



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

## **Rol de CD73 en el fenotipo y la producción de citoquinas de células NK murinas expandidas in vitro**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

**Moira Javiera García Gómez**

Directora del Seminario de Título:

Dra. Daniela Sauma Mahaluf

Co-Directora:

Dra. María Rosa Bono

Mayo 2022

Santiago - Chile



## **INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el **Srta. Moira Javiera García Gómez**

**“Rol de CD73 en el fenotipo y producción de citoquinas de células NK murinas in vitro”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de .....

**Director Seminario de Título:** \_\_\_\_\_

### **Comisión Revisora y Evaluadora**

**Presidente Comisión:** \_\_\_\_\_

**Evaluador:** \_\_\_\_\_

Santiago de Chile, .....

## Biografía



Moira Javiera García Gómez Nació un 15 de marzo de 1999

Desarrollo su enseñanza básica desde kínder hasta 7° básico en la escuela Eusebio Ibar Schepeler en la localidad de La Junta de la comuna de Cisnes. Continuó sus estudios de nivel medio en el Liceo Bicentenario Altos del Mackay en la comuna de Coyhaique donde egresó de 4° medio en el año 2016.

A continuación, e impulsada por su interés en las ciencias biológicas y la investigación científica en enfermedades autoinmunes como el Lupus, se mudó desde la región de Aysén a la región Metropolitana para ingresar en marzo de 2017 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Durante el primer semestre del año 2021 realizó una unidad de investigación en el laboratorio de inmunología de la Facultad de Ciencias bajo la tutoría de la Dra. Daniela Sauma donde posteriormente realizó su Seminario de Título. Dentro de ese mismo año recibió su grado de Licenciada en Ingeniería en Biotecnología Molecular.

## **Agradecimientos**

No se puede dejar pasar esta oportunidad de agradecer a mi mamá y mi papi, por todo el esfuerzo que han hecho para que yo pudiera estudiar, estando tan lejos de casa. Además, dar gracias de todo el cariño y la confianza que me entregan día a día para que sin importar nada yo persiga mis sueños. Mencionar también a mi hermana, ya que sin su ejemplo todo habría sido mucho más difícil.

Por otro lado, agradecer a mi amiga Paulina por su hospitalidad, ya que, ella y su familia me recibieron y acogieron muchas veces en su hogar como una más de la familia. Es necesario también hacer mención honrosa a mi amigo y compañero de tantas noches de estudio Roberto, su ayuda en mi primer año de universidad y a lo largo de toda la carrera fue fundamental, sin olvidar mencionar que para este seminario de título también recibí su apoyo moral incondicional.

Agradecer también a mi pololo por todo el cariño y apoyo que recibí de su parte en el periodo que estuve realizando los experimentos y también durante la escritura de este trabajo.

Finalmente agradecer a la Dra Daniela Sauma y a todo el laboratorio de inmunología por permitirme ser parte del equipo e ir mucho más allá de eso, brindándome su cariño y comprensión en los momentos difíciles que ocurrieron en el transcurso de este seminario de título.

## v. Índice de Contenido

<b>Biografía</b>	ii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice de contenido</b>	v
<b>Índice de figuras</b>	vi
<b>Índice de tablas</b>	vii
<b>Lista de Abreviaturas</b>	viii
<b>1 Resumen</b>	10-11
<b>2 Abstract</b>	11-12
<b>3 Introducción</b>	12-18
3.1 Células NK	
3.2 Proceso de activación de las células NK	
3.3 Células NK en el nicho tumoral	
3.4 Puntos de control inmune en células NK	
3.5 Señalización purinérgica	
3.6 Efecto de CD73 en las células NK	
3.7 Expansión de las células NK in vitro	
<b>4 Hipótesis y objetivos</b>	19
4.1 Hipótesis	
4.2 Objetivo General	
4.3 Objetivo específico	
<b>5 Materiales y métodos</b>	20-25
5.1 Animales	
5.2 Enriquecimiento de células NK	
5.3 Cultivo de Células NK	
5.5 Anticuerpos y tinción para citometría de flujo	
5.5 Recuento de células por citometría de flujo	
5.6 Análisis estadístico	

<b>6 Resultados</b>	26 - 38
6.1 Estandarizar un protocolo de cultivo <i>in vitro</i> de células NK murinas.	
6.2 Evaluar la expresión de marcadores clásicos de activación en los cultivos de células NK WT y CD73 KO.	
6.3 Analizar receptores de activación e inhibición y puntos de control inmune en las células NK WT y CD73 KO expandidas <i>in vitro</i> .	
6.4 Determinar el perfil de producción y secreción de citoquinas de las células NK WT y CD73 KO expandidas <i>in vitro</i> .	
<b>7 Discusión</b>	39 - 44
<b>8 Conclusiones</b>	45
<b>9 Bibliografía</b>	46 - 48

## vi. Índice de figuras

<b>Figura 1. Cultivo de células NK</b>	27
<b>Figura 2. Cinética de expansión de células NK WT y CD73 KO en cultivo primario</b>	29
<b>Figura 3. Los marcadores de activación CD69 y CD25 se inducen en células NK</b>	31-32
<b>Figura 4. CD73 no influye en la expresión de receptores activadores o inhibitorios.</b>	33
<b>Figura 5. Células NK cultivadas in vitro inducen la expresión de puntos de control inmune.</b>	35-36
<b>Figura 6. Células NK cultivadas in vitro con IL-15 producen citoquinas luego de la activación con PMA más Ionomicina</b>	37-38
<b>Figura 7. Células NK cultivadas in vitro con IL-15 secretan citoquinas luego de la activación con PMA más Ionomicina</b>	38

## vii. Índice de Tablas

<b>Tabla1. Anticuerpos utilizados</b>	24
---------------------------------------	----

## viii. Lista de abreviaturas

- ADP: Adenosín difosfato.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- AMP: Adenosín monofosfato
- BCR: Receptor de células B.
- cAMP: AMP cíclico.
- CBA: *Cytometric Bead Array*.
- CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono.
- FBS: Suero fetal bovino.
- FSC-A: Área de la señal de dispersión frontal.
- FSC-H: Altura de la señal de dispersión frontal.
- GzmB: Granzima B.
- IFM: Intensidad de fluorescencia media geométrica.
- IFN-γ: Interferón gama.
- IL-12: Interleuquina 12.
- IL-15: Interleuquina 15.
- IL-18: Interleuquina 18.
- IL-2: Interleuquina 2.
- IL-7: Interleuquina 7.
- ILC: Células linfoides innatas.
- KLRG1: Killer cell lectin-like receptor G1
- LAG-3: *Lymphocyte-activation gene 3*
- KO: *Knock out*/Inactivado.
- MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.
- NK: *Natural Killer*.
- PBS: Tampón fosfato salino.
- PD-1: *programmed death 1 molecule*.
- RPMI: Medio instituto memorial parque Roswell.
- SSC-A: Área de la señal de dispersión lateral.
- TCR: Receptor de células T.
- TIGIT: *T-Cell Immunoreceptor with Ig and ITIM Domains*
- TIM-3: *T cell immunoglobulin and mucin domain containing protein 3*.



TME: *Tumor microenvironment*.

TNF- $\alpha$ : *Tumor necrosis factor  $\alpha$* . Factor de necrosis tumoral alfa.

WT: *Wild type*/Tipo Silvestre.

## Resumen

Las células NK son linfocitos innatos que son muy relevantes en la respuesta inmune antitumoral ya que pueden reconocer y eliminar directamente las células tumorales, sin una estimulación previa. Dentro del microambiente tumoral, existe un entorno inmunosupresor, siendo la adenosina una molécula importante en este contexto, la cual señala principalmente a través del receptor  $A_{2A}$  y es capaz de suprimir tanto la actividad citotóxica como la producción de citoquinas de las células NK. En el microambiente tumoral la adenosina se produce principalmente por la hidrólisis del ATP extracelular, mediante la acción de dos enzimas ectonucleotidasas CD39 y CD73. Estas enzimas son sobre expresadas en diversos tipos de cáncer y recientemente se ha demostrado que pueden expresarse en las células NK activadas, pero su función en estas células sigue siendo desconocida. Más aún, debido a que las células NK representan un porcentaje muy pequeño de las células del bazo de un ratón, es muy difícil estudiar esta población *in vivo* en un modelo murino. De esta forma, el objetivo de este estudio fue generar un protocolo de expansión de células NK con IL-15 de manera de evaluar el papel de CD73 en su fenotipo y funcionalidad. En concordancia con la literatura, las células NK cultivadas con IL-15 proliferaron considerablemente y regularon positivamente los marcadores clásicos de activación CD69 y CD25. Además, de los cultivos de células NK provenientes de ratones CD73KO se obtuvieron siempre más células en comparación con los del control WT. Por otro lado, tras siete días de cultivo, las células NK control y CD73KO expresaron puntos de control inmune, que son moléculas asociadas a un estado hipo-funcional denominado agotamiento. A pesar de la expresión de puntos de control inmune, las células NK mantuvieron su capacidad de producir y secretar

citoquinas, así como también la producción de granzima B. Se concluye que la IL-15 permite la expansión y activación de células NK, pero un cultivo prolongado con esta citoquina podría propiciar un estado de agotamiento en estos linfocitos. Además, los datos sugieren que CD73 ejerce un rol en la regulación de la proliferación de las células NK.

### **Abstract**

NK cells are innate lymphocytes, which are key components of the antitumor immune response, as they can directly recognize and eliminate tumor cells without prior stimulation. The tumor microenvironment is highly immunosuppressive and adenosine is a pivotal molecule in this context. Adenosine signals mainly through the A2A receptor and it has been shown to suppress both cytotoxic activity and cytokine production of NK cells. This nucleoside is mainly produced by the hydrolysis of extracellular ATP through the action of CD39 and CD73 ectonucleotidases. These enzymes are overexpressed in various types of cancer and more recently in activated NK cells, but their function in these cells remains unclear. On the other hand, IL-15 stimulation is known to promote NK cell activation and proliferation both *in vivo* and *in vitro*. Thus, the aim of this study is to expand *in vitro* NK cells from CD73-deficient and wild type mice with IL-15 to analyze their phenotype and functionality. As expected, NK cells cultured with IL-15 proliferated considerably and positively regulated the classical activation markers CD69 and CD25. In addition, NK cell cultures from CD73KO animals always yielded more cells compared to those from the WT control. On the other hand, after seven days of culture, control and CD73KO NK cells expressed immune checkpoints, which are molecules associated with a hypo-functional state called exhaustion. Interestingly, despite the expression of immune checkpoints, NK cells maintained their ability to produce and secrete cytokines,

as well as granzyme B production. In conclusion, IL-15 allows the *in vitro* expansion and activation of NK cells, but prolonged culture with the cytokine may lead to a state of exhaustion in these lymphocytes. Finally, data presented here suggests that CD73 plays a role in regulating NK cell proliferation.

### **3. Introducción**

#### **3.1 Células NK**

Las células *natural killer* (NK) son parte fundamental de la inmunidad innata. Estas células fueron las primeras células linfoides innatas (ILC) descritas y por tanto han sido ampliamente estudiadas. Representan alrededor del 2-5% de los linfocitos circulantes en ratones (Jiao et al., 2016). Cumplen una función importante dentro de la inmunidad celular siendo parte de la primera línea de defensa del organismo. Se encargan de eliminar y contener infecciones intracelulares tanto virales como bacterianas, dando tiempo al sistema inmune para que se monte una respuesta adaptable (Vivier et al., 2008). Otra función que desempeñan estos linfocitos innatos es la eliminación de células que presenten características anormales o proliferación exacerbada, llámese células tumorales o cancerígenas (Chiossone et al., 2018). Para esto, las células NK presentan al menos dos tipos de respuesta efectora, una directa a través de la secreción de gránulos citotóxicos y otro mediado por la producción de citoquinas. Los gránulos que secretan contienen enzimas proteolíticas como perforinas y granzimas, capaces de inducir apoptosis en la célula blanco y así eliminarla. Por el otro lado la producción y liberación de citoquinas como el IFN- $\gamma$  ayuda en el reclutamiento de otras células inmunes al sitio afectado (Abel et al., 2018).

### 3.2 Activación de células NK

Para poder ejercer su acción efectora las células inmunes pasan por una etapa de reconocimiento y activación frente a un determinado estímulo, en el caso de las células NK este proceso difiere del de otros linfocitos como los de tipo T o B, pues su activación no está determinada por la unión de un antígeno específico a su receptor clonotípico (TCR o BCR), sino más bien por el balance en la estimulación de diferentes receptores de superficie. Así, las células NK expresan receptores tanto activadores (aNKRs) como inhibitorios (iNKRs), siendo ambos tipos codificados en la línea germinal. Los receptores inhibitorios reconocen moléculas clásicas y no clásicas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), impidiendo la activación de la célula NK cuando se encuentran unidos a su ligando. En células NK humanas se han descrito dos familias de receptores inhibitorios específicos para MHC-I, NKG2A y KIRs. En el caso de células NK murinas se agrega una tercera familia, Ly49. Por otro lado, los receptores activadores pueden reconocer ligandos presentes solo en células tumorales o infectadas por virus, promoviendo la activación de las células NK. Los aNKRS están compuestos principalmente por DNAM-1(CD226), NKG2D y la familia de receptores naturales de citotoxicidad (NCRs) (Barrow et al., 2019). En humanos, dentro de este último grupo se encuentran los receptores de transmembrana NKp44 y NKp30, de manera similar a lo mencionado antes, en células NK murinas se añade a este grupo el receptor activador NKp46 (Abel et al., 2018; Smyth et al., 2005).

Se ha reportado que, tras ser activadas, las células T y las células NK aumentan tempranamente la expresión de CD69. Esta es una lectina de tipo C, que actúa como molécula coestimuladora y es capaz de modular la citotoxicidad de las NK así como también inducir la expresión de CD25 (Borrego et al., 1999). CD25 por su lado

corresponde a la cadena alfa del receptor de IL-2 y su expresión es más tardía en comparación a la de CD69, así mismo las células NK CD25+ presentarían una mayor capacidad proliferativa (Clausen et al., 2003).

### **3.3 Células NK en el nicho tumoral**

Como se mencionó anteriormente, las células NK cumplen una función importante en el control de las células neoplásicas, debido a su capacidad de detectar la disminución en la expresión de moléculas MHC-I, un mecanismo de escape inmunológico ampliamente utilizado por las células tumorales frente al posible reconocimiento y eliminación por linfocitos T citotóxicos (CD8+) (Chiossone et al., 2018). De esta forma, las células NK ayudan a prevenir la aparición de tumores espontáneos y el desarrollo de metástasis. Aún con las características antes mencionadas, se ha observado que solo un porcentaje pequeño de células NK son capaces de infiltrar los tumores sólidos, la mayoría de las células NK que llegan al sitio del tumor se ubican en el tejido circundante a este, sin poder contactar directamente las células tumorales para eliminarlas. Se presume que esto se debe en gran medida al ambiente inmunosupresor que se produce en el nicho tumoral, destacando la hipoxia y la presencia de metabolitos inmunosupresores en altas concentraciones, como es la adenosina extracelular (Russick et al., 2020).

### **3.4 Puntos de control inmune en células NK**

Se ha descrito que cuando las células T se exponen de forma crónica a su antígeno, éstas entran en un estado de agotamiento, donde ven disminuida su funcionalidad y cambian su fenotipo, aumentando la expresión de ciertas moléculas inhibitorias definidas como puntos de control inmune (Kallies et al., 2020). Un proceso similar se ha descrito para las células NK, las cuales entran a un estado disfuncional luego de ser

constantemente expuestas al ambiente tumoral, viendo limitada su capacidad de respuesta antitumoral (Bi & Tian, 2017). Algunos puntos de control inmune que se ha descrito que pueden expresarse en las células NK son: PD-1 (molécula de muerte programada 1) y su ligando PD-L1 (Beldi-Ferchiou et al., 2016), TIGIT (inmunoreceptor de células T con dominios Ig e ITIM), CD96 (Chan et al., 2014), TIM-3 (inmunoglobulina de células T y dominio de mucina 3) (Cao et al., 2020), LAG-3 (gen 3 de activación de linfocitos) y las enzimas del eje purinérgico CD39 y CD73 (Allard et al., 2017).

### **3.5 Señalización Purinérgica**

Cuando se producen lesiones o hay inflamación dentro de un tejido, las células dañadas o estresadas liberan ATP al medio extracelular (eATP). Esta molécula es una potente señal proinflamatoria y actúa de forma paracrina y autocrina a través de la familia de receptores P2, siendo especialmente importante en el contexto del cáncer el receptor P2X7, descrito como un inductor de apoptosis (Campos-Contreras et al., 2020). Una vez en el medio extracelular, a fin de mantener la homeostasis, el ATP es hidrolizado por las ectonucleotidasas CD39 y CD73. En primer lugar, CD39 (NTPDase-1) cataliza el paso desde eATP a AMP y luego CD73 (ecto-5-nucleotidasa) hidroliza el AMP en adenosina.

Como se mencionó previamente, la adenosina al contrario del ATP ejerce un potente efecto inmunosupresor, reprimiendo la actividad y activación de las células inmunes. La adenosina señala por medio de la familia de receptores P1, dentro de la cual se encuentran los receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>, todos ellos acoplados a proteínas G. En particular A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> promueven la acumulación de cAMP lo que está asociado a una profunda inmunosupresión (Moesta et al., 2020). El balance y la regulación entre las señales producidas por el ATP y la adenosina permiten mantener la homeostasis en los

tejidos, donde las concentraciones de ambos metabolitos en condiciones fisiológicas normales se encuentran en el orden nanomolar. Por otro lado, en condiciones patológicas como el cáncer, este balance se ve alterado, existiendo amplia evidencia del aumento en la concentración de adenosina (del orden micromolar) dentro de microambiente tumoral impulsado por la sobreexpresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 que la sintetizan tanto las células tumorales como las células inmunes (Chambers & Matosevic, 2019).

Por medio del uso de ratones deficientes de  $A_{2A}R$  se ha descubierto que la señalización por adenosina a través de este receptor ( $A_{2A}$ ) limita la maduración de las células NK y disminuye su capacidad antitumoral *in vivo* (Young et al., 2018). Además, otros estudios revelan que la adenosina también afecta la capacidad citotóxica y la producción de citoquinas por las células NK activadas (Raskovalova et al., 2006).

### **3.6 Efecto de CD73 en las células NK**

Debido a que CD73 cataliza el paso determinante en la producción final de adenosina y la relación de esta molécula con la inmunosupresión, la comprensión de los efectos que la enzima CD73 tiene sobre las células inmunes se ha vuelto de suma importancia, proponiéndose además su uso como blanco de inmunoterapias. Dentro de las primeras aproximaciones que se hicieron para dilucidar el rol de CD73, se demostró que los ratones *knock out* del gen *NT5E* que codifica para CD73, presentan una inmunidad antitumoral incrementada (Stagg et al., 2011) y son resistentes a la carcinogénesis, de manera dependiente del IFN- $\gamma$ , de las células NK y de los linfocitos T CD8+ (Stagg et al., 2012). Por otro lado, se ha visto que *NT5E* es sobre expresado en una amplia variedad de tipos de cáncer y está asociado a peores resultados clínicos (Yang et al., 2021).



Se ha descrito tanto para humanos como para ratones, que en condiciones homeostáticas las células NK en sangre periférica no expresan CD73. Pero por otro lado, se ha visto que bajo ciertas condiciones patológicas las NK pueden adquirir su expresión (Chambers & Matosevic, 2019). De esta forma, estudios recientes reportan que, en los linfocitos NK infiltrantes de tumor se induce la expresión de CD73 y que a su vez un mayor porcentaje de células NK CD73+ se correlaciona con tumores de mayor tamaño en cáncer de mama (Neo et al., 2020). Además, se registró que estas células NK CD73+ presentaban mayor expresión de múltiples puntos de control inmune y sufrían una reprogramación transcripcional por medio del factor de transcripción STAT3, induciendo la producción de IL-10, pudiendo suprimir la proliferación de linfocitos T CD4 (Neo et al., 2020). En este trabajo se mostró que el aumento de CD73 en la superficie de las NK, estaba mediado por el transporte de CD73 a la superficie, tras el reconocimiento 4-1BBL en las células tumorales. Por otro lado, un trabajo reciente plantea que las células NK son bastante resistentes a inducir la expresión de CD73, pero pueden llegar a expresar la ectonucleotidasa en su superficie cuando estas son expuestas a células cancerosas positivas para CD73, proceso que se acrecienta en condiciones de hipoxia (Chambers et al., 2022). Además, los autores señalan que *in vitro* las células NK humanas CD73+ presentan una hiperfuncionalidad en comparación con las células NK CD73-, proponiendo que CD73 podría tener funciones contrapuestas en la activación de las células NK.

### **3.7 Expansión de las células NK *in vitro***

Debido a que las células NK son una población más bien minoritaria dentro de los linfocitos circulantes, surge la necesidad de poder expandirlas, a fin de lograr un número de células suficiente para poder estudiarlas. De esta forma está muy bien caracterizado

en la literatura que las citoquinas que poseen un receptor con la cadena gama común, como son la interleuquina IL-2, IL-7 e IL-15 cumplen un rol esencial en el desarrollo y mantención de las NK. Además, se ha demostrado que algunas citoquinas proinflamatorias como IL-12 y IL-18 también promueven la activación de las células NK (Abel et al., 2018). En particular de todas las citoquinas mencionadas, la IL-15 ha mostrado ser crucial para el desarrollo de las NK, así como también para su mantención y sobrevivencia en la periferia (Ranson et al., 2003). Además, recientemente, se ha utilizado IL-15 para expandir células NK de ratones CAST (modelo susceptible a infecciones virales por Orthopoxvirus debido a una respuesta innata insuficiente) tanto *in vivo* como *in vitro*, demostrando la capacidad de la IL-15 de inducir proliferación en las NK. Asimismo, la expansión de las células NK (número de células obtenidas al día 5) es dependiente de la dosis de IL-15 en un rango de concentraciones de 0-50 nM (Earl et al., 2020). Finalmente debido a la capacidad de la IL-15 de activar las células NK y mejorar sus efectos antitumorales, se plantea su utilización en tratamientos contra el cáncer como potenciador de las células NK (Ma et al., 2022).

Todos estos antecedentes sugieren que CD73 tiene un rol en el fenotipo e influye en la funcionalidad de las células NK, lo que podría ser determinante para una mejor respuesta antitumoral. Por esto en el presente trabajo se evaluó como esta ectonucleotidasa podría afectar el fenotipo y función de las células NK expandidas *in vitro* con IL-15, por medio del uso de un modelo de ratón deficiente para CD73 (*knock out* del gen NT5E).

## **4. Hipótesis y Objetivos**

### **4.1 Hipotesis**

La ectonucleotidasa CD73 afecta en el fenotipo efector y reduce la capacidad de producir citoquinas de las células NK.

### **4.2 Objetivo General**

Estudiar el efecto de CD73 en el fenotipo y producción de citoquinas de células NK murinas expandidas *in vitro*.

### **4.3 Objetivos Específicos**

1. Estandarizar un protocolo de expansión *in vitro* de células NK murinas.
2. Evaluar el papel de CD73 en la activación de las células NK en cultivo.
3. Analizar la influencia de CD73 sobre receptores activadores, inhibitorios y puntos de control inmune en las células NK expandidas *in vitro*.
4. Determinar el efecto de CD73 en la producción y secreción de citoquinas de las células NK *in vitro*.

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **5.1 Animales**

Se utilizaron ratones *knockout* para CD73 (B6.129S1-Nt5etm1Lft/J) y ratones silvestres de la cepa C57BL/6 (CD45.2+) adquiridos desde Jackson Laboratory. Los ratones se mantuvieron en el bioterio de la Fundación Ciencia & Vida con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas, temperatura de 20-26 °C, agua y alimento *ad libitum*. Los ratones utilizados fueron machos de entre 6 y 12 semanas de edad. Todo el trabajo con animales se llevó a cabo siguiendo las regulaciones institucionales de la Fundación Ciencia & Vida y la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

### **5.2 Enriquecimiento de células NK**

Las células NK se enriquecieron a partir de bazo de ratones silvestres C57BL/6 (WT) o CD73 KO. Los bazos extraídos del animal se perfundieron con 10mL de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS). Posteriormente se centrifugaron las células a 600 g por 7 minutos a 4°C, se resuspendieron con 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC, Biolegend) y se incubaron por 5 minutos en hielo. Luego, se les agregaron 8mL de RPMI+10%FBS para lavar y las células se centrifugaron 600 g por 7 minutos a 4°C. Finalmente, las células se resuspendieron en un volumen final de 5 mL de RPMI+10%FBS, desde donde se tomó una alícuota para contar en el hematocitómetro (cámara de Neubauer con tinción de azul de tripán). Las células NK se enriquecieron mediante selección negativa con nanobeads utilizando el kit MojoSort™ Mouse NK Cell Isolation Kit (Biolegend, n° cat.: 480050). Para esto, 150 millones de células de la suspensión celular obtenida anteriormente se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en buffer MACS (Verseno +

2% FBS 500µL por cada  $100 \times 10^6$  células) y se incubó con un mix de anticuerpos acoplados a biotina en una proporción de 15µL/test (15 µL de mix de anticuerpo por cada  $100 \times 10^6$  células) durante 15 minutos a 4°C. Posterior a la incubación, la suspensión celular se incubó con perlas magnéticas de estreptavidina (15 µL por cada  $100 \times 10^6$  células) durante 15 minutos a 4°C. Al término del tiempo, las células se lavaron con 3 mL de buffer MACS y la suspensión se llevó al separador magnético (DynaL MPC™-1, Invitrogen) para retener la fracción marcada magnéticamente. Se recuperó la fracción negativa que contiene las células NK y esta se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, para resuspenderlas en un volumen adecuado para poder contar las células en una cámara de Neubauer al microscopio. El porcentaje de células NK obtenido se evaluó mediante citometría de flujo en base a la expresión de NK1.1 como se describe más adelante. El porcentaje de células NK aisladas por MojoSort siempre fluctuó entre un 60-70%.

### **5.3 Cultivo de Células NK**

Las células NK enriquecidas, se cultivaron en placas de 12 pocillos de fondo plano (Nest) a una concentración de  $10^6$  cel/mL y un volumen de 1mL/pozo, en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS, 1% aminoácidos no esenciales (Gibco n° cat 11140), 1% Buffer HEPES (Gibco n° cat 15630-080) y 0,1% β-mercaptoetanol (Gibco n° cat 21985-023) más IL-15 7nM o 14 nM (Biolegend n° cat 566302). Las células sembradas se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurridos dos días de cultivo se retiró cuidadosamente la mitad del medio (500µL) y se agregó el mismo volumen de medio fresco suplementado como se indica más arriba con IL-15 7nM o 14 nM según corresponda. Desde el día 4 en adelante el contenido de cada pocillo fue diariamente resuspendido y dividido en dos pocillos (tomando 500 µL y transfiriéndolos a otro pocillo),

finalmente luego de la separación de los pocillos a cada uno de los pocillos resultantes se les agregó medio fresco con IL-15 (7nM o 14 nM) (500 µL) para alcanzar un volumen final de 1 mL, esto se repitió hasta el día 7 de cultivo.

#### **5.4 Tinción para citometría de flujo**

Para analizar las poblaciones celulares a través de citometría de flujo (FACS) se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para antígenos de interés ya sean de superficie o intracelulares (Tabla 1). Para la tinción superficial, las suspensiones celulares se incubaron durante 30 minutos a 4°C en oscuridad con una mezcla de anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos y con anticuerpos contra CD16/CD32 (bloqueo Fc, Biolegend) en presencia de un colorante de viabilidad (Fixable Viability Dye eFluor 780, eBiosciencias). A continuación, las células se lavaron con 1 mL de PBS + 2% de FBS, se centrifugaron a 600 g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% de FBS para el análisis FACS.

Para evaluar la producción de citoquinas y granzima B por parte de las células NK generadas *in vitro*, estas células se cosecharon al día 7 de cultivo y se activaron. Para esto,  $1 \times 10^6$  de células NK se incubaron durante 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en 1 mL de medio RPMI+10% FBS con PMA 0,25 µM (Sigma-Aldrich) y 1 µg/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich) en presencia de 1µL/mL de GolgiPlug (BD Biosciences). Finalizada la incubación, las células se tiñeron con anticuerpos contra marcadores de la superficie celular y luego se procedió con el marcaje intracelular. Para esto, las células se resuspendieron en 200 µL de una solución de fijación/permeabilización (tampón de fijación y permeabilización del factor de transcripción Foxp3, eBioscience) durante 45 minutos a 4°C en la oscuridad. Las células se lavaron con un tampón de

permeabilización (tampón del factor de transcripción Foxp3, eBioscience) y se centrifugaron a 700 g durante 7 minutos a 4°C. A continuación, las células se incubaron con anticuerpos contra IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  y granzima B diluido en el mismo tampón durante 30 minutos a 4C en la oscuridad. Tras la tinción intracelular, las células se lavaron con el tampón de permeabilización, se centrifugaron a 700 g durante 7 minutos a 4C y se resuspendieron en PBS+ 2% FBS para ser analizadas por FACS.

Las células marcadas se analizaron en un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Bioscience) o en un *cell sorter* usado como analizador (FACSriaIII, BD Biosciences).

Para la medición de la producción de citoquinas por las células NK,  $1 \times 10^6$  células se incubaron en RPMI+10%FBS con PMA 0,25  $\mu$ M y Ionomicina 1 $\mu$ g/mL por 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Al cabo de la incubación, las células se centrifugaron a 600 g por 5 minutos y se colectaron los sobrenadantes. Estos sobrenadantes se almacenaron a -80°C para luego ser utilizados para cuantificar la cantidad de citoquinas secretadas por las células por medio de CBA (Cytometric Bead Array). Las citoquinas IL-2, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-6 e IL-10 se cuantificaron mediante CBA (Cytometric Bead Array, kit Th1/Th2/Th17, BD Biosciences) según indica el fabricante con modificaciones menores.

**Tabla 1.** Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Marca	Fluoroforo	Clon	Dilucion
CD226	Biologend	PE-Dazzle	10E5	1/200
CD25	Biologend	APC	PC61	1/400
CD3	Biologend	Brillan Violet 711	17A2	1/200
CD39	eBioscience	PE	24DMS1	1/200
CD39	Biologend	PE-Dazzle	Duha59	1/200
CD69	Biologend	PE	H1.2 F3	1/100
CD96	Biologend	PE	3.3	1/400
CD16/CD32 Fc-Block	Biologend	Purificado	93	1/400
GzmB	Biologend	Alexa Fluor 647	GB11	1/200
IFN- $\gamma$	Biologend	FITC	XMG1.2	1/400
IL-2	eBioscience	PE-CY7	JES6-5H4	1/200
KLRG1	Biologend	Brillan Violet 605	2F1/KLRG1	1/800
LAG-3	Biologend	PE-Cy7	C9B7W	1/100
NK1.1	Biologend	FITC	PK136	1/800
NK1.1	Biologend	Brillan Violet 785	pk136	1/100
NKG2D	Biologend	APC	CX5	1/200
NKp46	Biologend	Brillan Violet 421	29A1.4	1/100
PD1	Biologend	PE-Cy5	29F.1A12	1/200
TIGIT	Biologend	Brillan Violet 421	VSIG9	1/100
TIM3	Biologend	Brillan Violet 785	RMT3-23	1/100
TNF- $\alpha$	Biologend	Brillan Violet 421	MP6-XT22	1/100

### 5.5 Recuento celular por citometría de flujo

Para determinar el número absoluto de células NK al final del periodo de cultivo, se utilizaron perlas de conteo (*Precision Count Beads*, Biologed n°cat 424902) añadiendo a un determinado volumen de suspensión celular extraída del cultivo (200 $\mu$ L) un volumen fijo de perlas de conteo (20 $\mu$ L) con una concentración conocida (1x10<sup>6</sup> partículas/mL, *beads input* = 20.000 perlas), además se agregó una mezcla de anticuerpos contra NK1.1 y CD3 para poder identificar las células NK y finalmente se añadió yoduro de propidio para determinar viabilidad (1  $\mu$ L solución 10 mg/ml). La mezcla fue analizada en un *cell sorter* usado como analizador (FACSriaIII, BD Biosciences). El número de



células NK presente en el volumen de suspensión celular trabajado, se calculó mediante la siguiente fórmula  $\frac{\text{Beads input} \times \text{Células NK adquiridas}}{\text{Beads adquiridas}}$ . Todos los cultivos se realizaron por triplicado.

## 5.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa Graph Pad Prism v8.01 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los datos entre ratones controles y CD73 KO se analizaron de a pares con un t-test no pareado tras la verificación, mediante la prueba Shapiro-Wilk de que siguieran una distribución gaussiana normal. Cuando los datos no seguían una distribución normal, se utilizó un t-test no paramétrico de Mann-Whitney de dos colas. Todos los análisis se realizaron con un intervalo de confianza del 95%.

## 6. Resultados

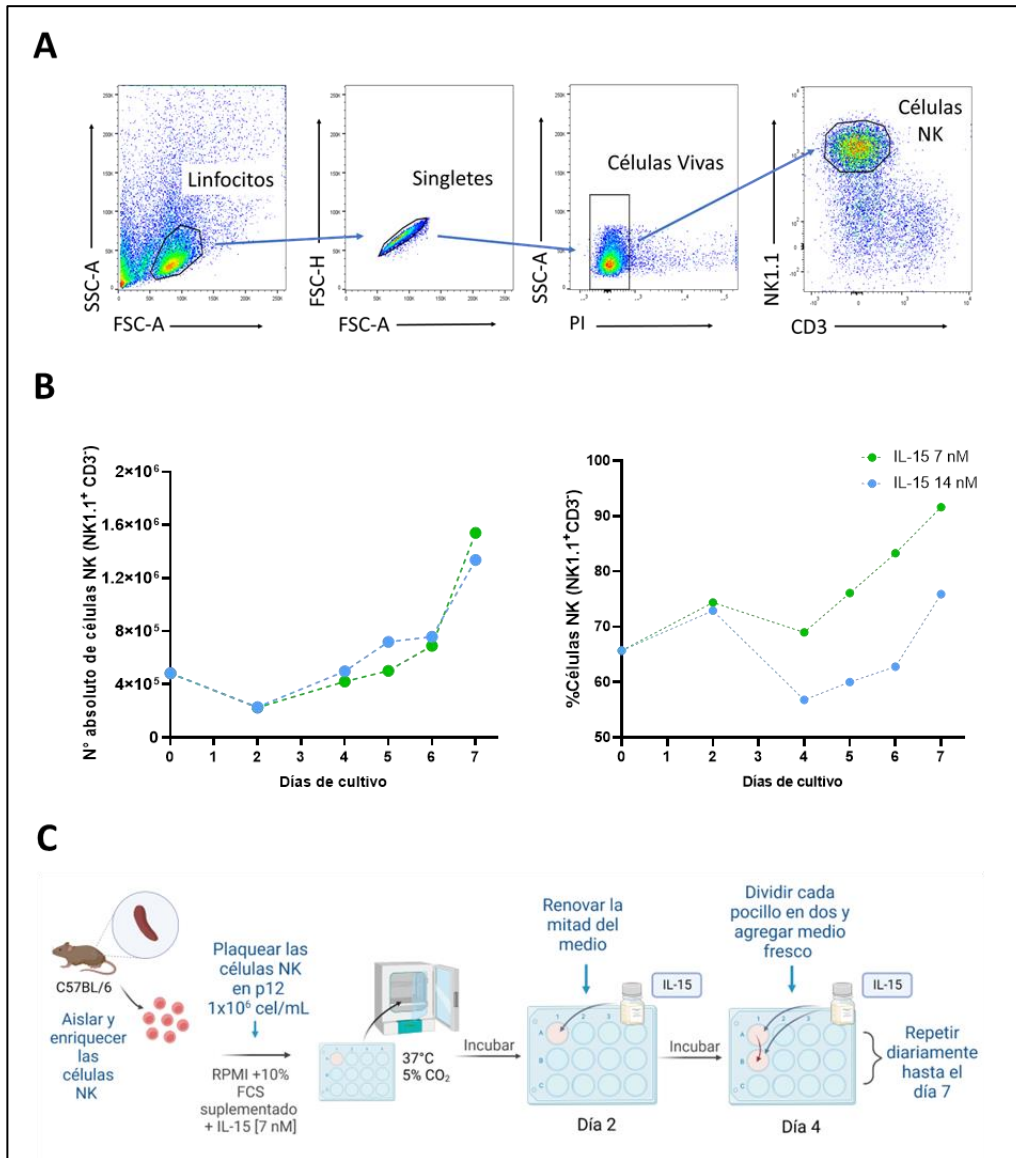
### 6.1 Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* de células NK murinas.

Debido a la baja cantidad de células NK presentes en el bazo, alrededor del 2-4% y pensando en su uso para transferencia adoptiva en futuros análisis, se estandarizó un protocolo para cultivar y expandir estas células *in vitro*. Como se mencionó previamente en los métodos, las células NK se enriquecieron y se analizó su porcentaje de pureza mediante citometría de flujo, identificándolas por medio de los marcadores de superficie NK1.1<sup>+</sup> y CD3<sup>-</sup>, tal como muestra la figura 1A. Los porcentajes de NK obtenidos fluctuaban entre un 60 y un 70%, quedando remanentes de células T (CD3<sup>+</sup>).

A continuación, y en base a los antecedentes presentes en la literatura se evaluó el potencial de expansión con IL-15 en dos concentraciones diferentes. Las células NK ya enriquecidas previamente se cultivaron en placas de 12 pocillos añadiendo al medio de cultivo IL-15 a una concentración de 7nM o 14nM. A través del análisis y recuento de las células por citometría de flujo, se determinó que ambas concentraciones de IL-15 permiten la expansión de células NK en el tiempo. La concentración de 7nM promueve la expansión de las NK y favorece el enriquecimiento de las células NK, obteniéndose al finalizar el cultivo (día 7) un mayor porcentaje de células NK que a la concentración de 14 nM de IL-15, es decir una mayor pureza del cultivo (Figura 1B).

Habiendo determinado que la concentración óptima de IL-15 a utilizar en el cultivo es de 7nM, se estableció definitivamente el protocolo de cultivo de la figura 1C, en el cual las células NK enriquecidas se siembran a una concentración de 10<sup>6</sup> cel/mL, en medio suplementado más IL-15 7nM, transcurridos dos días de incubación se les renueva cuidadosamente la mitad del medio y se dejan incubar dos días más, al cuarto día el contenido de cada pocillo se separa en 2 pocillos y se les agrega medio fresco con IL-

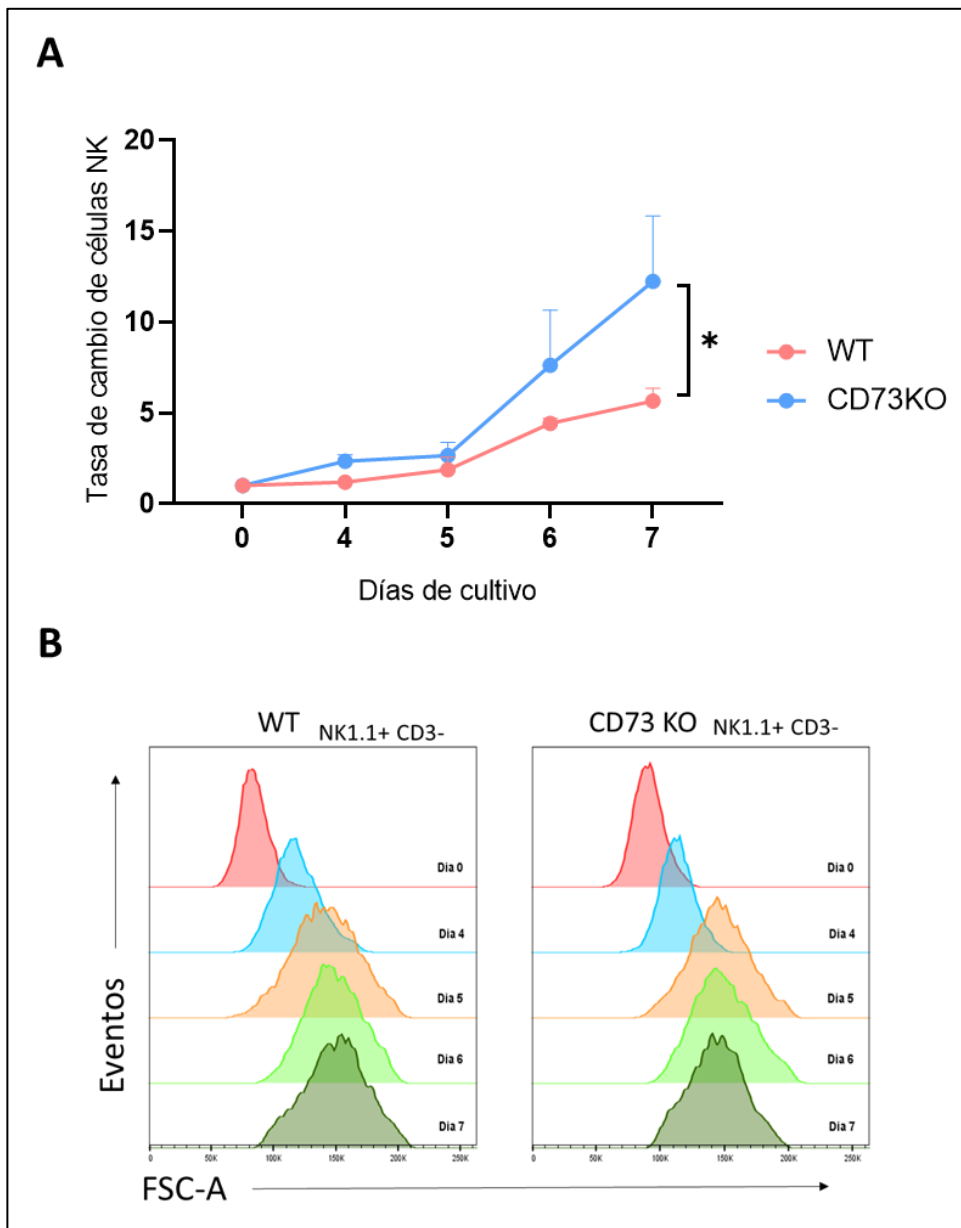
15 7nM para dejar las células nuevamente incubando y repetir este último proceso por los siguientes días de cultivo (para mayores detalles consultar en la sección de materiales y métodos).



**Figura 1. Estrategia de cultivo de células NK.** Las células NK fueron enriquecidas mediante Mojosort a partir de esplenocitos de un ratón C57BL/6 (A) Estrategia de selección de las células NK analizadas mediante citometrías de flujo, utilizando el software FlowJO, identificando las células NK como aquellas que son CD3<sup>-</sup> y NK1.1<sup>+</sup>. (B) Número absoluto y porcentaje de células NK WT cultivadas utilizando IL-15 [7 nM] o [14 nM] (n=1, 1 experimento independiente). (C) Protocolo de cultivos de células NK con IL-15, esquema creado con BioRender.com.

Para evaluar si las células NK provenientes de ratones CD73 KO se expandían en las mismas condiciones de cultivo que las células WT, se cultivaron ambos tipos de células en paralelo, siguiendo el protocolo de la figura 1C. Los cultivos mostraron que efectivamente las células NK CD73 KO proliferan bajo la estimulación con IL-15 7nM y particularmente presentan una mayor expansión que las células NK WT, alcanzándose un mayor número de células tras 7 días de cultivo (Figura 2A). Cabe destacar que el mayor cambio en la expansión de las células NK, tanto WT como CD73 KO se produce entre los días 5 y 7 de cultivo.

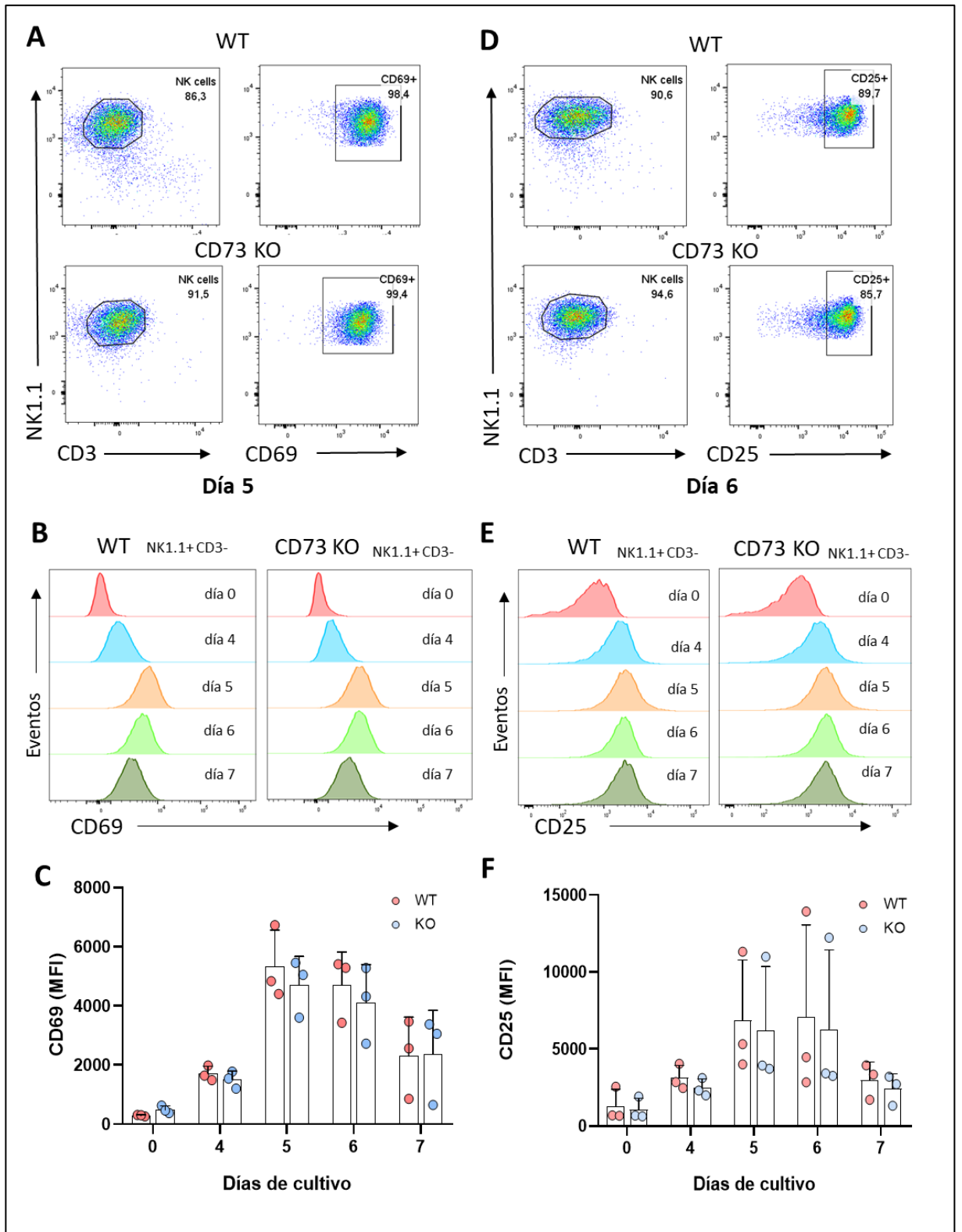
Asociado a la expansión celular existe un aumento considerable en el tamaño de las células NK en cultivo, evidenciado por citometría de flujo a través del parámetro FSC-A (Área de la señal de dispersión frontal) (Figura 2B), siendo el día 5 el punto en el cual las células presentan un mayor tamaño. Esto sugiere que las células NK se están activando durante el cultivo.



**Figura 2. Cinética de expansión de células NK WT y CD73 KO en cultivo primario.** Se enriquecieron y se cultivaron células NK tanto WT como CD73 KO con el protocolo de la figura 1 C **(A)** Tasa de expansión de células NK WT y CD73 KO, tasa calculada con el número absoluto de células en el cultivo y respecto al día 0 de cultivo **(B)** Histogramas representativos del área de la señal de dispersión frontal (FSC-A) a través de los días de cultivo de células NK WT y CD73 KO (t-test no pareado \*  $p < 0.05$ ,  $n = 3$ ; 3 experimentos independientes).

## **6.2 Expresión de marcadores clásicos de activación en los cultivos de células NK WT y CD73 KO.**

Como se menciona previamente, evidencias en la literatura muestran que la IL-15, además de promover la proliferación de las células NK también genera que estas entren en un estado de activación, por lo cual se evaluaron mediante citometría de flujo dos marcadores clásicos de activación, CD69 y CD25. En la figura 3 se muestra que el marcador CD69 se regula positivamente al transcurrir los días de cultivo sin presentarse diferencias entre WT y CD73 KO, particularmente al día cinco de cultivo, alrededor del 99% de las células expresan CD69 en su superficie (Figura 3A), siendo este el punto donde la intensidad de fluorescencia media alcanza su máximo, para disminuir posteriormente (Figura 3B y C). Para la expresión de CD25 se puede visualizar algo similar a lo que ocurre con CD69 existiendo un máximo de fluorescencia entre los días 5 y 6 (Figura 3 D, E y F).

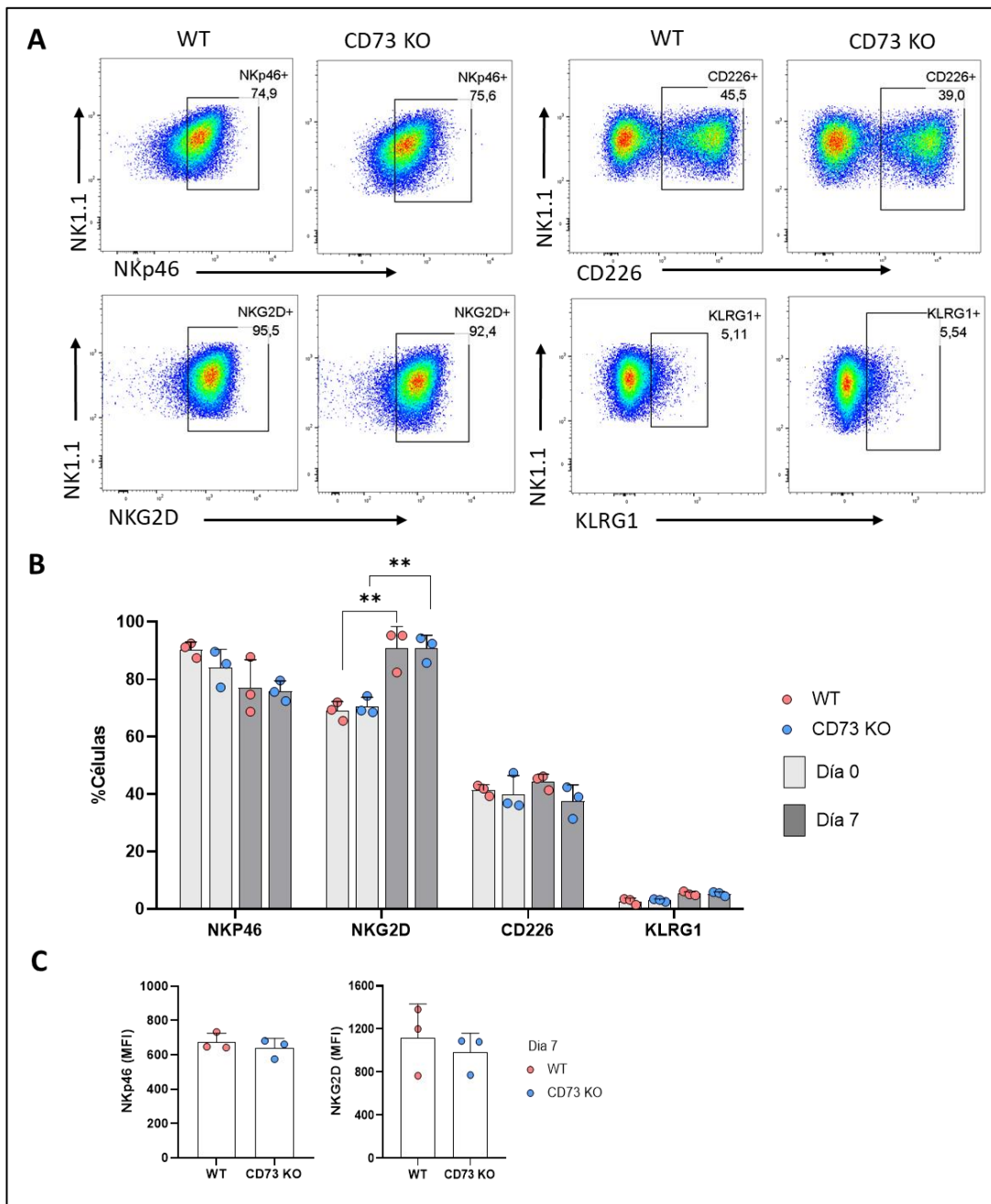


**Figura 3.- Los marcadores de activación CD69 y CD25 se inducen en células NK en cultivo.** Se cultivaron células NK WT y CD73 KO y se analizaron los marcadores de activación CD69 y CD25 a los días 0, 4, 5, 6 y 7 de cultivo **(A)** Gráficos de citometría en pseudocolor representativos para el marcador CD69 al día 5 de cultivo *in vitro* con 7nM de IL-15, en células WT o CD73 KO. **(B)** Histogramas representativo de la intensidad media de fluorescencia de CD69 a través de los días de cultivo de células NK WT y CD73 KO **(C)** Grafico de barras de la intensidad media de florescencia para CD69 a través de los días de cultivo en las células NK WT o CD73 KO. **(D)** Gráficos de citometría en pseudocolor representativos para el marcador CD25 al día 6 de cultivo *in vitro* con IL-15 7nM, en células WT o CD73 KO. **(E)** Histogramas representativo de la intensidad media de fluorescencia para CD25 a través de los días de cultivo de células NK WT y CD73 KO **(F)** Grafico de barras de la intensidad media de florescencia para CD25 a través de los días de cultivo en las células NK WT o CD73 KO (n=3; 2 experimentos independientes).

### **6.3 Análisis de receptores de activación e inhibición y puntos de control inmune en las células NK WT y CD73 KO expandidas *in vitro*.**

A continuación, y con el fin de caracterizar de mejor forma el fenotipo de las células NK en cultivo con IL-15, se evaluó la expresión de cuatro receptores de superficie capaces de modular la activación de las células NK: tres receptores activadores NKp46, NKG2D y CD226 y un receptor inhibitorio KLRG1 (Figura 4A). Los datos muestran que tras siete días de cultivo con IL-15, la expresión de los receptores NKp46, CD226 y KLRG1 no muestra cambios significativos respecto a su estado inicial, en cambio, NKG2D sí se ve afectado, regulándose positivamente su expresión. Por otro lado, la presencia o ausencia de CD73 no genera diferencias significativas en el porcentaje de expresión de ninguno de los receptores, ya sea activador o inhibitorio (Figura 4B), ni tampoco afecta en los niveles de expresión de los receptores activadores NKp46 y NKG2D (Figura 4C)

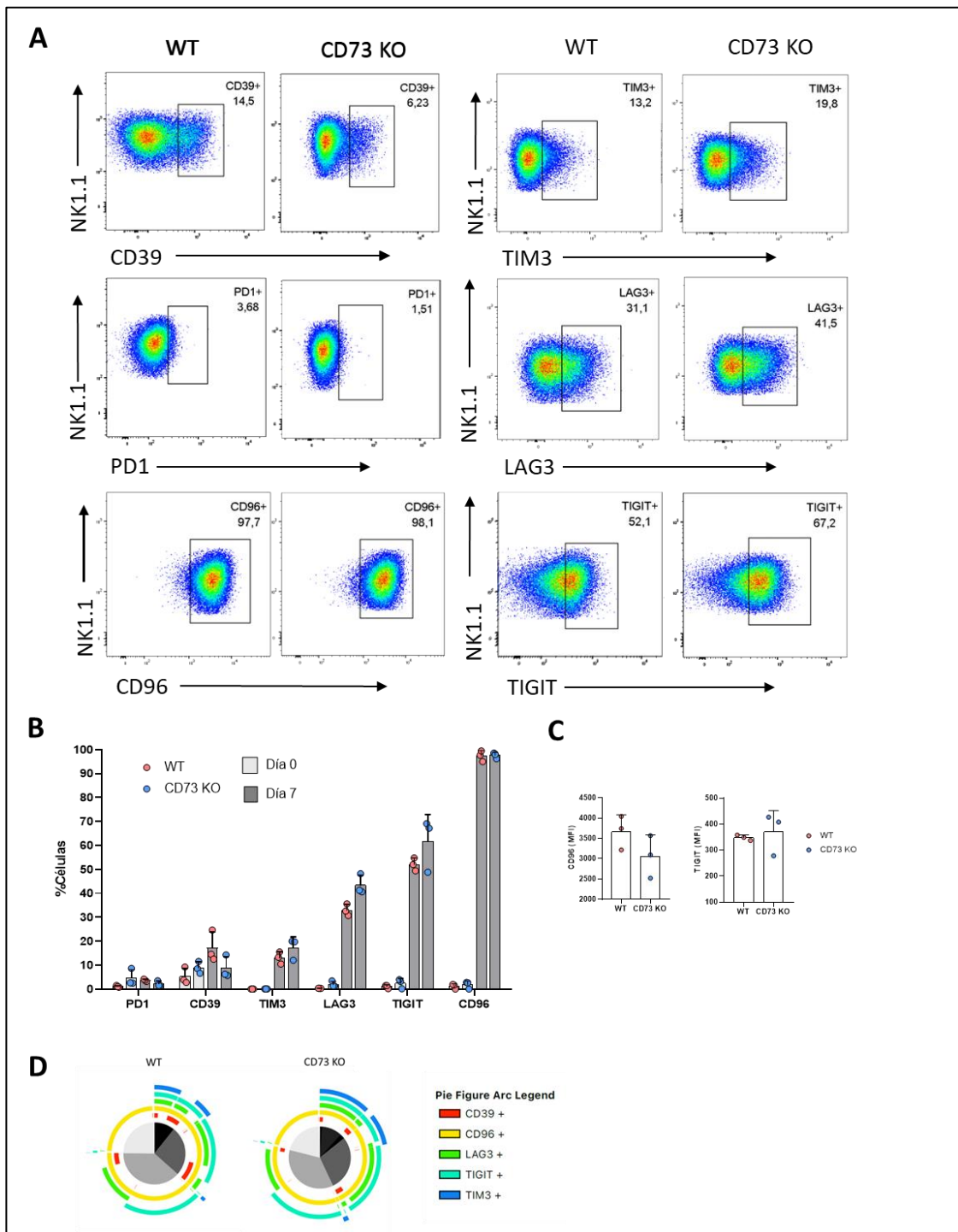




**Figura 4.- CD73 no influye en la expresión de receptores activadores o inhibitorios.**

Se cultivaron células NK WT y CD73 KO durante 7 días y se analizaron receptores activadores e inhibitorios **(A)** Gráficos de citometría en pseudocolor representativos para los receptores NKp46, NKG2D, CD226 y KLRG1 en células WT o CD73 KO. **(B)** Porcentaje de células NK WT o CD73 KO positivas para NKp46, NKG2D, CD226 y KLRG1 al día 0 y 7 de cultivo (t-test no pareado \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ) **(C)** Grafico de barras de la intensidad media de fluorescencia para NKp46 y NKG2D al día 7 de cultivo en las células NK WT o CD73 KO (n=3; 2 experimentos independientes).

Como se mencionó anteriormente, en la literatura se ha visto que una activación persistente de las células inmunes puede generar que éstas entren en estados de agotamiento, donde además de tener una menor funcionalidad, las células comienzan a expresar ciertos marcadores asociados a este estado hiporresponsivo, denominados puntos de control inmune. De esta forma, se analizó si el cultivo con IL-15 por siete días, además de activar las células NK, genera la expresión de puntos de control inmune y si la ausencia de CD73 influye de alguna forma en esa respuesta. Mediante citometría de flujo se determinó el porcentaje de células NK que expresan los siguientes marcadores: CD39, LAG3, TIGIT, TIM3, PD1 y CD96 tanto al inicio (día 0) como al finalizar el cultivo (día 7). La figura 5 muestra que hay una inducción de la expresión de CD39, LAG3, TIGIT, TIM3 y CD96 al día 7, no así de PD1 (figura 5 A). Al comparar ambos días en la figura 5B y 5C, se aprecia que los mayores cambios ocurren en la expresión de CD96, TIGIT, LAG3 y TIM3, donde TIGIT y LAG3 muestran una tendencia de mayor expresión en las células CD73 KO, lo contrario ocurre con CD39, donde solo las células WT aumentan su expresión respecto al día 0 y no así las células CD73 KO. La figura 5D muestra mediante un gráfico de torta con arcos, como es la expresión de los diversos puntos de control inmune, identificando poblaciones que expresan 1 punto de control (gris claro), 2 puntos de control inmune (gris medio), 3 puntos de control inmune (gris oscuro) y 4 o más puntos de control inmune (negro), además los arcos identifican particularmente cual es el punto de control expresado. De esta forma se puede apreciar que las células que expresan solo un marcador son principalmente CD96+, mientras que las que expresan 2 marcadores suman la expresión de TIGIT, LAG-3 o CD39. Finalmente, cabe destacar que la expresión de TIM3 está limitada a las células que expresan más de 3 marcadores.



**Figura 5. Células NK cultivadas *in vitro* inducen la expresión de puntos de control inmune.** Se cultivaron células NK WT y CD73 KO durante 7 días y se analizó puntos de control inmune el último día **(A)** Gráficos de citometría en pseudocolor representativos para los marcadores CD39, LAG3, TIGIT, TIM3, PD1 y CD96 en células WT o CD73 KO al día 7. **(B)** Porcentaje de células NK WT o CD73 KO positivas para CD39, LAG3, TIGIT,

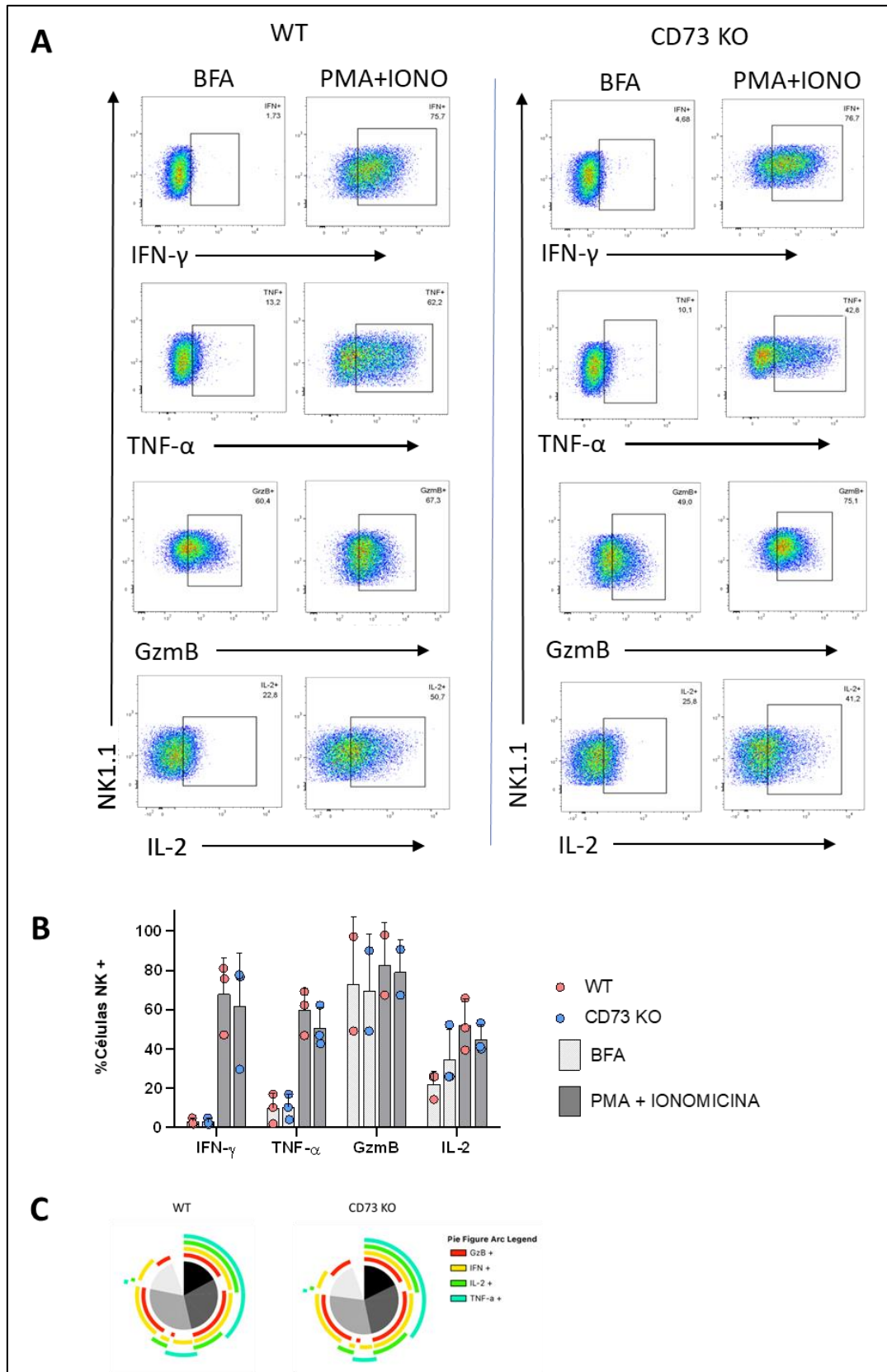
TIM3, PD1 y CD96 al día 0 y 7 de cultivo. **(C)** Gráfico de barras de la intensidad media de fluorescencia para CD96 y TIGIT al día 7 de cultivo en las células NK WT o CD73 KO. **(D)** Gráfico de torta y arcos que muestra las proporciones de células que expresan diferentes combinaciones de puntos de control inmunitarios y el número de puntos expresados simultáneamente (1 punto = gris claro, 2 puntos = gris medio, 3 puntos = gris oscuro, 4 o más puntos = negro; n=3; 2 experimentos independientes).

### **6.3 Determinar el perfil de producción y secreción de citoquinas de las células NK**

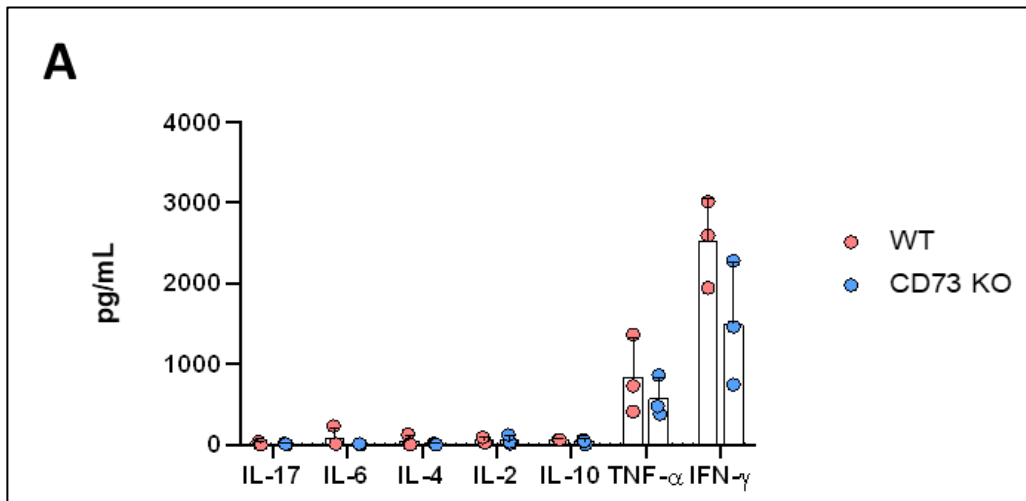
#### **WT y CD73 KO expandidas *in vitro*.**

Para finalizar con la caracterización de las células NK, se evaluaron algunos parámetros de funcionalidad luego de siete días de cultivo, a través de la producción y secreción de citoquinas tras ser activadas con PMA y Ionomicina en presencia de GolgiStop (Brefeldina). La figura 6A y 6B muestran que, tras ser activadas, un gran porcentaje (~60%) tanto de las células NK provenientes de ratones WT como las deficientes de CD73 producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Igualmente, pero en menor medida, se induce producción de IL-2. Por otro lado, se aprecia que estas células están produciendo Granzima B de manera basal, es decir, previo a la activación con PMA-Ionomicina. La figura 6C muestra la combinatoria de expresión de citoquinas que presentan las células WT y CD73 KO, donde no existen diferencias en el porcentaje de células que expresan 1, 2, 3 o 4 citoquinas.

Por último, se analizaron mediante CBA, las citoquinas existentes en los sobrenadantes de las células NK activadas con PMA y ionomicina y no activadas. La figura 7C evidencia que las células NK secretan solo IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mientras IL-2 no fue detectada en el sobrenadante.



**Figura 6.- Células NK cultivadas *in vitro* con IL-15 producen citoquinas luego de la activación con PMA más Ionomicina. (A)** Gráficos de citometría en pseudocolor representativos para las citoquinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 y GzmB tras 7 días de cultivo luego de ser tratadas con PMA más Ionomicina o con brefeldina (BFA) como control **(B)** Porcentaje de células NK WT o CD73 KO que resultaron ser positivas para la producción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 y GzmB tras 7 días de cultivo luego de ser tratadas con PMA más Ionomicina o con brefeldina (BFA) como control (n=3; 2 experimentos independientes; excepto para Granzima B n=2; 1 experimento independiente). **(C)** Gráfico de torta y arcos que muestra las proporciones de células que producen diferentes combinaciones de citoquinas y granzima B, así como el número de citoquinas expresadas (1 citoquina=gris claro, 2 citoquinas= gris medio, 3 citoquinas= gris oscuro. 4 citoquinas= negro; n=3; 2 experimentos independientes; excepto para Granzima B n=2; 1 experimento independiente)



**Figura 7.- Células NK cultivadas *in vitro* con IL-15 secretan citoquinas luego de la activación con PMA más Ionomicina (A)** Cantidad de citoquinas secretadas por las células NK WT o CD73 KO medidas en pg/mL(n=3; 2 experimentos independientes).

## Discusión

### 1. Estandarización de un protocolo de cultivo *in vitro* de células NK murinas.

La utilización de una interleuquina pleiotrópica como lo es la IL-15, provoca la expansión de células NK murinas, aumentando considerablemente el número de células disponibles para poder llevar a cabo experimentos, lo que a su vez amplía el rango de análisis que se pueden realizar, ya que la cantidad de células no resulto ser una limitante. Además, la gran pureza que se obtiene en los cultivos entrega confiabilidad a los análisis pues no hay otras poblaciones celulares que puedan interferir o ejercer algún efecto extra sobre las NK. Con relación a lo anterior, la misma pleiotropía de la IL-15 podría explicar que el uso de una menor concentración 7nM favorezca la pureza del cultivo de células, ya que, con una concentración alta de la interleuquina, es factible que los remanentes de otras células presentes al inicio del cultivo también se activen y proliferen aun sin la presencia de otros estímulos.

La tendencia de las células CD73 KO a mayor expansión fue bastante notoria, pues tras iniciar ambos cultivos (WT y CD73 KO) con el mismo número de células, al finalizarlos, las células CD73 KO al menos doblaban el número de células WT. Esto podría deberse al estado de maduración con el cual parten las células en los cultivos, pues antecedentes del laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile muestran que las células NK de ratones deficientes de CD73, presentan estadios más inmaduros en el bazo a comparación con las células de ratones WT. Existiendo en el bazo de los ratones CD73 KO, un mayor porcentaje de células NK dobles negativas (CD27-CD11b-) y CD27+CD11b-. Así mismo está documentado que

en estados más inmaduros las células NK presentan una mayor tasa de proliferación que cuando están más terminalmente maduras (Chiossone et al., 2009).

Otro aspecto a considerar respecto a la mayor proliferación de las NK CD73 KO, es que CD73 se ha propuesto como un punto de control que afecta el estado metabólico las células (Briceño et al., 2021; Chambers & Matosevic, 2019).

## 2. Expresión de marcadores clásicos de activación en los cultivos de NK WT y CD73 KO.

De forma coincidente con lo que se encuentra en la literatura las células NK tanto WT como CD73 KO indujeron la expresión de CD69 y CD25 en su superficie al ser cultivadas con IL-15, de forma que las células estarían pasando por un notable estado de activación. Aunque para el caso de este trabajo, al contrario de lo descrito en la literatura, no hubo un desfase temporal notorio entre ambos marcadores de activación (Clausen et al., 2003) y más bien se expresaron de forma simultánea, en un porcentaje mayor al 80% de las células, con su máximo de intensidad de fluorescencia en los días 5 y 6 (figura 3). Así mismo este margen temporal donde las células parecieran estar más activadas, en base a la expresión de CD69 y CD25, también coincide con el punto temporal dentro de los días de cultivo, donde se produce un aumento bastante explosivo en la tasa de expansión de las células y además donde las células también alcanzan su mayor tamaño en base al parámetro de área de dispersión frontal (figura 2). De esta forma todo indica que las células se están activando y eso a la vez impulsa su proliferación.

## 3. Receptores de activación e inhibición y puntos de control inmune en las células NK WT y CD73 KO en cultivo.



Para las células NK y su activación, lo más importante es el balance entre el enganche de sus receptores activadores y las señales inhibitorias que puede recibir por medio de receptores de inhibición. A pesar de no encontrar un efecto de CD73 sobre los receptores aquí estudiados, lo más apreciable del análisis de los receptores de activación de las células NK que pasaron los 7 días de estimulación, es que no presentan una disminución significativa en su expresión (NKp46), manteniéndose en los niveles iniciales (CD226) o incluso aumentando (NKG2D) respecto al día 0. De esta forma es altamente probable que estas células al ser expuestas a una célula tumoral por ejemplo puedan responder correctamente, reconociendo los ligandos de sus receptores activadores. Para el caso de KLRG1, un receptor inhibitorio que además está asociado a la maduración de las NK, su baja expresión iría de la mano a lo descrito antes, pues las evidencias aportan que las células NK maduras KLRG1+ presentan una tasa de recambio *in vivo* más lenta en comparación a su contraparte KLRG1- y además presentan una respuesta proliferativa reducida frente a la estimulación con IL-15 (Huntington et al., 2007). Estos resultados obtenidos de cultivos *in vitro* diferirían de lo que se observa *in vivo*, donde una estimulación persistente con el complejo IL-15/IL-15R $\alpha$  genera aumento en las células maduras KLRG1+ que presentan alteraciones funcionales (Elpek et al., 2010).

Por otro lado, a pesar de que las células NK mantienen sus receptores activadores altamente expresados al día 7, se determinó que el cultivo prolongado con IL-15 induce de forma indistinta en las células WT y CD73 KO, la expresión de puntos de control inmune como CD96, TIM-3 y TIGIT, de forma significativa respecto al inicio del cultivo. CD39 por su lado tiende a inducirse solo en las WT, mientras TIM-3 presenta la tendencia contraria mientras que PD1 no aumenta su expresión (Figura 5).

Particularmente el alto porcentaje de células que expresan CD96 (~100%) y TIGIT (~50-70%) es preocupante pensando en que ambas moléculas inhibitorias compiten por el ligando con el receptor activador CD226 (Chan et al., 2014) y en un contexto de encuentro con las células tumorales, este escenario podría inclinar la balanza hacia la inhibición de la célula NK. Lo que ocurre con CD39 es especialmente interesante pues esta enzima al igual que CD73 es parte del eje purinérgico por lo que están estrechamente relacionadas. Recientemente se ha descrito un importante rol inmunosupresor de CD39 sobre las células NK, analizado en distintos modelos de metástasis mediante la utilización de POM1 un inhibidor de CD39. El efecto antimetastático de POM1 se veía completamente atenuado en ratones depletados de células NK y además los ratones deficientes de CD39 presentaron una reducción drástica en el desarrollo de metástasis experimental, de manera dependiente de las células NK y el IFN- $\gamma$  (Zhang et al., 2019). De esta forma la mayor resistencia que pueden tener las células CD73 KO a la expresión de CD39, representaría un beneficio para su actividad antitumoral al momento de ser transferidas al tumor.

4. Perfil de producción y secreción de citoquinas de las células NK WT y CD73 KO en cultivo.

Finalmente, este trabajo abordó el aspecto funcional de las células NK producidas en cultivo y se apreció que a pesar de la alta expresión de puntos de control, tanto las células control como las deficientes de CD73 siguen funcionales, existiendo un alto porcentaje de células capaces de producir IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2 tras ser activadas con PMA más ionomicina, además tienen un pool basal de granzima B, que indicaría que su capacidad citotóxica no se encuentra comprometida. Si bien en este trabajo no se puede hacer una comparación respecto a lo que ocurre con las células al día 0, el ensayo de

secreción de citoquinas muestra lo que clásicamente se describe respecto a estos linfocitos, que son principalmente secretores de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Además, al comparar con un trabajo de la literatura donde se hace una estimulación transitoria con IL-15 *in vivo* las células NK, aquí se obtienen porcentajes similares, tanto de IFN- $\gamma$  como de TNF- $\alpha$  (Elpek et al., 2010). Ahora bien, no está demás mencionar que el escenario observado podría llegar a cambiar al exponer las células NK a células tumorales o directamente al TME donde los receptores de punto de control inmune podrían encontrar sus ligandos.

## 5. Proyecciones

De los resultados aquí presentados surgen ciertas interrogantes respecto de lo que estaría ocurriendo con el fenotipo y la funcionalidad de las células NK CD73KO generadas *in vitro*. Para discernir que es lo que provoca el mayor número de células CD73KO en los cultivos, en el laboratorio se realizaron experimentos de proliferación celular utilizando una tinción con *cell trace violet*, para determinar si efectivamente las células deficientes de CD73 presentan una mayor tasa de proliferación. Definiéndose a través de este experimento, que efectivamente las células deficientes de CD73 presentan una mayor tasa de proliferación en comparación a las provenientes del WT. Por otro lado, para establecer si el mayor número de células CD73KO en los cultivos esta influido por cambios en la sobrevida de las células NK, se realizaran experimentos de sobrevida celular con un protocolo clásico de anexina V y PI. Además, sería relevante realizar co-cultivos de las células NK expandidas con el protocolo aquí presentado con diversas líneas celulares tumorales, para poder analizar qué es lo que pasa con las células NK una vez que entran en contacto con los ligandos presentes en la superficie de las células cancerígenas a fin de establecer de mejor forma potencial citotóxico.

Asimismo, resulta interesante realizar ensayos transferencia adoptiva de las células NK a ratones portadores de tumores para determinar su funcionalidad y capacidad citotóxica *in vivo*.

Por otra parte, en base a los resultados obtenidos se propone utilizar las células NK con menos días de cultivo, por ejemplo, al día 5, cuando las células tienen el mayor tamaño y la mayor expresión de marcadores de activación, sin ser un despropósito analizar qué es lo que ocurre en este punto con los puntos de control inmune, ya que es predecible que su expresión en las células sea menor.

Además de las interrogantes antes mencionadas, cabe destacar que, al disponer de este protocolo de cultivo optimizado, ahora en el laboratorio se pueden obtener de manera eficiente un gran número de células NK, las que además se encuentran con un alto grado de pureza al finalizar el cultivo, gracias a la optimización de la concentración de IL-15 que se realizó en el presente seminario. Así mismo el mayor potencial de expansión de las células CD73 KO significaría una ventaja al momento de realizar futuros experimentos, ya que a partir de los esplenocitos de un animal CD73 KO se obtendrían al menos el doble de células NK para trabajar que de un animal WT, pudiéndose así reducir el número de animales a utilizar. Finalmente, contar con las condiciones basales óptimas para el cultivo de células NK, permitirá realizar futuros estudios *in vitro* en *post* de generar células NK con características particulares y/o ventajosas, por ejemplo, variando las fuentes de carbono disponibles en el cultivo para reprogramar metabólicamente a las células y así en base a su estado metabólico dirigir su funcionalidad.

## Conclusiones

Por medio de la puesta a punto de un método de cultivo para las células NK murinas se estableció que la IL-15 induce la expansión y activación de las células NK WT y CD73 KO, produciendo una mayor expansión en las células deficientes de CD73. Por otro lado, CD73 no influye en la activación de las células NK, así como tampoco en la expresión de receptores activadores o inhibitorios.

El cultivo de siete días con IL-15 induce en las células NK la expresión de puntos de control inmune, sin un efecto significativo de CD73 en este proceso. Aun así las células son capaces de producir y secretar citoquinas al activarse con PMA y ionomicina.

De esta forma con los datos presentados respecto al fenotipo y la producción de citoquinas de las células NK expandidas *in vitro* y el rol que puede tener la ectonucleotidasa CD73, se puede concluir que la ectonucleotidasa CD73 restringe el potencial de expansión de las células NK, pero su ausencia no afecta el fenotipo o la producción de citoquinas de las células NK.

## Bibliografía

- Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S., & Malarkannan, S. (2018). Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology*, 9(AUG), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01869>
- Allard, B., Longhi, M. S., Robson, S. C., & Stagg, J. (2017). The ectonucleotidases CD39 and CD73: Novel checkpoint inhibitor targets. *Immunological Reviews*, 276(1), 121–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12528>
- Barrow, A. D., Martin, C. J., & Colonna, M. (2019). The natural cytotoxicity receptors in health and disease. *Frontiers in Immunology*, 10(MAY), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00909>
- Beldi-Ferchiou, A., Lambert, M., Dogniaux, S., Vély, F., Vivier, E., Olive, D., Dupuy, S., Lévassieur, F., Zucman, D., Lebbé, C., Sène, D., Hivroz, C., & Caillat-Zucman, S. (2016). PD-1 mediates functional exhaustion of activated NK cells in patients with Kaposi sarcoma. *Oncotarget*, 7(45), 72961–72977. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12150>
- Bi, J., & Tian, Z. (2017). NK cell exhaustion. *Frontiers in Immunology*, 8(JUN). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00760>
- Borrego, F., Robertson, M. J., Ritz, J., Peña, J., & Solana, R. (1999). CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology*, 97(1), 159–165. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2567.1999.00738.x>
- Briceño, P., Rivas-Yañez, E., Roseblatt, M. V., Parra-Tello, B., Farías, P., Vargas, L., Simon, V., Cárdenas, C., Lladser, A., Salazar-Onfray, F., Elorza, A. A., Roseblatt, M., Bono, M. R., & Sauma, D. (2021). CD73 Ectonucleotidase Restrains CD8+ T Cell Metabolic Fitness and Anti-tumoral Activity. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.638037>
- Campos-Contreras, A. D. R., Díaz-Muñoz, M., & Vázquez-Cuevas, F. G. (2020). Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells*, 9(7), 1–24. <https://doi.org/10.3390/cells9071612>
- Cao, Y., Wang, X., Jin, T., Tian, Y., Dai, C., Widarma, C., Song, R., & Xu, F. (2020). Immune checkpoint molecules in natural killer cells as potential targets for cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00348-8>
- Chambers, A. M., & Matosevic, S. (2019). Immunometabolic Dysfunction of Natural Killer Cells Mediated by the Hypoxia-CD73 Axis in Solid Tumors. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6(July), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00060>
- Chambers, A. M., Wang, J., Dao, T. N., Lupo, K. B., Veenhuis, P., Ayers, M. G., Slivova, V., Cohen-Gadol, A. A., & Matosevic, S. (2022). Functional expression of CD73 on human natural killer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 71(12), 3043–3056. <https://doi.org/10.1007/s00262-022-03219-z>
- Chan, C. J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M. T., Town, L., Ritchie, D. S., Colonna, M., Andrews, D. M., & Smyth, M. J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nature Immunology*, 15(5), 431–438. <https://doi.org/10.1038/ni.2850>
- Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., & Walzer, T. (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*, 113(22), 5488–5496. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-10-187179>
- Chiossone, L., Dumas, P. Y., Vienne, M., & Vivier, E. (2018). Natural killer cells and other

- innate lymphoid cells in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 18(11), 671–688. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0061-z>
- Clausen, J., Vergeiner, B., Enk, M., Petzer, A. L., Gastl, G., & Gunsilius, E. (2003). Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology*, 207(2), 85–93. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00219>
- Earl, P. L., Americo, J. L., & Moss, B. (2020). Natural killer cells expanded in vivo or ex vivo with IL-15 overcomes the inherent susceptibility of CAST mice to lethal infection with orthopoxviruses. *PLoS Pathogens*, 16(4), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008505>
- Elpek, K. G., Rubinstein, M. P., Bellemare-Pelletier, A., Goldrath, A. W., & Turley, S. J. (2010). Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15R $\alpha$  complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(50), 21647–21652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012128107>
- Huntington, N. D., Tabarias, H., Fairfax, K., Brady, J., Hayakawa, Y., Degli-Esposti, M. A., Smyth, M. J., Tarlinton, D. M., & Nutt, S. L. (2007). NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation. *The Journal of Immunology*, 178(8), 4764–4770. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.8.4764>
- Jiao, Y., Huntington, N. D., Belz, G. T., & Seillet, C. (2016). Type 1 innate lymphoid cell biology: Lessons learnt from natural killer cells. *Frontiers in Immunology*, 7(OCT), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00426>
- Kallies, A., Zehn, D., & Utzschneider, D. T. (2020). Precursor exhausted T cells: key to successful immunotherapy? *Nature Reviews Immunology*, 20(2), 128–136. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0223-7>
- Ma, S., Caligiuri, M. A., & Yu, J. (2022). Harnessing IL-15 signaling to potentiate NK cell-mediated cancer immunotherapy. *Trends in Immunology*, 43(10), 833–847. <https://doi.org/10.1016/j.it.2022.08.004>
- Moesta, A. K., Li, X. Y., & Smyth, M. J. (2020). Targeting CD39 in cancer. *Nature Reviews Immunology*, 20(12), 739–755. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0376-4>
- Neo, S. Y., Yang, Y., Record, J., Ma, R., Chen, X., Chen, Z., Tobin, N. P., Blake, E., Seitz, C., Thomas, R., Wagner, A. K., Andersson, J., De Boniface, J., Bergh, J., Murray, S., Alici, E., Childs, R., Johansson, M., Westerberg, L. S., ... Lundqvist, A. (2020). CD73 immune checkpoint defines regulatory NK cells within the tumor microenvironment. *Journal of Clinical Investigation*, 130(3), 1185–1198. <https://doi.org/10.1172/JCI128895>
- Ranson, T., Vosshenrich, C. A. J., Corcuff, E., Richard, O., Müller, W., & Di Santo, J. P. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*, 101(12), 4887–4893. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-11-3392>
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Jackson, E. K., & Gorelik, E. (2006). Adenosine-mediated inhibition of cytotoxic activity and cytokine production by IL-2/NKp46-activated NK cells: Involvement of protein kinase A isozyme I (PKA I). *Immunologic Research*, 36(1–3), 91–99. <https://doi.org/10.1385/ir:36:1:91>
- Russick, J., Torset, C., Hemery, E., & Cremer, I. (2020). NK cells in the tumor microenvironment: Prognostic and theranostic impact. Recent advances and trends. *Seminars in Immunology*, 48(July), 101407. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2020.101407>
- Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E. A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S. L. H. V., Degli-Esposti, M. A., & Hayakawa, Y. (2005).

- Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular Immunology*, 42(4 SPEC. ISS.), 501–510. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034>
- Stagg, J., Beavis, P. A., Divisekera, U., Liu, M. C. P., Möller, A., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2012). CD73-Deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Research*, 72(9), 2190–2196. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-0420>
- Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M. W. L., Darcy, P. K., & Smyth, M. J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Research*, 71(8), 2892–2900. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4246>
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., & Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. In *Nature Immunology* (Vol. 9, Issue 5, pp. 503–510). <https://doi.org/10.1038/ni1582>
- Yang, H., Yao, F., Davis, P. F., Tan, S. T., & Hall, S. R. R. (2021). CD73, tumor plasticity and immune evasion in solid cancers. *Cancers*, 13(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cancers13020177>
- Young, A., Ngiow, S. F., Gao, Y., Patch, A. M., Barkauskas, D. S., Messaoudene, M., Lin, G., Coudert, J. D., Stannard, K. A., Zitvogel, L., Degli-Esposti, M. A., Vivier, E., Waddell, N., Linden, J., Huntington, N. D., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., & Smyth, M. J. (2018). A2AR adenosine signaling suppresses natural killer cell maturation in the tumor microenvironment. *Cancer Research*, 78(4), 1003–1016. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2826>
- Zhang, H., Vijayan, D., Li, X. Y., Robson, S. C., Geetha, N., Teng, M. W. L., & Smyth, M. J. (2019). The role of NK cells and CD39 in the immunological control of tumor metastases. *Oncotimmunology*, 8(6), 1–11. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1593809>