que inducen la expresión de la ectoenzima sean más complejos, ya que se trata de un ambiente hipóxico, con escasos nutrientes y enriquecido en moléculas regulatorias, que pueden actuar en conjunto y durante periodos de tiempo más prolongados. Por otro lado, es interesante comentar que al estimular LiTCD8⁺ simultáneamente con IL-6, IL-27 y TGFβ, se indujeron LiTCD8⁺CD39⁺ que expresaban CD73. La inducción de CD73 podría atribuirse a TGFβ, ya que también se indujo la expresión de la enzima cuando el TGFβ fue agregado a los cultivos en ausencia de otras citoquinas. Este resultado podría indicar que el TGFβ es el responsable de la inducción de LiTCD8⁺CD39⁺CD73⁺ en los tumores generados en ratones con las líneas tumorales 4T1 y MCA-OVA, aunque otros estudios deberían realizarse para confirmarlo.

El análisis *ex vivo* de LiTCD8⁺CD39^{high} infiltrantes de tumores mostró que estos expresaban mayores niveles de P-STAT3 que LiTCD8⁺CD39⁻ y CD39^{int}. Este factor de transcripción es fosforilado como consecuencia de diversos estímulos, entre los cuales se encuentran IL-6 e IL-27, lo cual indica que estas citoquinas podrían ser, en parte, las responsables de la expresión de CD39 por LiTCD8⁺ en el MAT. La fosforilación de este factor de transcripción se ha asociado, además, a fenotipos disfuncionales y regulatorios en LiT ya que puede promover la expresión de varias moléculas inmunoregulatorias, a la vez que suprime la expresión de genes involucrados en la respuesta inmune antitumoral^{100, 147}. Estos resultados plantean la posibilidad de intentar el bloqueo de estas citoquinas o la inhibición farmacológica de STAT3 para evitar la inducción de CD39 y de esta manera revigorar la función efectora de los LiTCD8⁺.

En el caso de los LiTCD8⁺ humanos la sola estimulación con anti-CD3/anti-CD28 fue suficiente para inducir la expresión de CD39, como también han observado recientemente Bai y colaboradores al estimular LiTCD8⁺ de donantes sanos¹⁴⁴. Aun así, al agregar IL-6 e IL-27 a los cultivos de LiTCD8⁺ estimulados de pacientes con cáncer, el porcentaje de LiTCD8⁺CD39⁺ fue mayor, como así también la expresión de PD-1. Este efecto fue más pronunciado al combinar ambas citoquinas, lo cual coincide con lo observado en ratones y apoya la importancia de las mismas en la generación de LiTCD8⁺CD39⁺.

Trabajos previos en los cuales se determinó que la hipoxia regula la expresión de ectonucleotidasas sugieren que los focos hipóxicos del MAT podrían estar también

involucrados en la generación de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^+$ ^{98, 99}. En los cortes histológicos de tumores de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA se pudo apreciar que leucocitos $\text{CD45}^+\text{CD39}^+$ se encontraban acumulados en estos focos. Sin embargo, este tipo de estudio no permite diferenciar si la expresión de CD39 se induce en esos focos o si la hipoxia promueve el reclutamiento de leucocitos que ya expresaban la ectoenzima previamente. La estimulación de LiTCD8^+ murinos *in vitro* en condiciones hipóxicas durante 24 h no fue suficiente para inducir CD39. Sin embargo, es de suponer que en el MAT la exposición a zonas hipóxicas es mucho más intensa y prolongada. De hecho, al analizar mediante CF a LiTCD8^+ infiltrantes de tumores murinos se pudo observar una mayor unión de la sonda Hypoxyprobe-1 a $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$ que a $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^-$ y CD39^{int} , indicando que efectivamente existe una conexión entre la alta expresión de CD39 y la hipoxia. Sin embargo, estudios más profundos serán necesarios para establecer definitivamente cuál es la relación entre ambos.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, resumidos en la Figura 1 de esta discusión, en conjunto con estudios realizados por otros grupos en los últimos años ponen en relevancia el estudio de CD39 como una posible diana a intervenir para modular la función de LiTCD8^+ en el MAT. En este sentido, una aproximación terapéutica muy utilizada actualmente frente al cáncer consiste en la potenciación de la respuesta inmune frente a los tumores. En este campo existe una variedad de estrategias en desarrollo y en uso clínico que incluyen la vacunación con antígenos tumorales, la inmunomodulación a través de citoquinas recombinantes, la generación LiTCD8^+ con receptores de antígeno quiméricos (CAR) y el bloqueo de “*checkpoints*” inmunes. Los “*checkpoints*” inmunes son moléculas expresadas por LiT y células NK que modulan sus propias funciones efectoras. La mayoría de los “*checkpoints*” inmunes son RIs, y entre ellos se ha prestado principal atención a PD-1 y CTLA-4. En los últimos años se han desarrollado anticuerpos monoclonales capaces de bloquear a estos receptores o a sus ligandos. Estos fármacos ya han superado las etapas de ensayos clínicos y en la actualidad están siendo utilizados para el tratamiento de diversos tipos de cáncer como melanoma, cáncer de vejiga y pulmón. El bloqueo de la interacción PD-L1/PD-1 con los anticuerpos nivolumab y pembrolizumab mostró una respuesta objetiva al tratamiento en un 40% de los pacientes con melanoma avanzado que fueron tratados ¹⁴⁸. En este contexto se ha propuesto el uso de terapias combinadas que puedan potenciar al sistema inmune

de distintas maneras a la vez. Tal es así que la combinación de anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 y PD-1 ha logrado una respuesta sin precedentes en pacientes con melanoma avanzado en un ensayo global de fase III, obteniendo una mayor supervivencia libre de progresión tumoral y una mayor respuesta al tratamiento que en pacientes tratados solo con uno de los anticuerpos bloqueantes ^{148, 149}. Debido a estos resultados y a la continua identificación de nuevos “*checkpoints*” inmunes es que existe una gran expectativa en el diseño de inmunoterapias combinadas que afecten cada vez a más moléculas inmunoregulatorias a la vez. Sin embargo, este tipo de terapias no es efectiva en todos los tipos de cáncer. En leucemias agudas, meduloblastomas y glioblastomas los mecanismos de evasión de la respuesta inmune se relacionan a la ausencia de AET y al bajo reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune. En estos tumores no se genera un infiltrado significativo de LiTCD8^+ en los tumores y por lo que para estos casos se recomiendan otros tipos de terapias como los LiT CAR ¹⁴⁸. En cambio, en melanomas, en cáncer de vejiga, de pulmón, de esófago y en cáncer colorectal el índice de mutaciones somáticas en las células tumorales es muy alto, lo cual se traduce en una mayor generación de neoantígenos. Esto genera un elevado infiltrado de LiTCD8^+ específicos para AET. Estos tumores inmunogénicos suelen adoptar como estrategia de evasión de la respuesta inmune la generación de un MAT inmunosupresor donde los LiTCD8^+ se agotan y pierden sus funciones efectoras. Es en estos tipos de cáncer donde el bloqueo de los “*checkpoints*” inmunes puede ser efectivo para revigorizar la funcionalidad de los LiTCD8^+ ^{148, 150, 151}. De hecho, se ha reportado que un elevado infiltrado de LiTCD8^+ pre-exhaustos es un marcador favorable en pacientes con melanoma frente al tratamiento con anticuerpos bloqueantes de RIs ¹⁵². Todos estos estudios destacan la importancia del estudio del infiltrado leucocitario en tumores de pacientes y la búsqueda de marcadores que permitan identificar a LiTCD8^+ específicos y exhaustos. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral en los modelos experimentales de cáncer con las líneas B16F10 y B16F10-OVA demostraron que tumores más inmunogénicos favorecen una mayor generación de $\text{LiTCD8}^+\text{CD39}^{\text{high}}$. Sería interesante entonces evaluar la posibilidad de utilizar a CD39 como un marcador de la respuesta inmune frente a tumores inmunogénicos en pacientes y como posible marcador para pronóstico frente a distintos tratamientos. Además, CD39 y CD73 también han sido considerados como posibles candidatos a ser

bloqueados para contribuir en la potenciación de la respuesta inmune, principalmente apuntando a la neutralización de la actividad supresora de LiTregs^{94, 110}. Sin embargo, el bloqueo de CD39 podría tener efectos más profundos en el MAT, afectando además la funcionalidad de LiTCD8⁺ y otras poblaciones celulares. Se abre entonces la interesante alternativa de investigar el posible efecto sinérgico de terapias combinadas, donde se bloquee esta ectoenzima conjuntamente con RIs para revigorizar las funciones efectoras de LiTCD8⁺.

En general, los resultados obtenidos en esta tesis se contraponen al concepto de LiTCD8⁺ como células con un rol exclusivamente antitumoral, demostrando que los mismos son también capaces de expresar moléculas inmunoregulatorias. Esto pone en evidencia la importancia del estudio de subpoblaciones de estas células y la contribución de cada una de ellas a la progresión tumoral. Además, resalta posibles funciones previamente ignoradas de los LiTCD8⁺ exhaustos que, lejos de ser células inertes, podrían tener un efecto relevante en el desarrollo del cáncer.

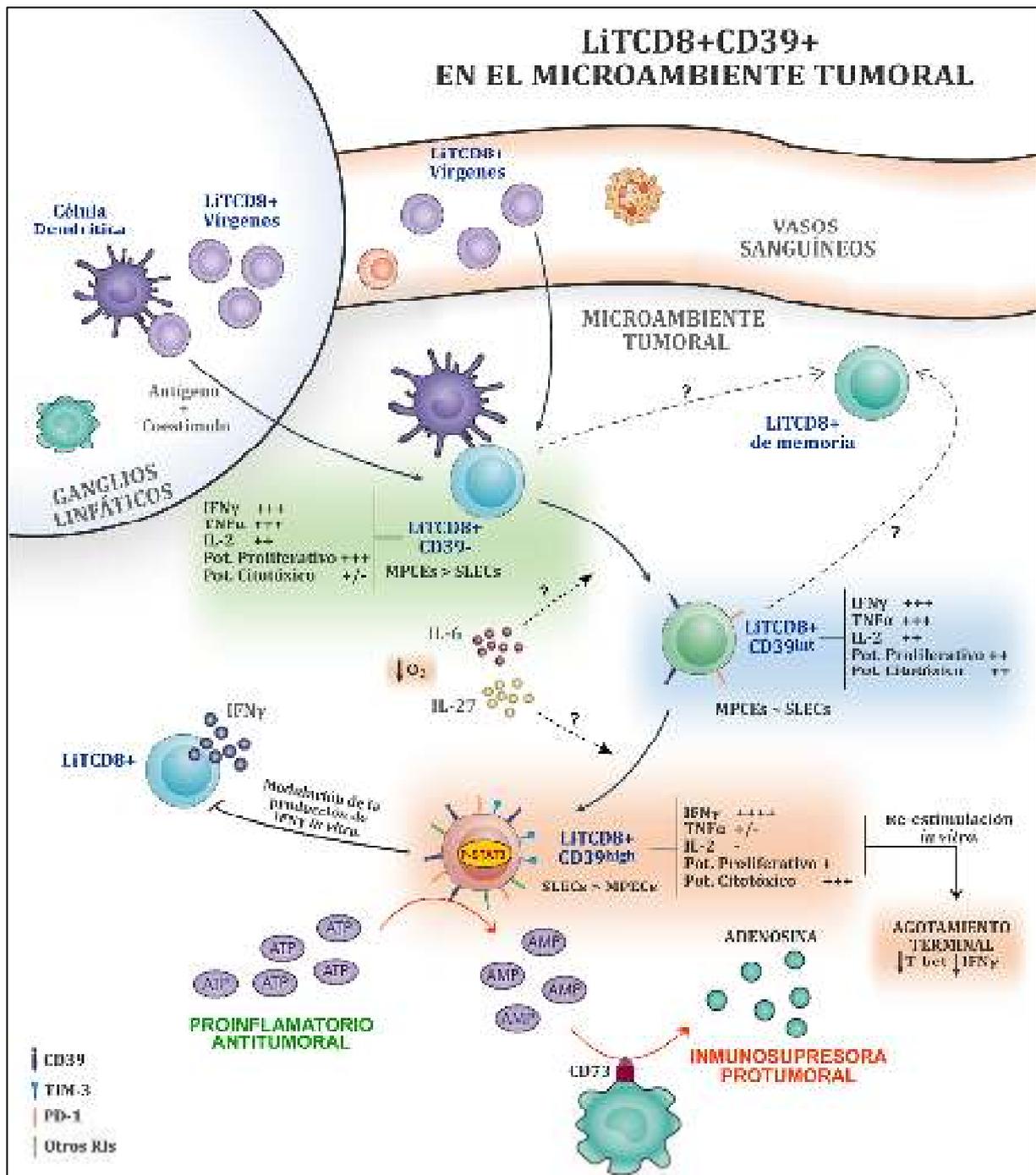
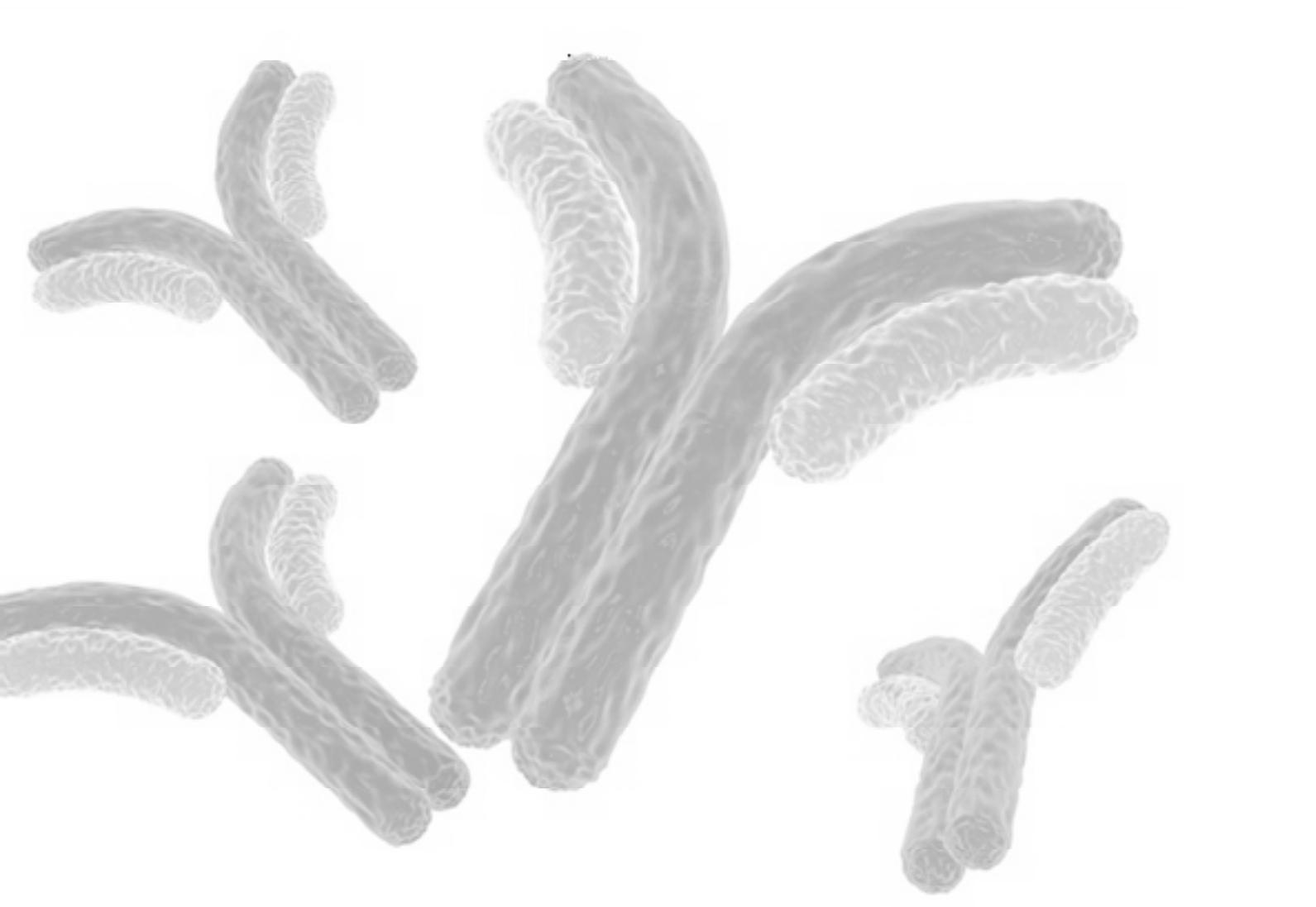


Figura 1: Generación y función de LiTCD8+CD39+ en el microambiente tumoral: Durante el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral los LiTCD8+ son activados por células dendríticas que capturan y procesan AET. Este proceso ocurre en GDs o podría también desarrollarse en el MAT a partir de células dendríticas residentes de tejido y LiTCD8+ vírgenes reclutados desde el torrente sanguíneo. En modelos experimentales murinos los LiTCD8+ activados no expresarían en principio la ectoenzima CD39. Esta población CD39- posee una alta capacidad proliferativa y puede producir IFN γ , TNF α e IL-2. Su estado de diferenciación predominantemente es el de MPECs y de células de memoria central, por lo cual podrían componer un pool de células encargadas de la generación de LiTCD8+ de memoria. Debido a distintas señales que reciben en el MAT, entre las cuales podrían estar involucradas una estimulación antigénica repetitiva, citoquinas como IL-6 e IL-27 e hipoxia, los LiTCD8+ expresarían CD39, junto con el receptor inhibitorio PD-1. Esta población, que se denominó LiTCD8+CD39int, se compone principalmente de células de memoria efectora, entre las cuales se encuentran proporciones similares de células SLECs, MPECs y EEs. Los LiTCD8+CD39int podrían ser importantes para eliminar células tumorales ya que mantienen una

alta funcionalidad y poseen cierto potencial citotóxico. Finalmente, un prolongado tiempo de exposición en el MAT induciría una mayor expresión de CD39 en LiTCD8⁺, junto con la expresión de múltiples receptores inhibitorios, entre los cuales se encuentra Tim-3. Estos LiTCD8⁺CD39^{high} poseen características de células agotadas, con una menor capacidad de producir TNF α e IL-2 y menor potencial proliferativo frente a re-estímulos, aunque mantendrían un alto potencial citotóxico. Esta población celular posee una alta capacidad de hidrolizar ATP extracelular, lo cual colaboraría con la generación de adenosina inmunosupresora en el MAT, y con la progresión tumoral. En pacientes con cáncer se definieron solo dos subpoblaciones, los LiTCD8⁺CD39⁻ y los CD39⁺, mostrando estos últimos un fenotipo similar al de LiTCD8⁺CD39^{high} de ratones, con menor producción de TNF α , IL-2 y también IFN γ , y con mayor expresión de RIs que LiTCD8⁺CD39⁻.

MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales y métodos

Ratones.

En los experimentos fueron utilizados ratones de las cepas C57BL/6 WT, CD73KO (CD73KO-B6.129S1-Nt5et^{m1Lft}/J), C57BL/6 CD45.1 (B6.SJL-*Ptprca Pepcb*/Boy) y BALB/c WT (de 6 a 10 semanas de edad), los cuales fueron mantenidos en el bioterio del CIBICI-CONICET. Todos los protocolos de experimentación utilizados en los animales fueron aprobados por el Comité Institucional de Uso y Cuidado de Animales (CICUA) del CIBICI-CONICET. Los ratones CD73KO y CD45.1 fueron comprados a Jackson Laboratory (E.E.U.U.).

Muestras de pacientes.

Las muestras de tumores y/o GDs fueron recolectadas de 35 pacientes con carcinoma mamario invasor (ductales y lobulillares) en estadios II/III y 4 pacientes con melanoma (ver tabla “Muestras de pacientes”) que fueron sometidos a cirugía para extirpación de tumores primarios y cadenas ganglionares en el Instituto Curie (París, Francia) y en el servicio ginecológico del Hospital Rawson (Polo Hospitalario de Córdoba, Argentina). Todos los protocolos de investigación con muestras de pacientes fueron aprobados por los respectivos comités éticos institucionales de cada hospital, acorde a los estatutos de la Declaración de Helsinki. Todos los pacientes firmaron un consentimiento informado para el uso de las muestras. Los GDs fueron clasificados en metastásicos y no metastásicos en base a la presencia de células tumorales, determinada por estudios histológicos en el Hospital del Instituto Curie y confirmada posteriormente por marcación con anticuerpos contra EpCAM y análisis por CF. Las muestras de sangre periférica de pacientes del Hospital Rawson fueron recolectadas previo a la cirugía en tubos con heparina.

Para el análisis de poblaciones celulares por CF los tumores y los GDs fueron disgregados de forma mecánica utilizando telas metálicas esterilizadas e incubando 30 min a 37°C con agitación en 5 mL de un cóctel enzimático conteniendo 2 mg/mL de colagenasa IV y 50 U/mL de DNAsa I (Roche). Las CMSP fueron obtenidas a

partir de la centrifugación de sangre periférica en gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare).

Tabla 1: "Muestras de pacientes"

Pacientes con cáncer de mama					Diagnóstico (Tipo de cáncer)	Receptores		
Paciente	Muestras disponibles					E	P	II
	Tumor	GD-M	GD-NM	Sangre				
1	X				CID	+	+	-
2	X				CID	+	+	-
3	X				CID	+	+	-
4	X				CIL	+	-	-
5	X				CID	-	-	-
6	X				ND	ND	ND	ND
7	X			X	ND	ND	ND	ND
8	X			X	ND	ND	ND	ND
9	X				ND	ND	ND	ND
10		X	X		CID	+	+	-
11		X	X		CID	+	+	-
12		X	X		CID	+	+	-
13		X	X		CID	+	+	-
14		X	X		CID	+	+	-
15		X	X		CID	+	+	-
16		X	X		CID	+	+	-
17		X			CID	-	-	+
18		X	X		CIL	+	+	-
19		X	X		CID	+	+	-
20		X			CID	+	+	-
21		X	X		CID	+	+	-
22		X	X		cm/crt.	+	+	-
23		X	X		ND	ND	ND	ND
24		X			ND	ND	ND	ND
25		X			ND	ND	ND	ND
26				X	ND	ND	ND	ND
27				X	ND	ND	ND	ND
28				X	ND	ND	ND	ND
29				X	ND	ND	ND	ND
30				X	ND	ND	ND	ND
31				X	ND	ND	ND	ND
32				X	ND	ND	ND	ND
33				X	CDIS	ND	ND	ND
34				X	ND	ND	ND	ND
35				X	CIL	ND	ND	ND

ND: No Disponible, CID: Carcinoma Invasor Ductal, CIL: Carcinoma Invasor Lobulillar, CDIS: Carcinoma Ductal in Situ, E: Receptor de Estrógenos, P: Receptor de Progesterona, II: Her2/neu.

Pacientes con melanoma				
Número de paciente	Muestras disponibles			
	Tumor	GD-M	GD-NM	Sangre
1		X	X	
2		X	X	
3		X	X	
4		X		

Líneas celulares.

La línea celular de melanoma B16F10-OVA fue provista por el Dr. K. Rock (University of Massachusetts Medical School, Boston, E.E.U.U.) mientras que la línea MCA-OVA (línea de fibrosarcoma MCA101 transfectada con un plásmido que codifica OVA) fue donada por la Dra. Clothilde Théry (Institut Curie, PSL Research University, INSERM U932, París, Francia). Las líneas 4T1 (carcinoma mamario), B16F10 y CT26 (carcinoma de colon) fueron compradas en la American Type Culture Collection (ATCC). Todas las líneas celulares fueron preservadas en termos de nitrógeno líquido. Al momento de utilizarlas las líneas B16F10 y B16F10-OVA fueron mantenidas en cultivo utilizando medio DMEM (GIBCO), mientras que las líneas 4T1, CT26 y MCA-OVA se mantuvieron con RPMI-1640, realizando repiques periódicos cuando alcanzaban un 80-90% de confluencia en botellas de cultivo. Los medios fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino (GIBCO, Natocor), 1 mM de L-glutamina (GIBCO), 25 mM de HEPES (Cell Gro) y 40 µg/mL de sulfato de gentamicina (Richtel). Los antibióticos de selección Higromicina y Geneticina fueron agregados a los medios de cultivo de las líneas MCA-OVA y B16F10-OVA, respectivamente.

Modelos experimentales de tumores en ratones.

Para la inducción de tumores los ratones C57BL/6 fueron inoculados por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho con 1×10^6 células B16F10-OVA ó B16F10, ó $0,5 \times 10^6$ células MCA-OVA, mientras que ratones BALB/c con 1×10^6 células CT26. Para los tumores de carcinoma mamario con la línea 4T1 se utilizaron ratones hembras BALB/c, las cuales fueron inoculadas de forma s.c. en la glándula mamaria abdominal derecha con 2×10^4 células. Los tumores B16F10-OVA, B16F10 y MCA-OVA fueron extraídos a los días 17 a 20 post inyección (p.i.), mientras que los tumores 4T1 al día 28 p.i.. Una vez extraídos fueron disgregados mecánica y enzimáticamente con 2 mL de cóctel de colagenasa IV y DNAsa I por tumor, como se describió para las muestras de pacientes. Luego las suspensiones fueron filtradas con *Cell Strainers* con un tamaño de poro de 70 µm (BD Biosciences). En la mayoría de los experimentos donde se utilizó CF las células mononucleares infiltrantes de tumores fueron enriquecidas mediante la centrifugación de las suspensiones celulares en gradientes de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare) (excepto en aquellos donde se evaluó la frecuencia de distintas poblaciones leucocitarias

infiltrantes donde se realizaron tinciones de las suspensiones celulares directamente).

Citometría de flujo.

Las suspensiones celulares obtenidas mediante los métodos de disgregación fueron teñidas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos murinos y humanos detallados en la tabla de “Anticuerpos y Fluorocromos” (adjuntada en la página siguiente). Las células muertas fueron excluidas de los análisis utilizando una tinción de viabilidad con los reactivos Fixable Viability Stain 700 y Fixable Viability Stain 510 (BD Horizon).

En general por cada tinción se utilizaron de 5×10^4 a 2×10^6 células, dependiendo del ensayo. Las células fueron incubadas por 30 min a 4°C con los anticuerpos y luego fueron lavadas con solución fisiológica al 2% de suero fetal bovino (SF-2%SFB). Para tinciones intracelulares las células fueron fijadas y permeabilizadas según las indicaciones de los fabricantes con los siguientes kits: “Foxp3 Staining Buffer Set” (eBioscience) cuando se analizó la expresión de FTs, “Cytfix/Cytoperm y PermWash” (BD Biosciences) cuando se analizó el contenido citoplasmático de citoquinas y con los buffers BD Phosflow Lyse/Fix y BD Phosflow Perm III cuando se evaluaron proteínas citoplasmáticas fosforiladas (BD Biosciences). Las células fijadas y permeabilizadas fueron teñidas con anticuerpos marcados dirigidos a proteínas intracelulares a temperatura ambiente (TA) por 1 h.

Para la detección de citoquinas intracelulares las células fueron estimuladas antes de las tinciones en 200 μ l de medio RPMI-1640 completo conteniendo 50 ng/mL de PMA (SIGMA), 1 μ g/mL de Ionomicina (SIGMA) y 1X de Brefeldina A y Monensina (eBioscience) por 5 h a 37°C en estufa de cultivo. Por otro lado, la movilización de CD107a a la superficie de las células fue evaluada incubando con un anticuerpo anti-CD107a durante la estimulación con PMA/Iono.

Para la detección de LiTCD8⁺ específicos para OVA en los ratones inyectados con la línea B16F10-OVA, los pellets de células obtenidas de disgregados de tumores fueron primero incubadas durante 5 min a TA con FcR Blocker (Stem Cell Technologies). Posteriormente se tiñó con un dextrámero H-2Kb OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ conjugado con el fluorocromo PE durante 10 min a TA. Las células ya marcadas con el dextrámero fueron luego teñidas con otros anticuerpos como se describió

anteriormente. Como control de tinción específica se utilizó en una muestra diferente un dextrámero H-2Kb SIY conjugado con PE (Immudex), el cual porta un péptido irrelevante para los LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA. Todas las muestras teñidas fueron luego analizadas en los citómetros de flujo BD FACSCanto II, BD LSR Fortessa X20 (BD Biosciences) y Attune Nxt (Life Technologies). Para la identificación de las distintas poblaciones leucocitarias en órganos linfoides y en tumores de los modelos murinos se utilizaron las estrategias de “gates” que se muestran en las Figuras 1 y 2.

Tabla 2: Anticuerpos y Fluorocromos para Citometría de Flujo.

Ratón	Antígeno	Clon	Fluorocromo	Compañía
	2B4	eBio244F4	PE	eBioscience
	Blimp-1	C-21	PE	Santa Cruz Biotech
	CD107a	1D4B	PE	Biolegend
	CD11b	M1/70	FITC	Biolegend
	CD11c	N418	PE	Biolegend
	CD19	eBio1d3	FITC	Biolegend
	CD3	145-2C11	APC-Cy7	eBioscience
			PerCP/Cy5.5	eBioscience
			FITC	eBioscience
	CD39	24DMS1	PerCP/eFluor-710	eBioscience
			eFluor-680	eBioscience
	CD4	GK1.5	APC-eFluor-780	eBioscience
	CD44	IM7	APC-eFluor-780	eBioscience
	CD45.1	A20	APC-eFluor-780	eBioscience
	CD45.2	104	PerCP/Cy5.5	eBioscience
	CD62L	MEL-14	PE	BD Biosciences
	CD73	eBioTY/11.8	PE	eBioscience
			PE-Cy7	eBioscience
	CD8	53-8.7	FITC	eBioscience
			PE-Cy7	eBioscience
	Eomes	Dan11mag	PE	eBioscience
	Foxp3	FJK-16s	APC	eBioscience
			PerCP/Cy5.5	eBioscience
	Granzyme B	GB11	FITC	Biolegend
	IFN γ	XMG1.2	APC	eBioscience
	IL-2	JES6-5H4	PE	Biolegend
	Ki-67	SolA15	eFluor-680	eBioscience
	LAG-3	eBioC9B7W	PE-Cy7	eBioscience
	Ly8C	HK1.4	PerCP/Cy5.5	eBioscience
	Ly8G	1A8	APC-Cy7	Biolegend
	NK1.1	PK136	PE-Cy7	Biolegend
	PD-1	RMP1-30	PE	eBioscience
			PE-Cy7	Biolegend
	T-bet	eBio4B10	PE-Cy7	eBioscience
		4B10	PerCP/Cy5.5	Biolegend
	TIGIT	GIGD7	PerCP/eFluor-710	eBioscience
	Tim-3	RMT3-23	PE	eBioscience
			APC	Biolegend
	TNF	MP6-XT22	PE	eBioscience

	Antígeno	Clon	Fluorocromo	Compañía
Humano	BTLA	MIH26	APC	Biolegend
		J168-540	PE-CF594	BD Biosciences
	CCR7	GO43H7	BV421	Ozyme
	CD107a	eBioH4A3	FITC	eBioscience
	CD27	O323	AlexaFluor700	Biolegend
			BV605	Ozyme
	CD3	UCHT1	APC-Cy7	Biolegend
			BV650	Ozyme
	CD39	eBioA1	PE-Cy7	eBioscience
			A1	Biolegend
		TU68	PF	Biolegend
	CD4	OKT4	BV711	BD Biosciences
			Green A 780-60	BD Biosciences
	CD45RA	HI100	BV785	Ozyme
	CD73	AD2	PE-Cy5	BD Biosciences
			APC	Biolegend
	CD8	HIT8a	PE	BD Biosciences
			PE-Cy7	Biolegend
			3B5	AlexaFluor700
	Foxp3	236A/E7	PE	eBioscience
			AlexaFluor488	eBioscience
	IFN γ	B27	BV421	BD Biosciences
			FITC	BD Biosciences
	IL-2	MQ1-17H12	PE	BD Biosciences
	LAG-3	T47-530	BV421	BD Biosciences
	PD-1	J105	APC	eBioscience
			PE-Cy7	eBioscience
			BV711	Ozyme
	TIGIT	EH12.2H7	BV711	Ozyme
	Tim-3	MBSA43	PerCP/eFluor710	eBioscience
	TNF	MAb11	FITC	Miltenyi
APC			eBioscience	

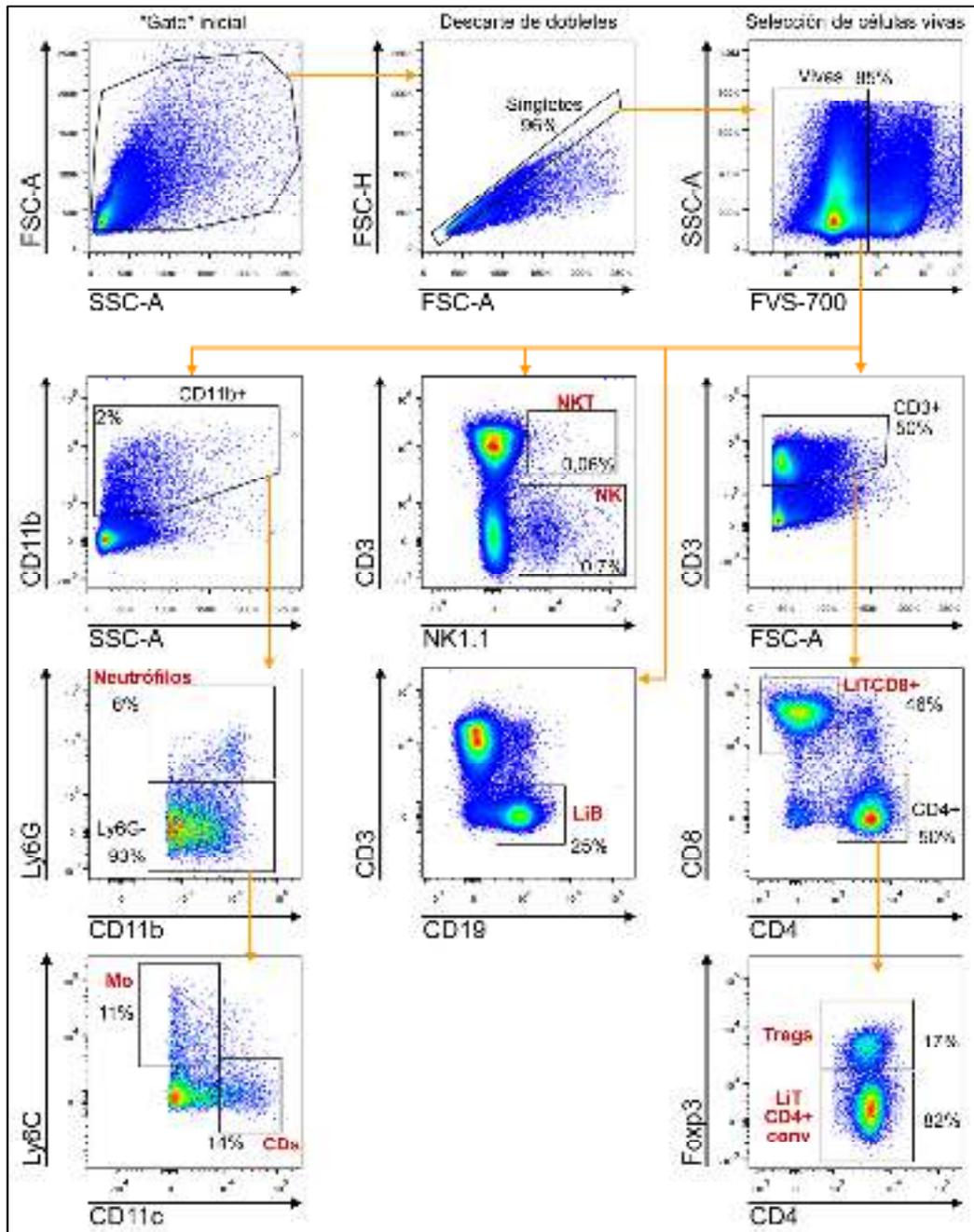


Figura 1: Estrategia de "gates" para el análisis de poblaciones leucocitarias mediante CF en órganos linfoides de ratón. Los "dot plots" representativos muestran la distintas poblaciones leucocitarias en GDs de ratones con tumores B16F10-OVA al día 17 p.i.. El análisis consta de una primera etapa donde se descartan fragmentos pequeños de células ("Gate" inicial), dobletes y células muertas con un colorante de viabilidad. En una segunda etapa se identifican las poblaciones celulares (en rojo): LiTCD8⁺ (CD3⁺CD8⁺CD4⁻), LiTCD4⁺ conv (CD3⁺CD8⁻CD4⁺Foxp3⁻), LiTreg (CD3⁺CD8⁻CD4⁺Foxp3⁺), células NK (CD3⁻NK1.1⁺), células NKT (CD3⁺NK1.1⁺), LiB (CD3⁻CD19⁺), neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺), Células dendríticas (CDs: CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁻CD11c⁺) y monocitos (CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺CD11c⁻).

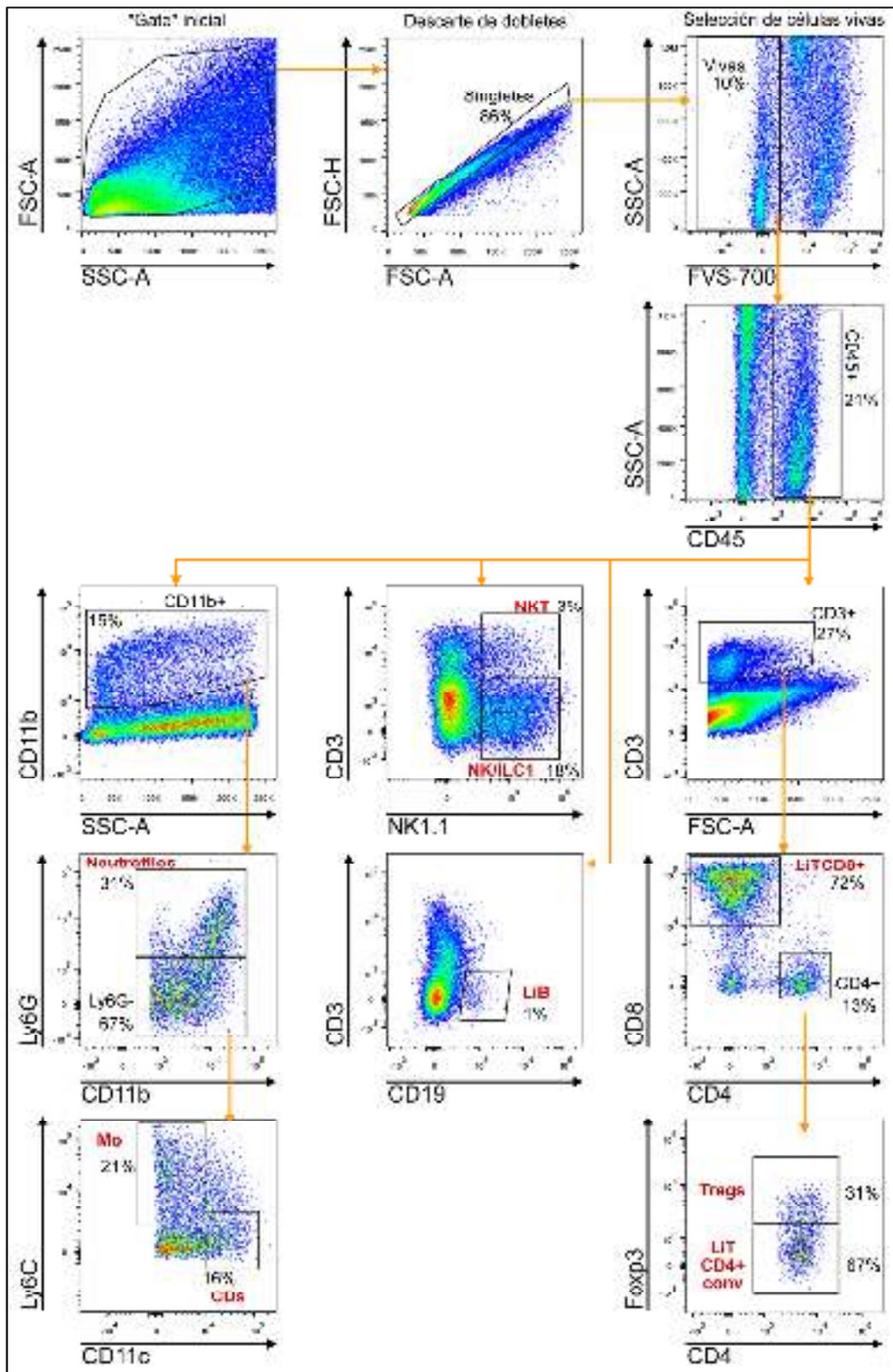


Figura 2: Estrategia de “gates” para el análisis de poblaciones leucocitarias mediante CF en tumores de ratón. Los “dot plots” representativos muestran las distintas poblaciones leucocitarias en tumores B16F10-OVA al día 17 p.i. El análisis consta de una primera etapa donde se descartan fragmentos de células (“Gate” inicial), dobles y células muertas con un colorante de viabilidad. En una segunda etapa se diferencian las poblaciones leucocitarias de las células tumorales con el marcador pan-leucocitario CD45. Luego las distintas poblaciones de células inmunes se identifican como se describió en la figura anterior.

Purificación de LiTCD8⁺ intratumorales.

Para algunos ensayos funcionales y ensayos de cocultivo se purificaron LiTCD8⁺ infiltrantes de tumores B16F10-OVA a partir de suspensiones celulares enriquecidas en células mononucleares mediante la centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque. La purificación se realizó utilizando el kit “EasySep Mouse CD8 Positive Selection II” (StemCell Technologies), siguiendo las instrucciones del fabricante. En algunos ensayos, a partir de los LiTCD8⁺ obtenidos se purificaron las subpoblaciones PD-1⁻Tim-3⁻, PD-1⁺Tim-3⁻ and PD-1⁺Tim-3⁺ mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS), utilizando el equipo FACS Aria IIb Cell Sorter (BD Biosciences). Las células obtenidas se mantuvieron en RPMI-1640 completo por 30 min a 4°C antes de ser utilizadas en ensayos siguientes.

Ensayo de respuesta específica de antígeno.

La respuesta efectora de LiTCD8⁺ específicos para OVA fue analizada estimulando células purificadas de tumores B16F10-OVA con 5 µM de péptido OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴ (SIINFEKL, Invivogen), ó 5 µM del péptido irrelevante SIY como control (SIYRYYGL, Immudex). La estimulación fue realizada en 200 µL de medio RPMI-1640 completo conteniendo 1X de Brefeldina A y Monensina durante 5 h a 37°C en estufa de cultivo. Posteriormente el contenido intracelular de citoquinas fue analizado por CF.

Estimulación de LiTCD8⁺ *in vitro* y ensayos de cocultivo.

En algunos ensayos funcionales los LiTCD8⁺ purificados fueron estimulados por 72 h en placas de 96 pocillos sensibilizadas con 1 µg/mL de anti-CD3, 0,25 µg/mL de anti-CD28 (eBioscience) y, cuando fue indicado, en presencia de 10 ng/mL de IL-2 recombinante de ratón (eBioscience). Para los ensayos de cocultivo se incubaron 5x10⁴ LiTCD8⁺ infiltrantes de tumor (PD-1⁻Tim-3⁻ ó PD-1⁺Tim-3⁺) en una relación 1:1 con LiTCD8⁺ Rp teñidos con éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen). Los LiTCD8⁺ Rp fueron obtenidos de bazos de ratones CD45.1 ó CD73KO utilizando el kit de purificación “EasySep Mouse CD8⁺ T cell Isolation” de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Las células cocultivadas se mantuvieron en placas de 96 pocillos con fondo en “U” sensibilizadas con anti-CD3/anti-CD28, en estufa de cultivo durante 72 h. En algunas condiciones

experimentales se agregó el inhibidor de ectoATPasas ARL67156 (Tocris) al inicio del cocultivo en las concentraciones indicadas en la sección de resultados. Pasadas las 72 h se agregó PMA/Iono, Bref A y Mon a los cultivos por 2 h para estimular la producción de citoquinas. Posteriormente las células fueron analizadas por CF. Los LiTCD8⁺ Rp fueron diferenciados de los LiTCD8⁺ intratumorales gracias a la tinción con CFSE y utilizando anticuerpos dirigidos contra los antígenos CD45.1 (Rp) y CD45.2 (LiTCD8⁺ intratumorales).

Inducción de CD39 en LiTCD8⁺ murinos y humanos.

LiTCD8⁺ fueron purificados de GDs de ratones inyectados con la línea B16F10-OVA utilizando el kit “EasySep Mouse CD8⁺ T cell Isolation”. Luego, 1×10^5 células fueron estimuladas en placas de 96 pocillos con fondo en “U” con anti-CD3/anti-CD28, como se ha indicado previamente, en presencia de citoquinas recombinantes de ratón: IL-6 (20 ng/mL; eBioscience), IL-27 (10 ng/mL; eBioscience) y TGFβ (2 ng/mL; Biolegend). Para la estimulación de LiTCD8⁺ en condiciones de hipoxia se utilizaron células purificadas de bazos y ganglios de animales inyectados con la línea B16F10-OVA y de animales libres de tumores. En dicho ensayo se estimularon 1×10^5 LiTCD8⁺ con anti-CD3/anti-CD28 durante 72 h, de las cuales las últimas 24 h fueron en una atmósfera hipóxica en estufa con 1,5% de O₂.

Para la inducción de CD39 en LiTCD8⁺ humanos se estimularon 2×10^5 CMSP con el kit “T cell Activation-Expansion” (Miltenyi), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Para la purificación de LiTCD8⁺ se utilizó el kit “CD8 Microbeads” (Miltenyi). Luego, 2×10^5 LiTCD8⁺ se estimularon como se indicó para las CMSP, en presencia o ausencia de citoquinas recombinantes humanas: IL-6 (20 ng/mL; ImmunoTools) y/o IL-27 (10 ng/mL; eBioscience). La expresión de CD39 y otras moléculas fue analizada posteriormente por CF.

Ensayo de hidrólisis de ATP exógeno.

Para evaluar la actividad enzimática de CD39, 5×10^4 LiTCD8⁺ intratumorales purificados (PD-1⁻Tim-3⁻; PD-1⁺Tim-3⁻ y PD-1⁺Tim-3⁺) y LiTCD8⁺ de bazos normales fueron cultivados durante 10 ó 60 min en RPMI-1640 libre de rojo fenol con 20 μM de ATP exógeno (SIGMA). Luego, las células fueron centrifugadas en frío y los

sobrenadantes de los cultivos recuperados. Como control se utilizó medio de cultivo libre de células conteniendo 20 μM de ATPe. Para la inhibición de la hidrólisis de ATP los LiTCD8⁺ fueron preincubados durante 16 h en presencia o ausencia de 250 μM del inhibidor de ectoATPasas ARL67156 (Tocris) antes de realizar el ensayo. La viabilidad de las células fue controlada con el método de Azul Tripán luego de las 16 h. La presencia de ATP remanente en los sobrenadantes fue luego analizada con el reactivo ENLITEN rLuciferase/Luciferin (Promega). La actividad bioluminiscente fue medida en forma de “unidades luminiscentes relativas” (ULR) con el equipo Synergy HTX Multi-Mode Reader (BioTek). El porcentaje de ATP remanente para cada condición se calculó utilizando la siguiente fórmula: $(\text{ULR de la muestra} - \text{ULR del medio de cultivo sin ATP}) / (\text{ULR del medio control} - \text{ULR del medio de cultivo sin ATP}) \times 100$. El porcentaje de hidrólisis de ATPe fue calculado de la siguiente manera: $100 - \text{porcentaje de ATP remanente en cada muestra}$.

Inmunohistofluorescencia.

Los tumores fueron extraídos e inmediatamente sumergidos en una solución acuosa de paraformaldehído al 4% para su fijación y mantenidos así durante 24 h. Luego fueron deshidratados sumergiéndolos sucesivamente en soluciones con sacarosa al 15% y 30%, 24 h en cada una de ellas. Los tumores fueron luego colocados en moldes conteniendo el compuesto OCT y congelados a -20°C para formar los tacos. Los cortes del tejido se realizaron en criostato y luego fueron teñidos con los anticuerpos conjugados con fluorocromos que se detallan en la tabla “Anticuerpos para Inmunohistofluorescencia”. Para las tinciones los tejidos fueron bloqueados con un buffer conteniendo 10% de albúmina sérica bovina (BSA) P/V y 0,3% de Tritón V/V en PBS. Luego los cortes se incubaron con los anticuerpos primarios durante 1 h a TA, y luego lavados 5 veces con buffer. Posteriormente los cortes se incubaron con anticuerpos secundarios marcados durante 24 h a 4°C . Finalmente se tiñeron los cortes con 100 μL de PBS conteniendo una dilución 1/10.000 de DAPI (Life Technologies) para marcar los núcleos celulares. Como controles negativos se utilizaron cortes de tejido sin teñir y/o incubados con anticuerpos secundarios pero sin previa incubación con anticuerpos primarios.

Los focos hipóxicos fueron detectados utilizando el kit “Hypoxyprobe-1” (Natural Pharmacia) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. De forma breve, los

ratones inyectados con la línea B16F10-OVA recibieron una inyección intraperitoneal de PBS conteniendo 60 mg de clorhidrato de pimonidazol por Kg de peso del ratón. Luego de 1 h los animales fueron sacrificados y los tumores fijados como se describió anteriormente. El pimonidazol es un compuesto que forma aductos con proteínas celulares sólo en ambientes donde la presión parcial de O₂ es menor a 10 mm de Hg, como ocurre en los focos hipóxicos del MAT. Estos aductos fueron luego detectados en los cortes histológicos utilizando el anticuerpo primario MAB1, específico contra ellos, y un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. Los cortes teñidos fueron finalmente analizados con un microscopio de fluorescencia Leica DMI8 (Leica).

Tabla 3: Anticuerpos para Inmunohistofluorescencia.

Ratón	Antígeno	Clon	Fluorocromo	Compañía
	CD31/PECAM-1	SP38	(anticuerpo primario)	Life Tech
	CD39	24DMS1	eFluor-860	eBioscience
	CD45	OX-30	(anticuerpo primario)	Life Tech
	CD8	Y1S169.4	(anticuerpo primario)	Abcam
	Goat anti-rat IgG	-	AlexaFluor548	Life Tech
	Goat anti-mouse IgG	-	AlexaFluor488	Life Tech
	Goat anti-rabbit IgG	-	AlexaFluor488	Life Tech

Análisis estadísticos.

Para los análisis se utilizó el software GraphPad Prism 6.0. En los experimentos llevados a cabo en ratones se realizó la prueba *t* de Student no apareada para comparar dos grupos experimentales. Durante el análisis de los datos obtenidos con muestras humanas se utilizó la prueba *t* de Student apareada para comparar dos poblaciones celulares o muestras obtenidas de un mismo paciente. En todos los casos que se realizaron múltiples comparaciones se realizó un “Análisis de la Varianza” (ANOVA) de una vía con post test de Tukey. En ensayos donde las múltiples comparaciones eran entre poblaciones celulares provenientes de un mismo ratón se realizó un ANOVA apareado. Se consideró un valor de *P* <0,05 como estadísticamente significativo. Los valores de las distintas mediciones se muestran como la media ± EEM.

1. Organización Mundial de la Salud. <http://www.who.int/es/>
2. National Cancer Institute. USA. <https://www.cancer.gov/>
3. GLOBOCAN. 2012 . <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
4. Instituto Nacional del Cáncer, Argentina. <http://msal.gov.ar/inc/>
5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011, **144**(5): 646-674.
6. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology* 2010, **25**(2): 85-101.
7. Bykov VJN, Eriksson SE, Bianchi J, Wiman KG. Targeting mutant p53 for efficient cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2017.
8. Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature reviews Genetics* 2005, **6**(8): 611-622.
9. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management* 2006, **2**(3): 213-219.
10. Hay N. Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature reviews Cancer* 2016, **16**(10): 635-649.
11. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer metastasis reviews* 2009, **28**(1-2): 151-166.
12. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010, **141**(1): 39-51.
13. Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 2010, **11**(3): 220-228.
14. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009, **30**(7): 1073-1081.

15. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, **140**(6): 883-899.
16. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science* 2011, **331**(6024): 1565-1570.
17. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annual Review of Immunology* 2011, **29**(1): 235-271.
18. Yarchoan M, Johnson BA, 3rd, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to augment antitumour immunity. *Nature reviews Cancer* 2017, **17**(4): 209-222.
19. Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 2001, **410**(6832): 1107-1111.
20. Takeda K, Nakayama M, Hayakawa Y, Kojima Y, Ikeda H, Imai N, *et al.* IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nat Commun* 2017, **8**: 14607.
21. Parker BS, Rautela J, Hertzog PJ. Antitumour actions of interferons: implications for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2016, **16**(3): 131-144.
22. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 2007, **450**(7171): 903-907.
23. Chen DS, Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity* 2013, **39**(1): 1-10.
24. Croci DO, Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky GO. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2007, **56**(11): 1687-1700.
25. Wagner M, Wiig H. Tumor Interstitial Fluid Formation, Characterization, and Clinical Implications. *Frontiers in oncology* 2015, **5**: 115.
26. Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR. Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. *Immunol Lett* 2014, **159**(1-2): 55-72.
27. Gajewski TF, Schreiber H, Fu YX. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 2013, **14**(10): 1014-1022.

28. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(4): 298-306.
29. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006, **313**(5795): 1960-1964.
30. 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.
31. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nature reviews Cancer* 2016, **16**(1): 7-19.
32. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 2010, **11**(10): 889-896.
33. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews Immunology* 2008, **8**(12): 958-969.
34. Reichman H, Karo-Atar D, Munitz A. Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in cancer* 2016, **2**(11): 664-675.
35. Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P, Vandenabeele P. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature reviews Cancer* 2012, **12**(12): 860-875.
36. Gardner A, Ruffell B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends in immunology* 2016, **37**(12): 855-865.
37. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011, **35**(2): 161-168.
38. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nature reviews Immunology* 2012, **12**(11): 749-761.
39. Reiser J, Banerjee A. Effector, Memory, and Dysfunctional CD8(+) T Cell Fates in the Antitumor Immune Response. *Journal of immunology research* 2016, **2016**: 8941260.
40. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev Immunol* 2016, **34**: 317-334.
41. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 2010, **28**: 445-489.

42. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology* 2012, **2012**: 925135.
43. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends in cancer* 2016, **2**(12): 747-757.
44. Sarvaria A, Madrigal JA, Saudemont A. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cellular & molecular immunology* 2017, **14**(8): 662-674.
45. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nature reviews Immunology* 2016, **16**(10): 599-611.
46. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Frontiers in immunology* 2012, **3**: 51.
47. Adeegbe DO, Nishikawa H. Natural and induced T regulatory cells in cancer. *Frontiers in immunology* 2013, **4**: 190.
48. Gabrilovich DI. Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Cancer immunology research* 2017, **5**(1): 3-8.
49. Tran Janco JM, Lamichhane P, Karyampudi L, Knutson KL. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. *J Immunol* 2015, **194**(7): 2985-2991.
50. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, Natoli G. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in immunology* 2015, **36**(4): 229-239.
51. Wang RF. CD8+ regulatory T cells, their suppressive mechanisms, and regulation in cancer. *Human immunology* 2008, **69**(11): 811-814.
52. Chaput N, Louafi S, Bardier A, Charlotte F, Vaillant JC, Menegaux F, *et al.* Identification of CD8+CD25+Foxp3+ suppressive T cells in colorectal cancer tissue. *Gut* 2009, **58**(4): 520-529.
53. Zhang S, Ke X, Zeng S, Wu M, Lou J, Wu L, *et al.* Analysis of CD8+ Treg cells in patients with ovarian cancer: a possible mechanism for immune impairment. *Cellular & molecular immunology* 2015, **12**(5): 580-591.
54. Alvarez Arias DA, Kim HJ, Zhou P, Holderried TA, Wang X, Dranoff G, *et al.* Disruption of CD8+ Treg activity results in expansion of T follicular helper cells and enhanced antitumor immunity. *Cancer immunology research* 2014, **2**(3): 207-216.
55. Parodi A, Battaglia F, Kalli F, Ferrera F, Conteduca G, Tardito S, *et al.* CD39 is highly involved in mediating the suppression activity of tumor-infiltrating CD8+ T regulatory lymphocytes. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2013, **62**(5): 851-862.

56. Wu AA, Drake V, Huang HS, Chiu S, Zheng L. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology* 2015, **4**(7): e1016700.
57. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nature reviews Immunology* 2009, **9**(5): 338-352.
58. Voron T, Colussi O, Marcheteau E, Pernot S, Nizard M, Pointet AL, *et al.* VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *J Exp Med* 2015, **212**(2): 139-148.
59. Spranger S. Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment. *International immunology* 2016, **28**(8): 383-391.
60. Mascalfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, *et al.* Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha. *Nat Med* 2015, **21**(6): 638-646.
61. Mascalfroni ID, Yeste A, Vieira SM, Burns EJ, Patel B, Sloma I, *et al.* IL-27 acts on DCs to suppress the T cell response and autoimmunity by inducing expression of the immunoregulatory molecule CD39. *Nat Immunol* 2013, **14**(10): 1054-1063.
62. Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Sun Z, Zaghouani S, Gu G, *et al.* An IL-27/NFIL3 signalling axis drives Tim-3 and IL-10 expression and T-cell dysfunction. *Nat Commun* 2015, **6**: 6072.
63. Crespo J, Sun H, Welling TH, Tian Z, Zou W. T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. *Current Opinion in Immunology* 2013, **25**(2): 214-221.
64. Akbar AN, Henson SM. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nature reviews Immunology* 2011, **11**(4): 289-295.
65. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol* 2011, **12**(6): 492-499.
66. Odorizzi PM, Pauken KE, Paley MA, Sharpe A, Wherry EJ. Genetic absence of PD-1 promotes accumulation of terminally differentiated exhausted CD8+ T cells. *J Exp Med* 2015, **212**(7): 1125-1137.
67. Wherry EJ, Kurachi M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nature reviews Immunology* 2015, **15**(8): 486-499.

68. Giordano M, Henin C, Maurizio J, Imbratta C, Bourdely P, Buferne M, *et al.* Molecular profiling of CD8 T cells in autochthonous melanoma identifies Maf as driver of exhaustion. *EMBO J* 2015, **34**(15): 2042-2058.
69. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature reviews Immunology* 2013, **13**(4): 227-242.
70. Blackburn SD, Shin H, Haining NW, Zou T, Workman CJ, Polley A, *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology* 2009, **10**(1): 29-37.
71. Doering TA, Crawford A, Angelosanto JM, Paley MA, Ziegler CG, Wherry EJ. Network analysis reveals centrally connected genes and pathways involved in CD8+ T cell exhaustion versus memory. *Immunity* 2012, **37**(6): 1130-1144.
72. Angelosanto JM, Wherry JE. Transcription factor regulation of CD8+ T-cell memory and exhaustion. *Immunological Reviews* 2010, **236**(1): 167-175.
73. Paley MA, Kroy DC, Odorizzi PM, Johnnidis JB, Dolfi DV, Barnett BE, *et al.* Progenitor and Terminal Subsets of CD8+ T Cells Cooperate to Contain Chronic Viral Infection. *Science* 2012, **338**(6111): 1220-1225.
74. Pauken KE, Wherry EJ. SnapShot: T Cell Exhaustion. *Cell* 2015, **163**(4): 1038-1038 e1031.
75. Pauken KE, Wherry EJ. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. *Trends in immunology* 2015, **36**(4): 265-276.
76. Speiser DE, Utzschneider DT, Oberle SG, Munz C, Romero P, Zehn D. T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nature reviews Immunology* 2014, **14**(11): 768-774.
77. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 2007, **27**(4): 670-684.
78. Bengsch B, Johnson AL, Kurachi M, Odorizzi PM, Pauken KE, Attanasio J, *et al.* Bioenergetic Insufficiencies Due to Metabolic Alterations Regulated by the Inhibitory Receptor PD-1 Are an Early Driver of CD8(+) T Cell Exhaustion. *Immunity* 2016, **45**(2): 358-373.
79. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, *et al.* Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell* 2015, **162**(6): 1229-1241.

80. Utzschneider DT, Legat A, Fuertes Marraco SA, Carrie L, Luescher I, Speiser DE, *et al.* T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat Immunol* 2013, **14**(6): 603-610.
81. Pauken KE, Sammons MA, Odorizzi PM, Manne S, Godec J, Khan O, *et al.* Epigenetic stability of exhausted T cells limits durability of reinvigoration by PD-1 blockade. *Science* 2016, **354**(6316): 1160-1165.
82. Sen DR, Kaminski J, Barnitz RA, Kurachi M, Gerdemann U, Yates KB, *et al.* The epigenetic landscape of T cell exhaustion. *Science* 2016, **354**(6316): 1165-1169.
83. Sakuishi K, Apetoh L, Sullivan JM, Blazar BR, Kuchroo VK, Anderson AC. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of experimental medicine* 2010, **207**(10): 2187-2194.
84. Baitsch L, Baumgaertner P, Devevre E, Raghav SK, Legat A, Barba L, *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8(+) T cells in metastases from melanoma patients. *J Clin Invest* 2011, **121**(6): 2350-2360.
85. Fourcade J, Sun Z, Benallaoua M, Guillaume P, Luescher IF, Sander C, *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of Experimental Medicine* 2010, **207**(10): 2175-2186.
86. Chauvin JM, Pagliano O, Fourcade J, Sun Z, Wang H, Sander C, *et al.* TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *J Clin Invest* 2015, **125**(5): 2046-2058.
87. Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol Med* 2015, **21**(1): 24-33.
88. Antonioli L, Pacher P, Vizi SE, Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends in Molecular Medicine* 2013, **19**(6): 355-367.
89. Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nature Reviews Immunology* 2011, **11**(3): 201-212.
90. Langston HP, Ke Y, Gewirtz AT, Dombrowski KE, Kapp JA. Secretion of IL-2 and IFN-gamma, but not IL-4, by antigen-specific T cells requires extracellular ATP. *J Immunol* 2003, **170**(6): 2962-2970.
91. Trautmann A. Extracellular ATP in the immune system: more than just a "danger signal". *Science signaling* 2009, **2**(56).
92. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Haskó G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nature Reviews Cancer* 2013, **13**(12): 842-857.

93. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2006, **2**(2): 409-430.
94. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene* 2013, **32**(14): 1743-1751.
95. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine* 2007, **204**(6): 1257-1265.
96. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 2012, **36**(3): 362-373.
97. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, *et al.* Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF- β . *European Journal of Immunology* 2011, **41**(10): 2955-2965.
98. Eltzschig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* 2009, **113**(1): 224-232.
99. Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Belikoff B, Schreiber TH, Sethumadhavan S, *et al.* Systemic oxygenation weakens the hypoxia and hypoxia inducible factor 1 - dependent and extracellular adenosine-mediated tumor protection. *Journal of Molecular Medicine* 2014, **92**(12): 1283-1292.
100. Takenaka MC, Robson S, Quintana FJ. Regulation of the T Cell Response by CD39. *Trends in immunology* 2016, **37**(7): 427-439.
101. Feng L, Sun X, Csizmadia E, Han L, Bian S, Murakami T, *et al.* Vascular CD39/ENTPD1 directly promotes tumor cell growth by scavenging extracellular adenosine triphosphate. *Neoplasia* 2011, **13**(3): 206-216.
102. Bastid J, Regairaz A, Bonnefoy N, Dejoux C, Giustiniani J, Laheurte C, *et al.* Inhibition of CD39 enzymatic function at the surface of tumor cells alleviates their immunosuppressive activity. *Cancer immunology research* 2015, **3**(3): 254-265.
103. Bono M, Fernández D, Flores-Santibáñez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Letters* 2015, **589**(22): 3454-3460.
104. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, Smyth MJ. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology* 2012, **33**(5): 231-237.

105. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008, **111**(1): 251-259.
106. Cekic C, Linden J. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res* 2014, **74**(24): 7239-7249.
107. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, *et al.* CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer research* 2011, **71**(8): 2892-2900.
108. Sun X, Wu Y, Gao W, Enyoji K, Csizmadia E, Muller CE, *et al.* CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* 2010, **139**(3): 1030-1040.
109. Cai XY, Wang XF, Li J, Dong JN, Liu JQ, Li NP, *et al.* Overexpression of CD39 and high tumoral CD39(+)/CD8(+) ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015, **8**(11): 14757-14764.
110. Allard B, Longhi MS, Robson SC, Stagg J. The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunol Rev* 2017, **276**(1): 121-144.
111. Gouttefangeas C, Mansur I, Schmid M, Dastot H, Gelin C, Mahouy G, *et al.* The CD39 molecule defines distinct cytotoxic subsets within alloactivated human CD8-positive cells. *Eur J Immunol* 1992, **22**(10): 2681-2685.
112. Hilchey SP, Kobie JJ, Cochran MR, Secor-Socha S, Wang J-CE, Hyrien O, *et al.* Human Follicular Lymphoma CD39+-Infiltrating T Cells Contribute to Adenosine-Mediated T Cell Hyporesponsiveness. *The Journal of Immunology* 2009, **183**(10): 6157-6166.
113. Pulte D, Furman RR, Broekman JM, Drosopoulos J, Ballard HS, Olson KE, *et al.* CD39 Expression on T Lymphocytes Correlates With Severity of Disease in Patients With Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2011, **11**(4): 367-372.
114. Mandl S, Sigal LJ, Rock KL, Andino R. Poliovirus vaccine vectors elicit antigen-specific cytotoxic T cells and protect mice against lethal challenge with malignant melanoma cells expressing a model antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**(14): 8216-8221.
115. Gao Y, Souza-Fonseca-Guimaraes F, Bald T, Ng SS, Young A, Ngiow SF, *et al.* Tumor immunoevasion by the conversion of effector NK cells into type 1 innate lymphoid cells. *Nat Immunol* 2017, **18**(9): 1004-1015.

116. Chang JT, Wherry EJ, Goldrath AW. Molecular regulation of effector and memory T cell differentiation. *Nat Immunol* 2014, **15**(12): 1104-1115.
117. Xiao Z, Mescher MF, Jameson SC. Detuning CD8 T cells: down-regulation of CD8 expression, tetramer binding, and response during CTL activation. *J Exp Med* 2007, **204**(11): 2667-2677.
118. Christiaansen AF, Dixit UG, Coler RN, Marie Beckmann A, Reed SG, Winokur PL, *et al.* CD11a and CD49d enhance the detection of antigen-specific T cells following human vaccination. *Vaccine* 2017, **35**(33): 4255-4261.
119. McDermott DS, Varga SM. Quantifying antigen-specific CD4 T cells during a viral infection: CD4 T cell responses are larger than we think. *J Immunol* 2011, **187**(11): 5568-5576.
120. Moretto MM, Hwang S, Khan IA. Downregulated IL-21 Response and T Follicular Helper Cell Exhaustion Correlate with Compromised CD8 T Cell Immunity during Chronic Toxoplasmosis. *Frontiers in immunology* 2017, **8**: 1436.
121. Bose TO, Pham QM, Jellison ER, Mouries J, Ballantyne CM, Lefrancois L. CD11a regulates effector CD8 T cell differentiation and central memory development in response to infection with *Listeria monocytogenes*. *Infection and immunity* 2013, **81**(4): 1140-1151.
122. Gros A, Robbins PF, Yao X, Li YF, Turcotte S, Tran E, *et al.* PD-1 identifies the patient-specific CD8(+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. *J Clin Invest* 2014, **124**(5): 2246-2259.
123. Schietinger A, Philip M, Krisnawan VE, Chiu EY, Delrow JJ, Basom RS, *et al.* Tumor-Specific T Cell Dysfunction Is a Dynamic Antigen-Driven Differentiation Program Initiated Early during Tumorigenesis. *Immunity* 2016, **45**(2): 389-401.
124. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, *et al.* Consensus nomenclature for CD8+ T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology* 2015, **4**(4): e998538.
125. MacIver NJ, Michalek RD, Rathmell JC. Metabolic regulation of T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2013, **31**: 259-283.
126. Jiang Y, Li Y, Zhu B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell death & disease* 2015, **6**: e1792.
127. Crack BE, Pollard CE, Beukers MW, Roberts SM, Hunt SF, Ingall AH, *et al.* Pharmacological and biochemical analysis of FPL 67156, a novel, selective inhibitor of ecto-ATPase. *British journal of pharmacology* 1995, **114**(2): 475-481.

128. Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J. Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. *British journal of pharmacology* 2007, **152**(1): 141-150.
129. Penafuerte C, Galipeau J. TGF beta secreted by B16 melanoma antagonizes cancer gene immunotherapy bystander effect. *Cancer Immunol Immunother* 2008, **57**(8): 1197-1206.
130. Colak S, Ten Dijke P. Targeting TGF-beta Signaling in Cancer. *Trends in cancer* 2017, **3**(1): 56-71.
131. Smith AL, Robin TP, Ford HL. Molecular pathways: targeting the TGF-beta pathway for cancer therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012, **18**(17): 4514-4521.
132. Wherry JE. T cell exhaustion. *Nature Immunology* 2011, **12**(6): 492-499.
133. Vaupel P, Mayer A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews* 2007, **26**(2): 225-239.
134. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 2014, **41**(4): 518-528.
135. Ren L, Yu Y, Wang L, Zhu Z, Lu R, Yao Z. Hypoxia-induced CCL28 promotes recruitment of regulatory T cells and tumor growth in liver cancer. *Oncotarget* 2016, **7**(46): 75763-75773.
136. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, *et al.* CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* 2017, **6**(6): e1320011.
137. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *The Journal of clinical investigation* 2002, **110**(7): 993-1002.
138. Yaqub S, Aandahl EM. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Critical reviews in oncogenesis* 2009, **15**(1-2): 43-63.
139. Pollizzi KN, Sun IH, Patel CH, Lo YC, Oh MH, Waickman AT, *et al.* Asymmetric inheritance of mTORC1 kinase activity during division dictates CD8(+) T cell differentiation. *Nat Immunol* 2016, **17**(6): 704-711.
140. Tóth I, Le AQ, Hartjen P, Thomssen A, Matzat V, Lehmann C, *et al.* Decreased frequency of CD73+CD8+ T cells of HIV-infected patients correlates with immune activation and T cell exhaustion. *Journal of leukocyte biology* 2013, **94**(4): 551-561.

141. Gupta PK, Godec J, Wolski D, Adland E, Yates K, Pauken KE, *et al.* CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS pathogens* 2015, **11**(10).
142. Ravimohan S, Tamuhla N, Nfanyana K, Ni H, Steenhoff AP, Gross R, *et al.* Elevated Pre-Antiretroviral Therapy CD39+CD8+ T Cell Frequency Is Associated With Early Mortality in Advanced Human Immunodeficiency Virus/Tuberculosis Co-infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2017, **64**(10): 1453-1456.
143. Fenoglio D, Dentone C, Signori A, Di Biagio A, Parodi A, Kalli F, *et al.* CD8(+)CD28(-)CD127(lo)CD39(+) regulatory T-cell expansion: A new possible pathogenic mechanism for HIV infection? *The Journal of allergy and clinical immunology* 2017.
144. Bai A, Moss A, Rothweiler S, Longhi MS, Wu Y, Junger WG, *et al.* NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8(+) T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nature communications* 2015, **6**: 8819.
145. Noble A, Mehta H, Lovell A, Papaioannou E, Fairbanks L. IL-12 and IL-4 activate a CD39-dependent intrinsic peripheral tolerance mechanism in CD8(+) T cells. *European journal of immunology* 2016, **46**(6): 1438-1448.
146. Wen Z, Shimojima Y, Shirai T, Li Y, Ju J, Yang Z, *et al.* NADPH oxidase deficiency underlies dysfunction of aged CD8+ Tregs. *J Clin Invest* 2016, **126**(5): 1953-1967.
147. Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nature reviews Cancer* 2009, **9**(11): 798-809.
148. Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature reviews Clinical oncology* 2016, **13**(6): 394.
149. Larkin J, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *The New England journal of medicine* 2015, **373**(13): 1270-1271.
150. Hashimoto M, Kamphorst AO, Im SJ, Kissick HT, Pillai RN, Ramalingam SS, *et al.* CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annual review of medicine* 2018, **69**: 301-318.
151. Cogdill AP, Andrews MC, Wargo JA. Hallmarks of response to immune checkpoint blockade. *British journal of cancer* 2017, **117**(1): 1-7.
152. Loo K, Tsai KK, Mahuron K, Liu J, Pauli ML, Sandoval PM, *et al.* Partially exhausted tumor-infiltrating lymphocytes predict response to combination immunotherapy. *JCI insight* 2017, **2**(14).

Publicaciones:

Los resultados obtenidos durante esta tesis doctoral fueron publicados en la revista científica *Cancer Research*:

CD39 expression defines cell exhaustion in tumor-infiltrating CD8+ T cells.

Autores: Fernando P. Canale, María C. Ramello, Nicolas Núñez, Cintia L. Araujo Furlan, Sabrina N. Bossio, Melisa Gorosito Serrán, Jimena Tosello Boari, Andrés del Castillo, Marta Ledesma, Christine Sedlik, Eliane Piaggio, Adriana Gruppi, Eva V. Acosta Rodríguez, Carolina L. Montes.

Cancer Research 2018. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2684.

En base a esta publicación fuimos invitados por los editores de la revista *Oncoscience* a escribir el siguiente editorial:

CD39 as a marker of pathogenic CD8+ T cells in cancer and other chronic inflammatory diseases.

Fernando Pablo Canale, María Cecilia Ramello, y Carolina Lucía Montes.

Oncoscience, 2018. DOI: 10.18632/oncoscience.404

A su vez, durante el desarrollo de esta tesis he sido colaborador en el trabajo publicado:

Tumor induced senescent T cells promote the secretion of pro-inflammatory cytokines and angiogenic factors by human monocytes through a mechanism that involves TIM-3 and CD40L.

Autores: MC Ramello, J Tosello Boari, FP Canale, HA Mena, S Negrotto, B Gastman, A Gruppi, EV Acosta Rodríguez and CL Montes.

Cell Death and Disease, 2015. DOI:10.1038/cddis.2014.451.

Presentaciones en reuniones científicas:

Tumor-infiltrating CD39^{high}CD8⁺ T cells exhibit a poor effector response and are associated to immunogenic tumors and hypoxic environments. Fernando Canale, Sabrina Bossio, Carolina Abrate, Adriana Gruppi, Eva Acosta Rodríguez, Carolina Montes. LXV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 13-17 de 2017.

CD39 delineates cell exhaustion in mouse and human tumor-associated CD8⁺ T cells: a possible immunomodulatory role of a “dysfunctional” cell subset”. Fernando Canale, Cecilia Ramello, Nicolás Núñez, Cintia Araujo Furlan, Melisa Gorosito Serrán, Jimena Tosello Boari, Sabrina Bossio, Andrés del Castillo, Marta Ledesma, Christine Sedlik, Eliane Piaggio, Adriana Gruppi, Eva Acosta Rodríguez, Carolina Montes. LXIV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 16-19 de 2016.

Study of the modulatory role of different tumor-infiltrating CD8 T cells subpopulations. Canale, Fernando; Ramello, M. Cecilia; Araujo Furlán, Cintia; Gorosito Serrán, Melisa; Tosello, Jimena; Gruppi, Adriana; Acosta Rodríguez Eva; Montes, Carolina. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 18-22 de 2015.

PD-1⁺ TIM-3⁺ T cells from 4T1 tumor-bearing mice display features of exhaustion and increased expression of immunomodulatory molecules.

Canale, Fernando; Ramello, M Cecilia; Gorosito Serrán, Melisa; Araujo Furlan, Cintia; Tosello, Jimena; Acosta Rodríguez, Eva; Gruppi, Adriana; Montes, Carolina. LXII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 18-22 de 2014.

Exhausted T cells (Tim-3+PD-1+) infiltrate tumors of 4T1 mammary carcinoma bearing mice. Canale Fernando P, Ramello M Cecilia, Tosello Jimena, Araujo Furlan Cintia, Gorosito Serran Melisa, Acosta Rodriguez Eva, Montes Carolina. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Noviembre 7-9 de 2013.