

UCh-FC
Biotecnología
F363
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

“FUNCIÓN DE LAS ECTONUCLEOTIDASAS CD39 Y CD73 EN LOS LINFOCITOS TH17”

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

Dominique Pamela Fernández Quezada

Directora del Seminario de Título:
Dra. María Rosa Bono

Co-Directora del seminario de Título:
Dra. Daniela Sauma

Junio 2015
Santiago - Chile

ESCUELA DE PREGRADO – FACULTAD DE CIENCIAS – UNIVERSIDAD DE CHILE



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. **Dominique Pamela Fernández Quezada**

“Función de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17”

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

Dr. María Rosa Bono M.
Directora Seminario de Título

Dra. Daniela Sauma M.
Co-directora Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Verónica Palma A.
Presidente Comisión



Dr. Alejandro Roth M.
Evaluador

Santiago de Chile,de Junio de 2015.

Los imposibles de hoy serán posibles mañana.

Konstantin Tsiolkovski.

BIOGRAFÍA



Nací un día miércoles 2 de agosto del año 1989, en la ciudad de Chillán, Chile. Desde pequeña fui muy curiosa y me interesaba saber cómo funcionaban las cosas, experimentaba con plantas y flores, me gustaba desarmar y armar objetos, muchos de los cuales arruiné por completo. Durante mi enseñanza media, en el Liceo de Niñas Marta Brunet de Chillán, participé en talleres de biología y química, los cuales me incentivaron a buscar una carrera ligada al mundo científico. Fue así que decidí estudiar Ingeniería en Biotecnología en la Universidad de Chile, en un lugar alejado de mi hogar, buscando poder aprender de los mejores científicos. Sin duda eso lo conseguí, pero además me permitió conocer a gente maravillosa. En el año 2012 me incorporé al Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias, donde desarrollé mi tesis de pregrado. Fue sin duda en este lugar en donde aprendí no solo a desarrollarme como investigadora, si no que aprendí a superar obstáculos y no darme por vencida cuando las cosas no resultan como uno las planifica. Gracias a todo lo que aprendí en el laboratorio decidí ingresar al programa de Magíster en Ciencias Biológicas, esperando seguir aprendiendo y poder aportar con un granito de arena al mundo del conocimiento.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradezco a mis tutores Daniela Sauma, María Rosa Bono y Mario Roseblatt, por ser mis guías y mi apoyo. Gracias por la confianza depositada en mí y, sobre todo, por ser las personas que me entregaron todas las herramientas necesarias para iniciarme como investigadora. En especial quisiera agradecer a Daniela, por la paciencia, la disposición y por motivarme siempre a dar lo mejor. También agradezco a mi comisión evaluadora por los aportes que permitieron mejorar el presente trabajo.

Agradezco a mi familia por su infinito amor, cariño y comprensión. Gracias a mis padres, por apoyarme todos estos años que he estado lejos de casa. A mis hermanas, por siempre darme cariño y ánimo en los momentos difíciles. A mi tía Angélica y a mi tía Pilar, por cuidarme y preocuparse de mí, por darme un hogar en Santiago y, por sobre todo, por hacerme sentir siempre como si estuviera en casa. A mis sobrinas, por darme su amor incondicional y alegría, a mis abuelitos y a todos mis tíos y tías, por todo el cariño y la preocupación.

A mis queridos biotec, por todos los buenos momentos que viví dentro y fuera de la universidad. Por todas las locuras y momentos de risa. Creo que tuve la fortuna de conocer un grupo de personas maravillosas. En especial agradezco a mí querido amigo Kessi por su apoyo, por animarme y motivarme cuando lo necesitaba.

Especialmente quisiera agradecer a mi amiga Caro, que siempre ha estado conmigo, en las buenas y en las malas, por ser mi apoyo cuando más lo necesitaba. Y por supuesto agradecer a su familia y al Totito, por todo el cariño y la preocupación, por hacerme sentir como una más en su casa.

Quisiera agradecer a toda la gente del laboratorio. A la Pame, Zoila y al Leito, gracias por todo el cariño y la preocupación. A mis compañeras Gabi y Yessia, y aquellas que ya no están, como la Vale, Naty, Conny, Coté y Cami, gracias por la buena onda y el cariño. A Juanjo, que tuvo la paciencia de enseñarme todo. Y por supuesto a mi compañero de equipo, Felipe, gracias por apoyarme y ayudarme siempre, sin ti no podría haber hecho todo este trabajo.

Quisiera agradecer también a las instituciones que financiaron este trabajo: CONICYT (PFB-16), y FONDECYT (11121478 y 1100557).

ÍNDICE

BIOGRAFÍA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1 El Sistema Inmune	5
3.2 Linfocitos Th17.....	7
3.3 Sistema Inmune y Cáncer	8
3.4 Linfocitos Th17 y Cáncer.....	10
3.5 Adenosina e Inmunosupresión en Cáncer: Rol de las Ectonucleotidasas CD39 y CD73.	13
4. HIPÓTESIS	16
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo General	16
5.2 Objetivos Específicos.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
6.1 Ratones	17
6.2 Genotipificación de ratones RORc	17
6.3 Líneas y modelos tumorales.....	18
6.4 Anticuerpos	19
6.5 Citometría de flujo	19
6.6 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y tumor.....	21

6.7 Obtención de células CD4+ a partir de bazo	22
6.8 Generación de células Th17 <i>in vitro</i>	23
6.9 Aislamiento de células Th17.....	25
6.10 Transferencia adoptiva de células Th17 regulatorias o Th17 inflamatorias.....	26
6.11 Ensayo de supresión <i>in vitro</i>	26
6.12 Activación de linfocitos	28
6.13 Análisis de citoquinas en el sobrenadante.....	29
6.14 Análisis estadístico.....	29
7. Resultados	30
7.1 Los linfocitos Th17 están presentes en el tumor.....	30
7.2 Los linfocitos Th17 expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 <i>in vivo</i>	32
7.3 Generación <i>in vitro</i> de linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios	34
7.4 Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios no afectan la proliferación de linfocitos T CD4+ <i>in vitro</i>	37
7.5 Los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios son capaces de retrasar la progresión tumoral en ratones ROR- $\gamma^{\text{t}^{\text{gfp/gfp}}}$	39
7.6 Células Th17 generadas <i>in vitro</i> aumentan o mantienen la expresión de CD39 en el microambiente tumoral.....	41
7.7 Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN- γ en el tumor.....	43
8. Discusión.....	45
9. Resumen de Resultados	53
10. Conclusiones.....	54
11. Bibliografía	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la diferenciación de linfocitos Th17 regulatorios o linfocitos Th17 inflamatorios..... 24

Tabla 2. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la segunda ronda de diferenciación de los linfocitos Th17 regulatorios o linfocitos Th17 inflamatorios..... 25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las células Th17 están presentes en el tumor.	31
Figura 2. Expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en células Th17, Th1 y Treg presentes en órganos de ratones con y sin tumor.	33
Figura 3. Las células Th17 inflamatorias o regulatorias generadas <i>in vitro</i> presentan una expresión diferencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.....	35
Figura 4. Las células Th17 regulatorias o inflamatorias generadas <i>in vitro</i> secretan un patrón diferencial de citoquinas.	36
Figura 5. Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios generados <i>in vitro</i> no afectan la proliferación de linfocitos T CD4+.	38
Figura 6. Curva de crecimiento tumoral en ratones ROR- γ ^{gfp/gfp} inyectados con linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios.....	40
Figura 7. Las células Th17 transferidas a ratones con tumor son capaces de mantener o aumentar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.....	42
Figura 8. Las células Th17 transferidas a ratones con tumor son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN γ en el tumor.	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
ANOVA	Análisis de varianza
APC	Célula presentadora de antígeno
ATP	Adenosín trifosfato
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CCL	Quimioquina con motivo C-C
CCR	Receptor de quimioquina con motivo C-C
CD	Clúster de diferenciación
CXCL	Quimioquina con motivo C-X-C
CXCR	Receptor de quimioquina con motivo C-X-C
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
IFN	Interferón
IL	Interleuquina
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Media</i>
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MDSC	Célula mieloide supresora (<i>Myeloid-derived Supressor Cell</i>)
NK	Células asesinas naturales (<i>Natural Killer</i>)

OVA	Ovoalbúmina
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLN	Linfonodo periférico
ROR	Receptor huérfano relacionado a RAR
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
SFB	Suero fetal bovino
TAMs	Macrófagos asociados al tumor (<i>Tumor-associated macrophages</i>)
TCR	Receptor de linfocito T
TdLN	Linfonodo drenante del tumor
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T " <i>helper</i> "
Tc	Linfocito T citotóxico
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Linfocito T regulador
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

1. RESUMEN

Los linfocitos Th17 tienen un rol patogénico en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Sin embargo, el rol que cumplen durante el desarrollo del cáncer sigue siendo controversial. Las evidencias del rol protumoral de los linfocitos Th17 se basan principalmente en la producción de IL-17 por estas células y en las propiedades angiogénicas de esta citoquina. Evidencias recientes además sugieren que las células Th17 podrían producir adenosina, una molécula inmunosupresora, al hidrolizar el ATP extracelular en un proceso mediado por las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Por otra parte, la evidencia a favor del rol antitumoral de las células Th17 se basa en la capacidad que tienen éstas de producir IFN- γ y de transformarse en células tipo Th1.

Con el objetivo de estudiar la función que cumplen CD39 y CD73 en linfocitos Th17, en este trabajo analizamos la expresión de estas ectonucleotidasas en células Th17 presentes en el microambiente tumoral en un modelo de melanoma murino. Además, generamos células Th17 inflamatorias o regulatorias, que expresan altos y bajos niveles de CD39 y CD73 respectivamente, las que fueron transferidas a ratones con tumor (melanoma) de manera de evaluar el efecto de éstas sobre el crecimiento tumoral.

Acorde a datos previos en la literatura, detectamos la presencia de linfocitos Th17 en el tumor. Al caracterizar a los linfocitos Th17 presentes en el tumor y en otros órganos, observamos que estas células expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73.

Por otra parte, utilizando diferentes condiciones de diferenciación, logramos generar células Th17 con un fenotipo regulatorio o inflamatorio que presentan altos y bajos niveles de expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. La capacidad supresora de estas células se ensayó *in vitro*, observándose que ninguna de las subpoblaciones de células Th17 analizadas logra retrasar la proliferación de células T efectoras. Más aún, tanto los linfocitos Th17 regulatorios como inflamatorios fueron capaces de infiltrar el tumor y adquirir la capacidad de producir IFN- γ , disminuyendo de esta forma el tamaño tumoral. En conclusión, estos resultados demuestran que los linfocitos Th17 poseen un rol antitumoral, expresan CD39 y CD73 en el microambiente tumoral y que la expresión de estas ectonucleotidasas no les confiere una capacidad inmunosupresora a los linfocitos Th17.

2. ABSTRACT

T helper 17 (Th17) lymphocytes play a pathogenic role in a variety of inflammatory and autoimmune diseases. However, their role in cancer is still controversial. Protumoral effects of Th17 cells are based on the production of IL-17 and its angiogenic properties. Moreover, new evidence suggests that Th17 cells are able to hydrolyze ATP to produce adenosine, an immunosuppressive molecule, in a process mediated by CD39 and CD73 ectonucleotidases. On the other hand, evidence of antitumor effects of Th17 cells relies on the ability of these cells to produce IFN- γ and acquire a Th1-like phenotype.

With the purpose of studying the role of Th17 cells in cancer, we characterized CD39 and CD73 expression by Th17 cells and the effect of Th17 cells in tumor microenvironment using a murine melanoma model. First, we analyzed CD39 and CD73 expression by Th17 cells *in vivo*. In addition, we generated inflammatory Th17 or regulatory Th17 cells that express low or high levels of CD39 and CD73 respectively, and then transferred those cells into tumor-bearing mice in order to evaluate tumor growth.

In agreement with previous evidence, we detected an accumulation of Th17 cells within the tumor. When we characterized Th17 cells, we observed that they expressed CD39 and CD73 in the tumor as well as in other organs. However, both *in vitro*-generated regulatory or inflammatory Th17 cells were able to infiltrate the tumor, acquire the capacity to produce IFN- γ and decrease tumor size. In conclusion, Th17

cells play an antitumor role and the expression of CD39 and CD73 by these cells does not correlate with an immunosuppressive phenotype.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 El Sistema Inmune

Las principales funciones del sistema inmune consisten en controlar la homeostasis en los tejidos, ofrecer protección contra los microorganismos patógenos que invaden nuestro cuerpo y eliminar células dañadas y transformadas (Abbas y col., 2008; Visser y col., 2006). El sistema inmune está compuesto por varios tipos celulares, las cuales forman redes complejas y dinámicas que aseguran una protección contra los patógenos, mientras que simultáneamente se encargan de mantener la tolerancia contra antígenos propios (Visser y col., 2006).

El sistema inmune se clasifica en sistema inmune innato y sistema inmune adaptable, aunque estas dos ramas del sistema inmune forman un solo conjunto (Kapsenberg, 2003). El sistema inmune innato aporta la primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos. Está constituido por barreras físicas, como la piel, y células con capacidad fagocítica, como neutrófilos y macrófagos y son estas mismas células las encargadas de efectuar la fase final de la respuesta inmune adaptable (Akira y col., 2006; Abbas y col., 2008). Por otra parte, el sistema inmune adaptable provee de memoria inmunológica contra infecciones (Janeway & Medzhitov, 2002) y está involucrado directa o indirectamente en la eliminación de patógenos en fases tardías de la infección (Akira y col., 2006). Además, la respuesta inmune adaptable está involucrada en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, alergias y en el rechazo de trasplantes (Janeway & Medzhitov, 2002).

Los linfocitos T CD4+, o T *helper* (Th), tienen una participación clave en la respuesta inmune adaptable ya que promueven la producción de anticuerpos por los linfocitos B y orquestan la función de los linfocitos T CD8+ y macrófagos contra una gran variedad de microorganismos patógenos (Zhu y col., 2010).

Luego de la activación por células presentadoras de antígenos profesionales (APC), los linfocitos T CD4+ se diferencian hacia células efectoras, las que se clasifican en base a la función y el patrón de citoquinas que secretan (Cosmi y col., 2014). Tradicionalmente los linfocitos T CD4+ fueron clasificados en dos tipos, los denominados linfocitos Th1 y Th2 (Mosmann & Coffman, 1989). Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar IFN- γ , TNF- α y linfotóxina, moléculas esenciales en la erradicación de patógenos intracelulares y en la respuesta antitumoral (Dong, 2006). Por otra parte, los linfocitos Th2 secretan interleuquina-4 (IL-4), IL-5 e IL-13, citoquinas que tienen un rol crucial en la eliminación de patógenos extracelulares y en la producción y cambio de clase de las inmunoglobulinas (Dong, 2006).

En 1995 se describió otro tipo de linfocito T CD4+, los linfocitos T reguladores (Treg) (Sakaguchi y col., 1995). Los linfocitos Treg tienen un rol fundamental controlando la respuesta inmune, previniendo enfermedades autoinmunes e inflamatorias crónicas, además de limitar la respuesta antitumoral (Vignali y col., 2008). Los linfocitos Treg suprimen la activación y función efectora de otras células del sistema inmune, a través de mecanismos que dependen del contacto celular, la producción de TGF- β e IL-10 y la generación de adenosina (Vignali y col., 2008; Kim, 2010).

Por muchos años el paradigma Th1/Th2, descrito por Mosmann y Coffman (Mosmann & Coffman, 1989), ayudó a explicar la mayoría de los fenómenos relacionados con la respuesta inmune adaptable. Sin embargo, en 2005 se describió un nuevo tipo de linfocito T CD4+ caracterizado por la producción de IL-17A (IL-17), el cual se denominó linfocito Th17 (Harrington y col., 2005; Park y col., 2005).

3.2 Linfocitos Th17

Los linfocitos Th17, caracterizados principalmente por la secreción de IL-17, cumplen un rol fundamental en la respuesta contra infecciones producidas por hongos y bacterias extracelulares en las mucosas (tracto digestivo, vías respiratorias, piel) (Ouyang y col., 2008; Khader y col., 2009). Además de secretar IL-17, los linfocitos Th17 son capaces de secretar IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, y potencialmente TNF- α e IL-6 (Korn y col., 2009).

La diferenciación de un linfocito T CD4+ virgen hacia un fenotipo Th17 se produce debido a la acción conjunta de dos citoquinas: TGF- β e IL-6. Ambas citoquinas son capaces de inducir la expresión del factor de transcripción maestro ROR- γ t (Zhou y col., 2007), el cual se une al promotor del gen que codifica para la IL-17, induciendo su expresión (Maddur y col., 2012). La IL-6 además induce la activación del factor de transcripción STAT3 (Korn y col., 2009), el cual aumenta los niveles de expresión de ROR- γ t (Maddur y col., 2012).

Por otra parte, la IL-6 induce la expresión de IL-21 y del receptor de IL-23 (IL-23R) (Zhou y col., 2007). La IL-21 actúa como señal autocrina, amplificando el número de linfocitos Th17 (Miossec y col., 2009; Zhou y col., 2007). La IL-23, secretada por células presentadoras de antígenos, permite la estabilización y completa diferenciación de los linfocitos Th17, aumentando la producción de IL-17 e induciendo la expresión de citoquinas inflamatorias (GM-CSF, IL-22) y suprimiendo la producción de IL-10 e IFN- γ (Korn y col., 2009; Miossec y col., 2009; El-Behi y col., 2011).

3.3 Sistema Inmune y Cáncer

Una célula tumoral se define en base a la adquisición de ciertas capacidades que le permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse. Estas características incluyen: aumento de la capacidad proliferativa, mutaciones en genes supresores de tumores, resistencia a la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, capacidad de inducir la angiogénesis y adquirir un potencial invasivo y metastásico (Hanahan & Weinberg, 2011). Sin embargo, la biología del tumor no puede entenderse sólo por la enumeración de las características de las células cancerosas, sino que además debe incluirse la contribución del microambiente tumoral en la carcinogénesis (Hanahan & Weinberg, 2011), debido a que la interacción entre células tumorales y el estroma asociado representa una relación poderosa que influye en el inicio y progresión tumoral (Joyce & Pollard, 2009).

Hace tiempo se reconoce que existe una estrecha relación entre el sistema inmune y el cáncer. Por un lado, respuestas inflamatorias crónicas e infecciones han sido asociadas a varios tipos de cáncer, como por ejemplo: cáncer hepático y

pancreático asociados al abuso de alcohol, cáncer de colon asociado a enfermedad inflamatoria intestinal, carcinoma gástrico luego de infección por *Helicobacter pylori* y cáncer hepático debido a hepatitis crónica (Lin & Karin, 2007). La inflamación podría tener un rol prominente en el inicio de la transformación neoplásica, aumentando la tasa de daño al ADN e incrementando la inestabilidad genómica (Elinav y col., 2013), debido por ejemplo al aumento de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno liberadas por neutrófilos y macrófagos (Mantovani y col., 2008).

Por otra parte, mediante la presentación de antígenos tumorales, el sistema inmune es capaz de reconocer y destruir células tumorales, en un proceso denominado "inmunovigilancia" (Schreiber y col., 2011). Sin embargo, esto conlleva a la selección de las células menos inmunogénicas, proceso denominado inmunoección, lo que permite la propagación y formación de nuevos tumores capaces de evadir al sistema inmune (Schreiber y col., 2011; Quail & Joyce, 2013).

Existen evidencias que indican que las células del sistema inmune son capaces de infiltrar los tumores y destruir a las células cancerígenas (Hanahan & Weinberg, 2011). Los linfocitos Th1 y linfocitos T CD8+ citotóxicos (Tc1) secretan IFN- γ , una citoquina que aumenta el procesamiento de antígenos e induce la presentación de péptidos en las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II en las APC (Lakshmi-Narendra y col., 2013). Además, mediante la expresión de moléculas efectoras, como granzima B y perforina, pueden inducir en forma directa la lisis de las células tumorales (Lakshmi-Narendra y col., 2013).

A pesar que las primeras observaciones le asignaron al sistema inmune un papel en la eliminación de tumores, actualmente se sabe que existen algunas células del sistema inmune que podrían favorecer al desarrollo tumoral. Entre estas células se encuentran los linfocitos Tregs, las células mieloides supresoras (MDSC) y los macrófagos asociados al tumor (TAMs). Los linfocitos Treg se acumulan en el tumor y suprimen directamente la actividad antitumoral de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ citotóxicos, vía secreción de IL-10 y TGF- β (Yu y col., 2005). Por otra parte, las MDSC y TAMs son capaces de regular la respuesta antitumoral mediante la supresión de la actividad citotóxica de los linfocitos T, la inhibición de células dendríticas, NK y linfocitos B (Egeblad y col., 2010). Mediante la expresión de las enzimas arginasa-1 y óxido nítrico sintetasa (NOS2), los TAMs y MDSC son capaces de depletar el medio del aminoácido L-arginina, lo que inhibe la activación de los linfocitos T (Dolcetti y col., 2008). Además, tanto MDSC como TAMs son capaces de promover el desarrollo tumoral, la angiogénesis y metástasis mediante la secreción de citoquinas como IL-6, TNF e IL-1 β (Egeblad y col., 2010; Zamarron & Chen, 2011).

3.4 Linfocitos Th17 y Cáncer

Debido a las características inflamatorias de los linfocitos Th17, se ha estudiado y determinado que estos cumplen un rol patogénico en diversas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Por ejemplo, en psoriasis se ha detectado que en los linfocitos T aislados desde las lesiones en la piel predomina el fenotipo Th17, y en artritis reumatoide y esclerosis múltiple se han detectado altos niveles de IL-17 en las heridas y suero de pacientes enfermos (Korn y col., 2009).

Recientemente, numerosos estudios se han realizado para determinar si los linfocitos Th17 tienen una actividad antitumoral o protumoral. Estudios en pacientes con melanoma, hepatocarcinoma, cáncer de colon y cáncer de mama, muestran que existe un aumento en el número de linfocitos Th17 que infiltran el tumor (Su y col., 2010; Kuang y col., 2010). En pacientes con cáncer gástrico se ha observado un incremento en el número de linfocitos Th17, tanto en sangre como en el linfonodo drenante del tumor, lo cual se correlaciona con estadios clínicos avanzados de la enfermedad (Zhang y col., 2008; Iida y col., 2011). En pacientes con cáncer de colon, una mayor infiltración de linfocitos Th17 se correlaciona con un peor diagnóstico de la enfermedad (De Simone y col., 2013). Por el contrario, un estudio realizado en pacientes de cáncer de próstata demostró que el número de linfocitos Th17 que infiltran al tumor se correlacionan negativamente con la Escala de Gleason (escala para determinar el grado de agresividad del cáncer), lo que implicaría que los linfocitos Th17 tienen un efecto antitumoral en este tipo de cáncer (Sfanos y col., 2008). Similar a lo que ocurre en humanos, se ha detectado un aumento en el número de linfocitos Th17 en la sangre, médula ósea, bazo y principalmente en el tumor, en modelos murinos de cáncer de próstata, fibrosarcoma, melanoma, etc. (Kryczek y col., 2007).

Los linfocitos Th17 constituyen una población pequeña dentro del microambiente tumoral, pero aun así se encuentran presentes en una proporción mayor respecto a otras células inmunes (Wilke y col., 2011). El porcentaje de linfocitos Th17 en el tumor (0-20%) se correlaciona positivamente con el porcentaje de linfocitos Th1 (20-60%), Tc1 (20-80%) y NK (0-6%) (Kryczek y col., 2009). Sin embargo, existe una correlación inversa entre el porcentaje de linfocitos Th17 (0-20%) y Treg (5-40%) (Kryczek y col., 2009), lo que explicaría el número limitado de linfocitos Th17 en el

tumor. Se ha descrito que en el tumor los linfocitos Treg suprimirían a los linfocitos Th17, lo que constituiría otro mecanismo del tumor para evadir al sistema inmune (Kryczek y col., 2009).

La función antitumoral de los linfocitos Th17 no se ha relacionado con una capacidad de destruir directamente a las células tumorales sino más bien con la capacidad de reclutar células inmunes efectoras (Zou & Restifo, 2010; Nuñez y col., 2013). Se ha reportado que los linfocitos Th17, incluidos los que infiltran el tumor, no expresan granzima B o perforina (Kryczek y col., 2009). Sin embargo, la IL-17 junto con el IFN- γ producido por los linfocitos Th1 actúan en forma sinérgica, induciendo la expresión de las quimioquinas CXCL9 y CXCL10 en células tumorales y macrófagos, las cuales promueven la migración de linfocitos T CD8+ y NK hacia el tumor (Kryczek y col., 2009). Además, los linfocitos Th17 son capaces de inducir la producción de la quimioquina CCL20 por el tejido tumoral, la cual promueve el reclutamiento de células dendríticas hacia el tumor y linfonodo drenante (Zou & Restifo, 2010). Esto permitiría una mayor activación de linfocitos T CD8+ y, por lo tanto, una respuesta antitumoral más potente (Zou & Restifo, 2010).

Por otra parte, el rol protumoral de los linfocitos Th17 se asocia principalmente a la producción de IL-17 por estas células, esto debido a las propiedades proangiogénicas de esta citoquina. En células endoteliales y fibroblastos la IL-17 es capaz de inducir una serie de factores angiogénicos, incluyendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e IL-8 (Murugaiyan & Saha, 2009). La IL-17 también induce la producción de IL-6 en las células tumorales y en el estroma asociado al tumor, promoviendo la activación de STAT3, factor de transcripción que aumenta la expresión



de genes de supervivencia y pro-angiogénicos (Wang y col., 2009). Además, la activación de STAT3 induce la expansión de las MDSC y la producción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas implicadas en la migración celular y metástasis (Hemdan, 2013).

3.5 Adenosina e Inmunosupresión en Cáncer: Rol de las Ectonucleotidasas CD39 y CD73.

La adenosina es un nucleósido purínico con una variedad de efectos en distintos órganos y tejidos (Kumar, 2013). Constitutivamente se encuentra presente en el medio extracelular a bajas concentraciones ($<1 \mu\text{M}$) (Kumar, 2013). No obstante, su concentración se puede elevar considerablemente (10-20 veces) bajo condiciones de estrés metabólico, como por ejemplo durante la inflamación y el cáncer (Kumar, 2013).

Mediante la estimulación de los receptores A_{2A} y A_{2B}, la adenosina ejerce un efecto inmunosupresor e inmunomodulador en las células inmunes que infiltran el tumor (Kumar, 2013). En macrófagos la adenosina induce la adquisición de un fenotipo M2 (protumoral), aumentando la secreción VEGF e IL-10 (Grinberg y col., 2009). Además, la adenosina promueve la expansión de MDSC (Ryzhov y col., 2011) e inhibe la actividad antitumoral de los linfocitos NK, disminuyendo la producción de TNF- α e IFN- γ y la expresión de perforina y FasL (Miller y col., 1999). En las células dendríticas, la adenosina disminuye la expresión de moléculas co-estimuladoras e induce un aumento en la secreción de factores angiogénicos, pro-inflamatorios e inmunosupresores, como VEGF, IL-8, IL-6, IL-10 y TGF- β (Novitskiy y col., 2008). En

los linfocitos T la adenosina disminuye la proliferación y la secreción de IL-2 e IFN- γ e induce la producción de TGF- β , promoviendo la generación de linfocitos Treg (Zarek y col., 2008).

La principal vía de acumulación de adenosina a nivel extracelular se produce a partir de la desfosforilación de ATP por las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Junger, 2011). CD39 se encarga de hidrolizar el ATP y ADP hacia AMP, mientras que CD73 hidroliza el AMP para generar adenosina (Ghiringhelli y col., 2012). CD39, descrito originalmente como un marcador de activación linfoide (Maliszewski y col., 1994), se expresa en distintos niveles en una variedad de células inmunes, como por ejemplo en monocitos, neutrófilos, linfocitos B, células dendríticas y linfocitos T (Pulte y col., 2007; Borsellino y col., 2007). CD73, considerada la enzima limitante en la generación de adenosina extracelular (Resta y col., 1998), se expresa en linfocitos B y células dendríticas, células endoteliales y epiteliales, fibroblastos, en linfocitos Treg pero no en linfocitos T vírgenes (Beavis y col., 2012). Incluso, se ha descrito la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en las células tumorales en varios tipos de cáncer, incluyendo: melanoma, leucemia, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de colon, etc. (Beavis y col., 2012). Debido a esto, CD39 y CD73 están siendo considerados como nuevos blancos terapéuticos en oncología, desarrollando anticuerpos o fármacos que puedan inhibir su función (Ghiringhelli y col., 2012; Bastid y col., 2013).

La producción de adenosina ha sido descrita como uno de los mecanismos por los cuales los linfocitos Treg suprimen la respuesta inmune. La expresión coordinada

de CD39 y CD73 en los linfocitos Treg permite generar adenosina a partir del ATP y, por lo tanto, suprimir la proliferación de los linfocitos T (Deaglio y col., 2007).

Recientemente, se ha descrito que los linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* con TGF- β e IL-6 (Th17 Regulatorios) tendrían propiedades inmunomoduladoras debido a que expresan altos niveles de CD39 y CD73 (Chalmin et al., 2012). Por otra parte, linfocitos Th17 diferenciados *in vitro* en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23 y en ausencia de TGF- β (Th17 inflamatorios), se caracterizarían por tener un perfil inflamatorio (Ghoreschi et al., 2010), con una baja expresión de CD39 and CD73 (Chalmin et al., 2012). Más aún, se ha descrito que un porcentaje de células Th17 son capaces de expresar CD39 y CD73 en el tumor, lo cual permitiría especular que estas células están favoreciendo el crecimiento tumoral mediante la producción de adenosina (Chalmin y col., 2012). En conjunto, estos antecedentes permiten postular la hipótesis que el microambiente tumoral induce la expresión de CD39 y CD73 en células Th17, modificando su función de célula pro-inflamatoria a inmunosupresora como uno de los mecanismos para escapar a la inmunovigilancia.

4. HIPÓTESIS

Los linfocitos Th17 presentes en el microambiente tumoral expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73, las cuales le confieren propiedades inmunosupresoras protumorales.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

- Estudiar la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 en el microambiente tumoral y correlacionar la expresión de estas ectonucleotidasas con la función de las células Th17.

5.2 Objetivos Específicos

- Estudiar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 *in vivo* en un modelo murino de melanoma.

- Generar y caracterizar *in vitro* linfocitos Th17 inflamatorios y regulatorios.

- Estudiar *in vivo* la actividad protumoral de los linfocitos Th17 que expresan altos niveles de CD39 y CD73.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ratones

Ratones C57BL/6 (WT), OT-II, B6.129P2(Cg)-*Rorc*^{tm2Litl}/J (RORc), C57BL/6-*Il17a*^{tm1Bcgen}/J (IL-17-GFP) y ratones B6.SJL-*Ptprca*^a *Pep3*^b/BoyJ (CD45.1), fueron comprados a *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)*. Los ratones homocigotos RORc (o ROR γ ^{tgfp/gfp}) poseen un *knock-in* de GFP en el gen ROR- γ específico para la isoforma ROR- γ t, por lo cual son incapaces de expresar el factor de transcripción ROR γ t y, por lo tanto, son deficientes en linfocitos Th17. Los ratones OT-II presentan una inserción genética en el cromosoma Y que les permite expresar en los linfocitos T CD4⁺ un TCR transgénico (cadenas V α 2 y V β 5), con especificidad contra un péptido de ovoalbúmina (OVA₃₂₃₋₃₃₉) presentado en contexto de MHC-II I-A^b. Los ratones IL-17-GFP expresan la proteína EGFP como marcador de la producción de IL-17. Ratones OT-II que expresan ambas isoformas de CD45 (CD45.1 y CD45.2) se generaron mediante la cruce de ratones OT-II (CD45.2) con ratones B6.SJL-*Ptprca*^a *Pep3*^b/BoyJ (CD45.1). Todos los ratones fueron mantenidos en el bioterio de la Fundación Ciencia y Vida en condiciones libres de patógenos específicos. Para los experimentos se utilizaron ratones entre 6 y 10 semanas de edad.

6.2 Genotipificación de ratones RORc

La identificación del genotipo de las crías de los ratones transgénicos RORc, que portan la mutación de forma heterocigota u homocigota, se realizó mediante un

ensayo de PCR. El ADN genómico de cada ratón se obtuvo mediante el método *HOTSHOT*. Para esto, un trozo de 1-2 mm de cola del ratón se sumergió en solución de lisis alcalina (NaOH 2,5 mM+ EDTA 0,2 mM, pH 12) y se incubó por 2 horas. Luego, esta solución se neutralizó con una solución de Tris-HCl (40 mM), obteniéndose ADN genómico del ratón listo para ser utilizado en una reacción de PCR.

El genotipo se verificó con una reacción de PCR convencional utilizando Platinum PCR Supermix (Invitrogen) de acuerdo a las condiciones sugeridas por *The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA)*. Se utilizaron los siguientes partidores: sentido 5'-CCC CCT GCC CAG AAA CAC T-3'; antisentido WT 5'-GGA TGC CCC CAT TCA CTT ACT TCT-3'; antisentido RORc 5'-CGG ACA CGC TGA ACT TGT GG -3'. El resultado del PCR se analizó mediante una electroforesis en un gel de agarosa 2,5%. El amplicón del gen no alterado tiene un peso molecular de 174 pb, mientras que el amplicón de la versión transgénica tiene un peso molecular de 241 pb.

6.3 Líneas y modelos tumorales

La línea tumoral de melanoma murino B16.F10 se obtuvo de ATCC. Las células B16 que expresan ovoalbúmina, B16-OVA, fueron donadas por el Dr. Randolph Noelle (Dartmouth Medical School, USA). Para la obtención de tumores intradérmicos se inyectaron, por vía intradérmica (i.d.), $0,6 \times 10^6$ células B16-OVA o $1,5 \times 10^6$ células B16.F10 en el costado derecho de ratones de entre 6 y 10 semanas de edad. La evolución del tamaño tumoral se evaluó cada dos días mediante dos mediciones perpendiculares del tumor realizadas con un pie de metro. Los tumores se desarrollan en el ratón hasta un tamaño máximo de 250 mm² antes de ser sacrificados.

6.4 Anticuerpos

Los anticuerpos contra CD4 APC-eFluor780 (clon GK1.5), CD39 PE (clon 24DMS1), CD73 PE-Cy7 (clon TY/11.8), CD73 PerCP-eFluo710 (clon TY/11.8), V α 2 PE (clon B20.1), CD16/32 (clon 93), IL-17 eFluor660 (clon eBio17B7), IFN- γ eFluor660 (clon XMG1.2), IFN- γ FITC (clon XMG1.2), CD25 APC (clon PC61.5), CD11c PE (clon N418), Foxp3 PE-Cy7 (clon FJK-16s) se compraron a eBioscience; el anticuerpo contra V β 5 FITC (clon MR9-4) se compró a BD Biosciences; y los anticuerpos contra CD4 FITC (clon GK1.5CD), CD4 APC (clon GK1.5), I-Ab FITC (clon 25-09-17), B220 APC (clon Ra3-6B2), CD45.1 PE-Cy7 (clon A20) se compraron a BioLegend.

6.5 Citometría de flujo

Para la detección de moléculas de superficie mediante citometría de flujo se incubaron células con un anticuerpo contra CD16/CD32 (Fc Block) en medio PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y oscuridad, con el fin de bloquear receptores Fc. Luego, se lavaron las células con PBS + 2% SFB y centrifugaron a 600 x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos fluorescentes en PBS + 2% SFB durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Para descartar las células muertas se agregó, junto con los anticuerpos, un reactivo para determinar viabilidad (Fixable Viability Dye eFluor 780, eBiosciences). Finalmente, se lavaron con PBS + 2% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB para ser analizadas.

Para marcaje intracelular, luego del marcaje extracelular descrito anteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron con BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences), o con el kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience) en los casos en que se marcó Foxp3.

Para fijar y permeabilizar las células usando BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit (BD Biosciences), las células se incubaron con 200 μ L de BD Cytofix/Cytoperm durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 μ L de Permwash y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos diluidos en 50 μ L de Permwash, durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente, se lavaron con 700 μ L de Permwash y se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB.

Para fijar y permeabilizar las células utilizando el kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBioscience), las células se incubaron con 300 μ L de Fixation/Permeabilization (eBioscience), durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Al cabo de la incubación, las células se lavaron con 700 μ L de Permeabilization Buffer y se centrifugaron a 700 x g durante 8 minutos a 4°C. Luego, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos diluidos en 100 μ L de Permeabilization Buffer, durante 30 minutos a 4°C y oscuridad. Finalmente, se lavaron con 700 μ L de Permeabilization Buffer, se centrifugaron a 700 x g por 8 minutos a 4°C y se resuspendieron en 200 μ L de PBS + 2% SFB.

Las células se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro FACSCanto II (BD Biosciences), y los datos fueron procesados con el programa FlowJo (Tree Star, Inc.).

6.6 Procesamiento de órganos linfoides secundarios y tumor

Para la obtención de esplenocitos se disectó el bazo del ratón y se recibió en una placa de Petri con 10 mL de RPMI + 10% SFB. El bazo se perfundió para obtener una suspensión celular, la cual se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Luego, se resuspendió en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos (RBC Lysis Buffer, eBioscience) durante 5 minutos en hielo. La lisis se detuvo agregando 8 mL RPMI + 10% SFB a las células y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Las células se resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB.

Para la obtención de células desde los ganglios linfáticos, éstos se disectaron y se disgregaron con una tijera. Finalmente, la suspensión celular se filtró por una malla metálica de 90 µm, llevando a un volumen de 5 mL con RPMI + 10% SFB.

Tumores entre 50 y 150 mm² se disectaron y disgregaron mecánicamente con una tijera en HBSS + 5% SFB. La suspensión celular y restos de tejido se traspasaron a un tubo falcon de 15 mL y se realizó una digestión enzimática con 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 0,05 mg/mL de DNasa I (Roche), incubando a 37°C con agitación suave durante 30 minutos. Al terminar la digestión, el tejido se filtró a través de una malla de 70 µm (cell strainer, BD), se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos a

4°C y se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis de glóbulos rojos por 5 minutos en hielo. La lisis se detuvo agregando 8 mL HBSS + 5% SFB a las células y se centrifugaron a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. Luego de esto, las células se resuspendieron en 3 mL de Percoll 40%. Con una pipeta Pasteur, se agregó el mismo volumen de Percoll 70% bajo la suspensión celular y se centrifugó a 750 x g durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Luego, se recuperó el anillo que se produce entre las dos fases, el cual contiene las células mononucleares, y se traspasó a otro tubo donde se lavó con 10 mL HBSS + 5% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, de manera de eliminar el Percoll existente. Finalmente, las células se resuspendieron en 2 mL de RPMI + 10% SFB.

6.7 Obtención de células CD4+ a partir de bazo

Se obtuvieron esplenocitos a partir del bazo de ratones OT-II CD45.1/CD45.2. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos. Tras la lisis de glóbulos rojos, las células se lavaron con 8 mL RPMI + 10% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, tras lo cual se resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB. Para aislar linfocitos T CD4, los esplenocitos se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se incubaron con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos α -CD4 (Miltenyi Biotec) (75 μ L de perlas por cada 100 millones de esplenocitos) en Verseno + 0,5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, se lavaron con 8 mL Verseno + 0,5 % SFB a las células y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C, tras lo cual se resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5%

SFB. La suspensión celular se traspasó a una columna (Columna LS, Miltenyi Biotec) y se realizó la selección positiva de los linfocitos T CD4⁺ mediante separación inmunomagnética. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) suplementado con 10% de SFB, 0,25 µg/mL de Fungizona y 0,05 µM de β-mercaptoetanol. La pureza de la preparación se verificó cada vez mediante citometría de flujo, obteniéndose siempre sobre un 85% de células CD4⁺.

6.8 Generación de células Th17 *in vitro*

Para obtener células Th17 específicas contra OVA, se aislaron linfocitos T CD4 a partir de ratones OT-II CD45.1/CD45.2, los cuales se activaron de forma policlonal con anticuerpos contra CD3 y CD28 en diferentes condiciones de polarización. Los anticuerpos α-CD3 y α-CD28 se utilizaron adheridos a la placa. Para esto se incubaron los pocillos con 100 µL de los anticuerpos disueltos en PBS durante 4 horas a 37 °C, para posteriormente lavarlos dos veces con 200 µL de PBS frío.

Para generar linfocitos Th17 se cultivaron 100.000 linfocitos T por pozo en 200 µL de medio de cultivo, en placas de 96 pozos durante 4 días a 37°C y 5% CO₂, en presencia de los siguientes anticuerpos y citoquinas:

Tabla 1. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la diferenciación de linfocitos Th17 regulatorios o linfocitos Th17 inflamatorios.

Th17 regulatorios	Th17 inflamatorios
α -CD3 (2 μ g/mL)	α -CD3 (2 μ g/mL)
α -CD28 (2 μ g/mL)	α -CD28 (2 μ g/mL)
TGF- β 1 (2 ng/mL)	TGF- β 3 (2 ng/mL)
IL-6 (20 ng/mL)	IL-6 (20 ng/mL)
IL-1 β (10 ng/mL)	IL-1 β (10 ng/mL)
α -IFN- γ (5 μ g/mL)	α -IFN- γ (5 μ g/mL)

Luego de 4 días de cultivo se realizó una segunda ronda de diferenciación. Se recuperaron las células de los pocillos, se lavaron con PB2 +10% SFB y se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C. Esto se repitió dos veces, tras lo cual las células se resuspendieron en medio de cultivo. Se cultivaron 1x10⁶ linfocitos Th17 por pozo en 2 mL de medio de cultivo, en placas de 24 pozos. Las células se activaron nuevamente de forma policlonal en presencia de anticuerpos contra CD3 y CD28 (adheridos a placa en el caso de los linfocitos Th17 regulatorios, solubles en el caso de los linfocitos Th17 inflamatorios).

Los linfocitos Th17 se diferenciaron en presencia de las siguientes citoquinas y anticuerpos:

Tabla 2. Anticuerpos y citoquinas utilizados en la segunda ronda de diferenciación de los linfocitos Th17 regulatorios o linfocitos Th17 inflamatorios.

Th17 regulatorios	Th17 inflamatorios
α -CD3 (1 μ g/mL)	α -CD3 (1 μ g/mL)
α -CD28 (1 μ g/mL)	α -CD28 (1 μ g/mL)
IL-6 (20 ng/mL)	IL-6 (20 ng/mL)
TGF- β 1 (2 ng/mL)	IL-1 β (10 ng/mL)
	IL-23 (25 ng/mL)

Los cultivos se incubaron durante 3 días a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se verificó el fenotipo de los linfocitos resultantes mediante citometría de flujo.

6.9 Aislamiento de células Th17

Las células Th17 generadas *in vitro* se aislaron mediante *cell sorting* en base a la expresión de IL-17, CD39 y CD73. Esto es posible debido a que la IL-17 forma heterodímeros con la IL-17F, la cual tiene dominios transmembranas, lo que permite la expresión transitoria de IL-17 en la superficie (Brucklacher-Waldert y col., 2009). Para activar las células Th17, éstas se incubaron en RPMI + 10% SFB a una concentración de 2,5 x 10⁶ células/mL, en presencia de PMA 0,25 μ M (Sigma) e Ionomicina 1 μ g/mL (Sigma) durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se incubaron con los anticuerpos fluorescentes CD4, CD39, CD73 e IL-17 en PBS + 2% SFB, a una concentración de 100 x 10⁶ células/mL, durante 20 minutos a 4°C y oscuridad. Posteriormente, se

centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en RPMI + 10% SFB para ser aisladas por el Cell Sorter FACSAria II (BD Biosciences).

6.10 Transferencia adoptiva de células Th17 regulatorias o Th17 inflamatorias

Al día 7 posterior a la inyección i.d. de células tumorales, 1×10^6 células Th17 generadas *in vitro* y sorteadas, se inyectaron en el ratón por vía intravenosa (i.v.). En el caso de un experimento de crecimiento tumoral, se realizó un seguimiento al crecimiento al medir los tumores en el tiempo hasta el día 21, día en el cuál los ratones son sacrificados para análisis.

6.11 Ensayo de supresión *in vitro*

Para los ensayos de supresión, se utilizaron linfocitos T CD4+ marcados con ³*CellTrace Violet* (Invitrogen) como población respondedora. Para esto, los linfocitos T CD4 de un ratón OT-II se aislaron mediante separación magnética, de la forma descrita anteriormente, y luego se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y resuspendieron en PBS (37 °C), a una concentración de 10×10^6 células/mL. Se les agregó *CellTrace Violet*, a una concentración final de 5µM, y se incubaron durante 20 minutos a 37 °C en oscuridad. Luego, se les agregó RPMI + 10% SFB y se incubaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de SFB, 0,25 µg/mL de Fungizona y 0,05 µM de β-mercaptoetanol.



Para obtener células presentadoras de antígeno (APC), se disectó el bazo de un ratón C57BL/6 y se recibió en 4,5 mL de PBS + 10% SFB. Se disgregó con una tijera, se realizó la digestión enzimática con 1 mg/mL de Colagenasa D (Roche) y 0,05 mg/mL de DNasa I (Roche) y se incubó a 37°C con agitación rotatoria leve durante 45 minutos. Al finalizar la incubación, la muestra se filtró en un *cell strainer* de 70 μm , se centrifugó a 600 x g durante 7 minutos 4°C y se resuspendió en 2 mL buffer de lisis de glóbulos rojos durante 5 minutos. Tras la lisis de glóbulos rojos, las células se lavaron con 8 mL e RPMI + 10% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y resuspendieron en 10 mL de RPMI + 10% SFB. Para aislar las APCs, los esplenocitos se incubaron con perlas magnéticas acopladas a un anticuerpo α -CD11c (Miltenyi Biotec) (30 μL de perlas por cada 100 millones de esplenocitos) en Verseno + 0,5% SFB, durante 20 minutos a 4°C con agitación rotatoria suave. Luego de la incubación, las células se lavaron Verseno + 0,5% SFB, se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y resuspendieron en 1 mL de Verseno + 0,5% SFB. . La suspensión celular se traspasó a una columna (Columna LS, Miltenyi Biotec) y se realizó la selección positiva de las células CD11c mediante separación inmunomagnética. Las células se centrifugaron a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se resuspendieron en medio de cultivo IMDM suplementado con 10% de SFB, 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Fungizona y 0,05 μM de β -mercaptoetanol. El fenotipo y porcentaje de pureza se verificó mediante citometría de flujo.

En el ensayo de supresión, los linfocitos Th17 regulatorios o Th17 inflamatorios fueron sorteados en base a la expresión de CD4, IL-17, CD39 y CD73. Se co-cultivaron 100.000, 50.000 O 25.000 linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios con 50.000

linfocitos T CD4 marcados con *CellTrace Violet* y 20.000 APC, en presencia del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ a una concentración 2µM, en 200 µL de medio de cultivo. El co-cultivo se realizó en placas de 96 pozos, durante 3 días a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se verificó la proliferación de los linfocitos T CD4 mediante citometría de flujo.

Para el ensayo de supresión en placa transwell, los linfocitos T CD4 se plaquearon junto a las APC en el compartimiento inferior. Los linfocitos Th17 inflamatorios o los linfocitos Th17 regulatorios se plaquearon en el compartimiento superior. Se co-cultivaron 150.000, 75.000 O 32.500 linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios con 75.000 linfocitos T CD4 marcados con *CellTrace Violet* y 30.000 APC, en presencia del péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ a una concentración 2µM, en 300 µL de medio de cultivo. El co-cultivo se realizó durante 3 días a 37°C y 5% CO₂, luego de lo cual se verificó la proliferación de los linfocitos T CD4 mediante citometría de flujo.

6.12 Activación de linfocitos

Para analizar la expresión de citoquinas por parte de linfocitos , éstos fueron incubados en RPMI + 10% SFB a una concentración de 2×10^6 células/mL, y activados en presencia de PMA 0,25 µM (Sigma), Ionomicina 1 µg/mL (Sigma) y Brefeldina A 10 µg/mL (GolgiPlug, BD Biosciences), durante 4 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, se centrifugaron a 600 x g durante 7 a 4°C y se resuspendieron en PBS + 2% SFB.

6.13 Análisis de citoquinas en el sobrenadante

Células Th17 regulatorias e inflamatorias se activaron con PMA 0,25 μ M (Sigma) e Ionomicina 1 μ g/mL (Sigma), a una concentración de 1×10^6 células/mL, durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂. Luego de la incubación, se centrifugaron las células a 600 x g durante 7 minutos a 4°C y se recolectó el sobrenadante. Las citoquinas en los sobrenadantes se analizaron mediante el kit CBA Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences), el cual detecta IL-10, IL-17, TNF- α , IL-4, IL-6, IFN- γ e IL-2. La detección de GM-CSF se realizó mediante ELISA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Mouse GM-CSF ELISA Set, BD Biosciences).

6.14 Análisis estadístico

Los datos son presentados como el promedio \pm el error estándar. Los análisis estadísticos de la intensidad media de fluorescencia (IMF) y porcentaje de células se realizaron con el test no paramétrico de Kruskal-Wallis con post test de Dunn. Para el análisis estadístico de las curvas de crecimiento tumoral entre distintos tratamientos se utilizó un análisis de ANOVA de 2 vías con corrección de Bonferroni.

Todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). En todos los casos se considera la significancia con un valor de $p < 0,05$. (* $< 0,05$, ** $< 0,01$, *** $< 0,001$).

7. Resultados

7.1 Los linfocitos Th17 están presentes en el tumor

Datos de la literatura indican que en ratones se produce un aumento en el número de linfocitos Th17 en la sangre, médula ósea, bazo y tumor, en modelos murinos de cáncer de próstata, fibrosarcoma, melanoma, etc. (Kryczek y col., 2007). En base a este antecedente, inyectamos ratones C57BL/6 con la línea tumoral B16.F10 y realizamos posteriormente una caracterización fenotípica de los linfocitos Th17 en diferentes órganos y en el tumor.

Como se observa en la Figura 1A y 1B, en todos los órganos analizados, tanto en ratones con o sin tumor se observan células Th17 analizadas mediante citometría de flujo, existiendo variaciones en el porcentaje de estas células en los distintos órganos. Si bien no encontramos diferencias en el porcentaje de células Th17 en el bazo de ratones con y sin tumor, al comparar el linfonodo periférico (PLN) de ratones sin tumor con el linfonodo drenante del tumor (TdLN) observamos una disminución en el porcentaje de células Th17 en este último órgano. En consecuencia, esta disminución podría relacionarse con una migración de las células Th17 hacia el tumor.

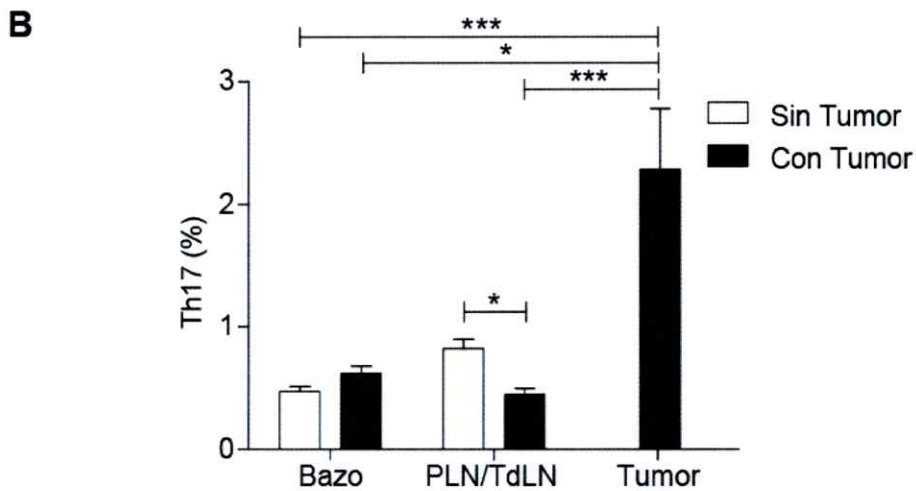
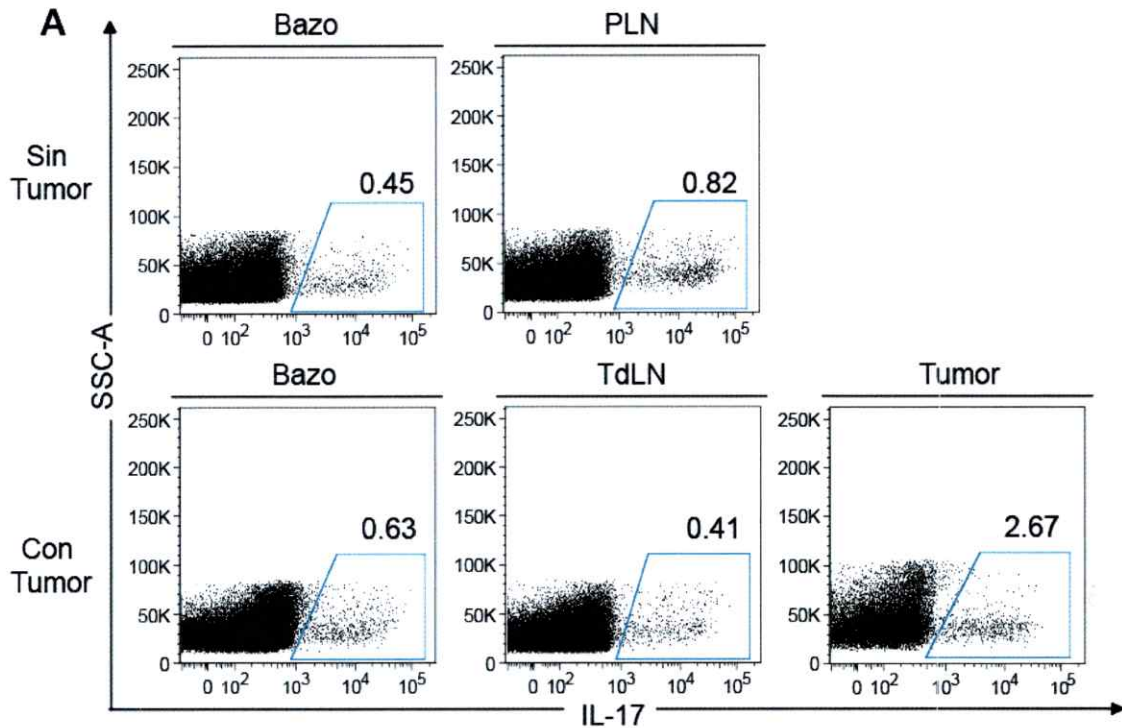


Figura 1. Las células Th17 están presentes en el tumor. Células del bazo, órgano linfoide periférico (PLN), órgano linfoide asociado al tumor (TdLN) y tumor, provenientes de ratones C57BL/6 con y sin tumor, fueron aisladas y analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de células Th17. (A) Análisis de citometría de flujo de la producción de IL-17 por linfocitos T CD4+ en diferentes órganos linfoides y tumor. (B) Se presenta el porcentaje de células Th17 (IL-17+/CD4+) en diferentes órganos linfoides y tumor (n=8-13). Los datos en B se muestran como la media \pm SEM. *p<0,05; ***p<0,001; Test de Kruskal-Wallis.

7.2 Los linfocitos Th17 expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 *in vivo*

Se ha descrito que las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Treg tienen como función hidrolizar el ATP extracelular para la producción de adenosina, actuando como uno de los mecanismos de supresión de la respuesta inmune utilizado por estas células (Deaglio y col., 2007). Sin embargo, la expresión de CD39 y CD73 no está restringida a los linfocitos Treg, sino que se expresan en una variedad de células del sistema inmune, como en monocitos, neutrófilos, linfocitos B, células dendríticas y linfocitos T (Pulte y col., 2007; Borsellino y col., 2007). Un reporte reciente ha demostrado la expresión de estas ectonucleotidasas en las células Th17 y sugiere que estas moléculas, de manera similar a los Treg, les brindaría la capacidad de suprimir la respuesta inmune mediante la producción de adenosina (Chalmin y col., 2012). Para estudiar si el microambiente tumoral induce la expresión de CD39 y CD73 en las células Th17 analizamos la expresión de las ectonucleotidasas en los linfocitos Th17 provenientes de ratones sanos y con tumores, y la comparamos con la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th1 (CD4⁺ IFN- γ ⁺) y linfocitos Treg (CD4⁺ Foxp3⁺).

Como se puede observar en la Fig. 2A y B, en el tumor existe un aumento de las células Th17 que expresan CD39 y CD73 (cerca del 50%), en comparación a PLN y TdLN (cerca de un 40%), lo cual demuestra que el microambiente tumoral favorece la expresión de estas ectonucleotidasas. Sorprendentemente, el porcentaje y nivel de expresión de CD39 (Intensidad media de fluorescencia, IMF) es menor en células Th17 respecto del nivel de expresión observado en linfocitos Treg y Th1 en todos los órganos observados (Fig 2C). Interesantemente, el nivel de expresión de CD73 se mantuvo constante en las células Th17 en el tumor y en todos los órganos analizados,

a diferencia de las células Th1 y Treg, en las cuales se observa menor expresión de CD73 en el tumor (Fig. 2C). En conclusión, el microambiente tumoral favorece la expresión de la ectonucleotidasa CD39 en los linfocitos Th17, Th1 y Treg.

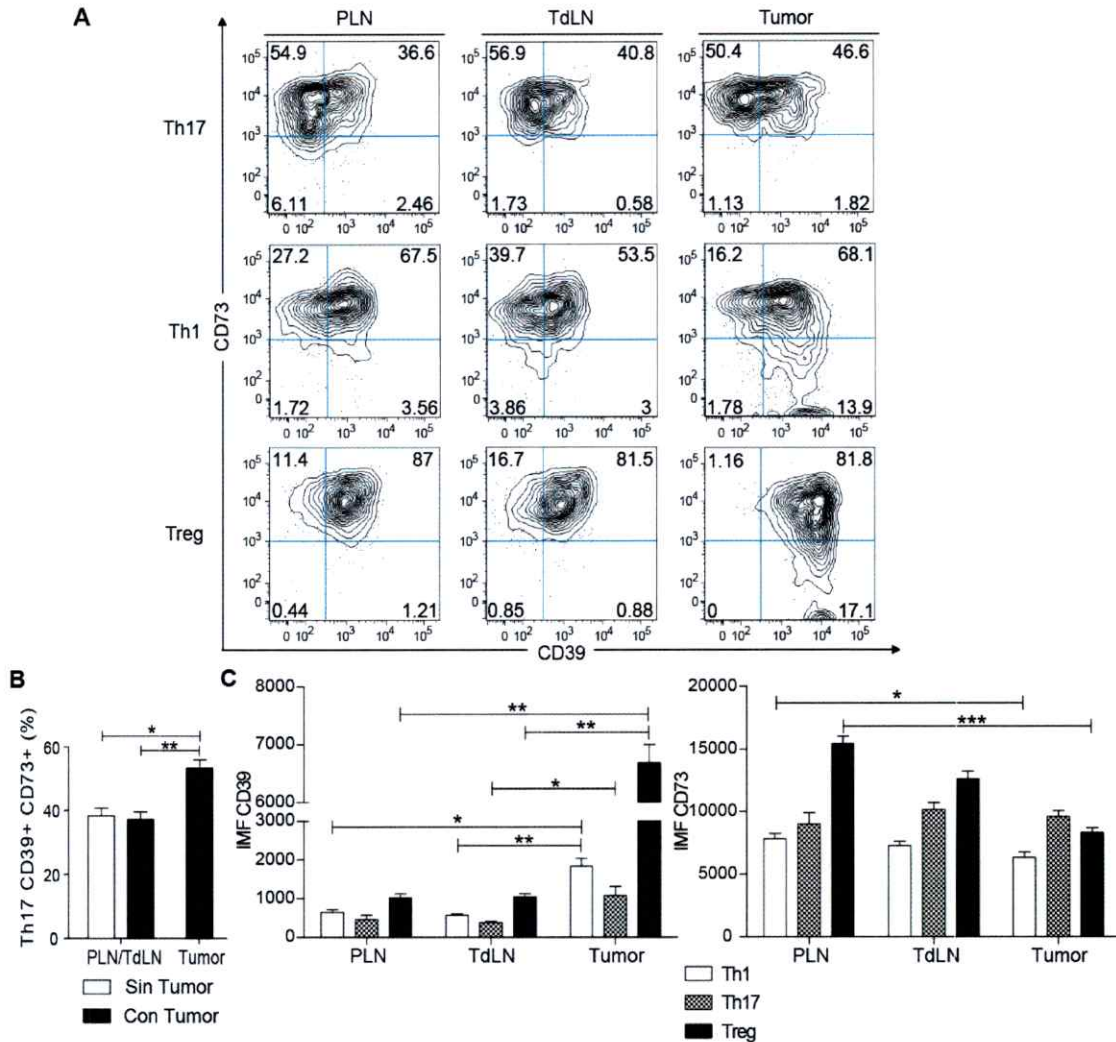


Figura 2. Expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en células Th17, Th1 y Treg presentes en órganos de ratones con y sin tumor. Células de PLN (o TdLN) y tumor provenientes de ratones C57BL/6 fueron aisladas y analizadas por citometría de flujo. (A) Análisis de la expresión de CD39 y CD73 en las células Th17 (CD4+IL-17+), Th1 (CD4+ IFN γ +) y Treg (CD4+FoxP3+). (B) Porcentaje de células Th17 CD39+ CD73+ (CD4+ IL-17+) en ratones con o sin tumor (n=7-13). (C) Comparación de la intensidad media de fluorescencia de CD39 y CD73 en las células Th17 (CD4+IL-17+), Th1 (CD4+ IFN γ +) y Treg (CD4+FoxP3+) (n=6-7). Los datos en B y C se muestran como la media \pm SEM. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, Test de Kruskal-Wallis.

7.3 Generación *in vitro* de linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios

Se ha demostrado que la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 se debe a la acción conjunta de la IL-6 y TGF- β 1, lo cual genera células Th17 regulatorias que presentan altos niveles de expresión de CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Además, estos mismos autores describieron que el cultivo de linfocitos T CD4+ en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23 induce la generación de linfocitos Th17 inflamatorios que no expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Sin embargo, en nuestras manos, el porcentaje de células Th17 inflamatorias que se generaron en ausencia de TGF- β fue muy bajo (alrededor de un 10%). Por otra parte, se ha descrito que TGF- β 3 es capaz de inducir un perfil patogénico o "inflamatorio" en los linfocitos Th17, caracterizado por una mayor expresión del receptor de IL-23 (Lee y col., 2012). Por estas razones modificamos el protocolo para producir células Th17 inflamatorias y regulatorias realizando una primera activación de 4 días en presencia de TGF- β 1 o TGF- β 3 para generar células Th17 regulatorias e inflamatorias, respectivamente, y una segunda ronda de activación de 3 días de los linfocitos Th17, donde los Th17 regulatorios se mantuvieron en presencia de TGF- β 1 e IL-6, mientras que los Th17 inflamatorios se cultivaron en ausencia de TGF- β 3, con el fin de disminuir los niveles de expresión de CD39 y CD73, y con IL-6, IL-1 β e IL-23 (Ver tablas 1 y 2 de la sección de materiales y métodos).

En la Fig. 3 se observa que ambos protocolos generan células Th17, sin embargo, consistentemente obtuvimos menores porcentajes de células Th17 en las condiciones para la generación de células con un perfil inflamatorio.

Al analizar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 (Fig. 3) observamos una expresión diferencial de estas moléculas utilizando los diferentes protocolos de diferenciación de células Th17. En la Fig.3 se observa que todos los linfocitos Th17 regulatorios expresan CD73, pero solo un 60% de las células expresa CD39. En el caso de los linfocitos Th17 inflamatorios, aproximadamente un 40% de las células no expresa CD39 ni CD73 y solo un 16% de las células expresa ambas moléculas. Esto indica que determinadas citoquinas favorecen la obtención de linfocitos Th17 con bajos o altos niveles de expresión de CD39 y CD73 *in vitro*.

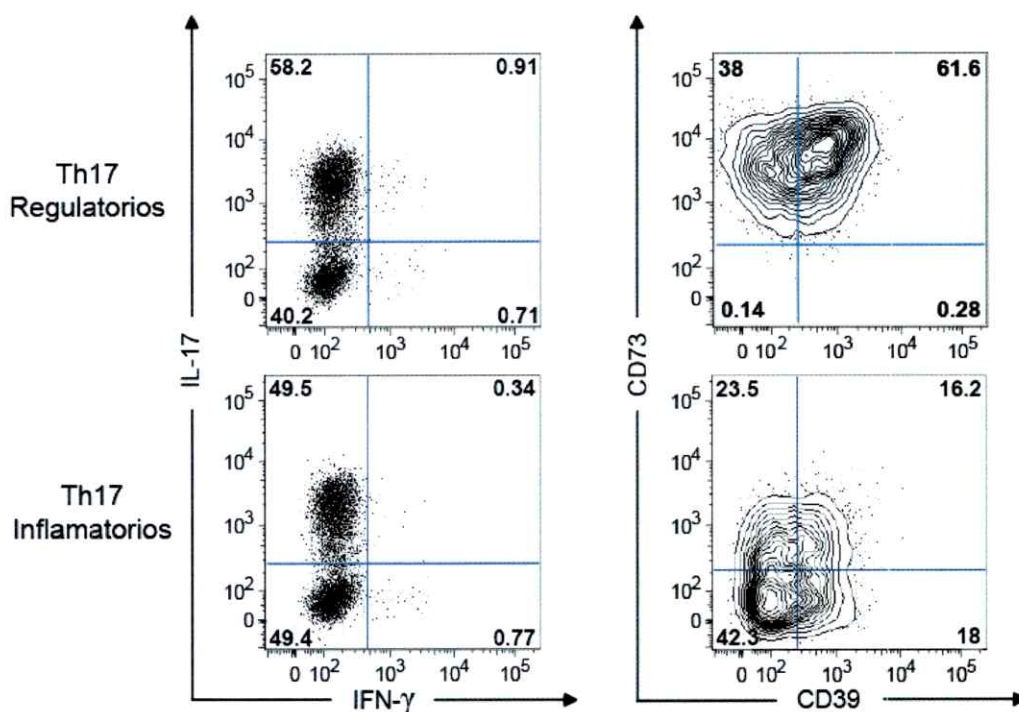


Figura 3. Las células Th17 inflamatorias o regulatorias generadas *in vitro* presentan una expresión diferencial de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.

Células T CD4+ aisladas del bazo de un ratón fueron activadas con α -CD3 y α -CD28 en presencia de TGF- β 1, IL-6, IL-1 β y α -IFN- γ o TGF- β 3, IL-6, IL-1 β y α -IFN- γ para generar Th17 regulatorios o inflamatorios, respectivamente. Posteriormente, los linfocitos Th17 generados fueron nuevamente activados con α -CD3 y α -CD28 en presencia de TGF- β e IL-6 para generar Th17 regulatorios o en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23 para generar Th17 inflamatorios. Las células se activaron por 4 horas en presencia de PMA, Ionomicina y BFA para analizar la producción de IL-17 e IFN- γ mediante citometría de flujo en una gate CD4+. Figura representativa (n=5).

Para demostrar que las células Th17 generadas *in vitro* poseen un perfil inflamatorio o regulatorio, se determinó la producción de citoquinas en las dos poblaciones de linfocitos Th17. En la Fig. 4 se puede observar que tanto los linfocitos Th17 regulatorios como los linfocitos Th17 inflamatorios secretan cantidades similares de IL-17 y TNF. A pesar de que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas, observamos que los linfocitos Th17 regulatorios secretan mayores cantidades de IL-10, IL-2, IL-6, IFN- γ e IL-4, y los linfocitos Th17 inflamatorios secretan mayores cantidades de GM-CSF. Estos resultados demuestran que las células Th17 generadas *in vitro* según el protocolo descrito anteriormente presentan un perfil de células con características inflamatorias o regulatorias.

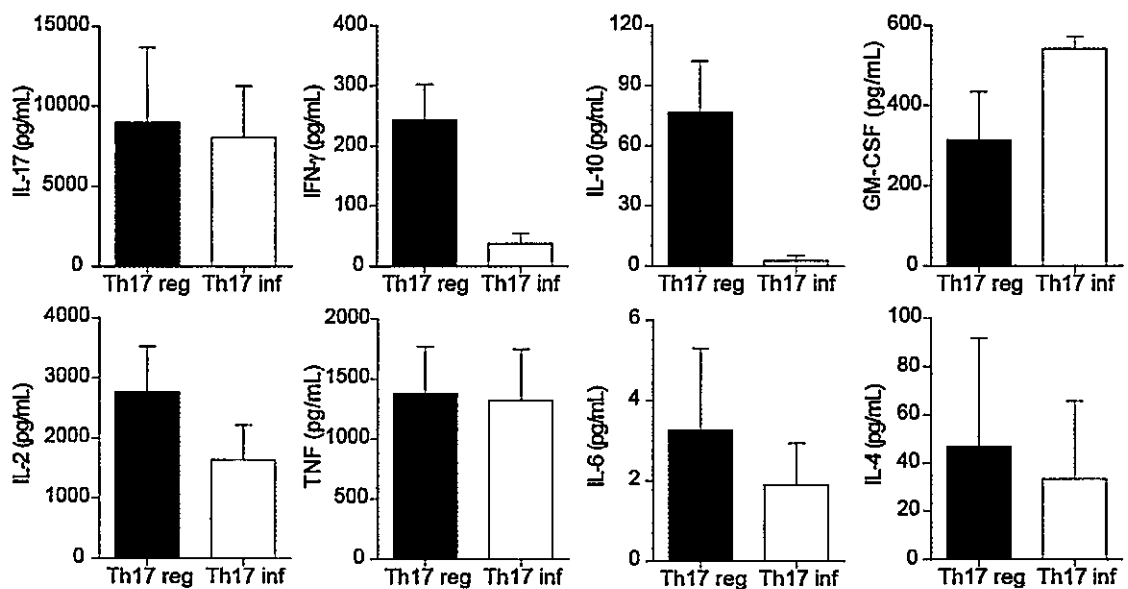


Figura 4. Las células Th17 regulatorias o inflamatorias generadas *in vitro* secretan un patrón diferencial de citoquinas.

Células Th17 regulatorias e inflamatorias fueron sorteadas en base a la expresión de CD4, IL-17, CD39 y CD73. Posteriormente fueron estimuladas con PMA e Ionomicina durante 3 horas. La concentración de citoquinas en los sobrenadantes fue determinada mediante CBA utilizando el kit Th1/Th2/Th17 y GM-CSF se determinó mediante ELISA (n=3). Los datos se muestran como la media \pm SEM.

7.4 Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios no afectan la proliferación de linfocitos T CD4+ *in vitro*

Una vez generados los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios aprovechamos la expresión de CD39 y CD73 para aislar estos dos subtipos de linfocitos Th17 mediante *cell sorting*. Enseguida, los linfocitos Th17 se utilizaron en un ensayo de supresión *in vitro*, a fin de determinar si los diferentes subtipos de linfocitos Th17 podrían tener una función reguladora.

En la Fig. 5 se observa la proliferación de los linfocitos T CD4+ OT-II (específicos para el péptido OVA), co-cultivados en presencia de linfocitos Th17 regulatorios (Fig. 5A) o linfocitos Th17 inflamatorios (Fig. 5B). La proliferación se determinó mediante la dilución de la marca *Cell Trace Violet*, en donde cada peak representa un ciclo de división celular. En gris se muestra la condición control, sin linfocitos Th17, en donde se aprecia que los linfocitos T CD4+ son capaces de proliferar en presencia de células presentadoras y el péptido OVA. Cuando se co-cultivaron tanto con linfocitos Th17 regulatorios (Fig. 5A) como con linfocitos Th17 inflamatorios (Fig. 5B) observamos que no existe una disminución en la proliferación de los linfocitos T CD4+. Esto indica que los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios no tienen propiedades supresoras sobre los linfocitos T CD4+ y que la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 no se relacionaría en con un fenotipo inmunosupresor.

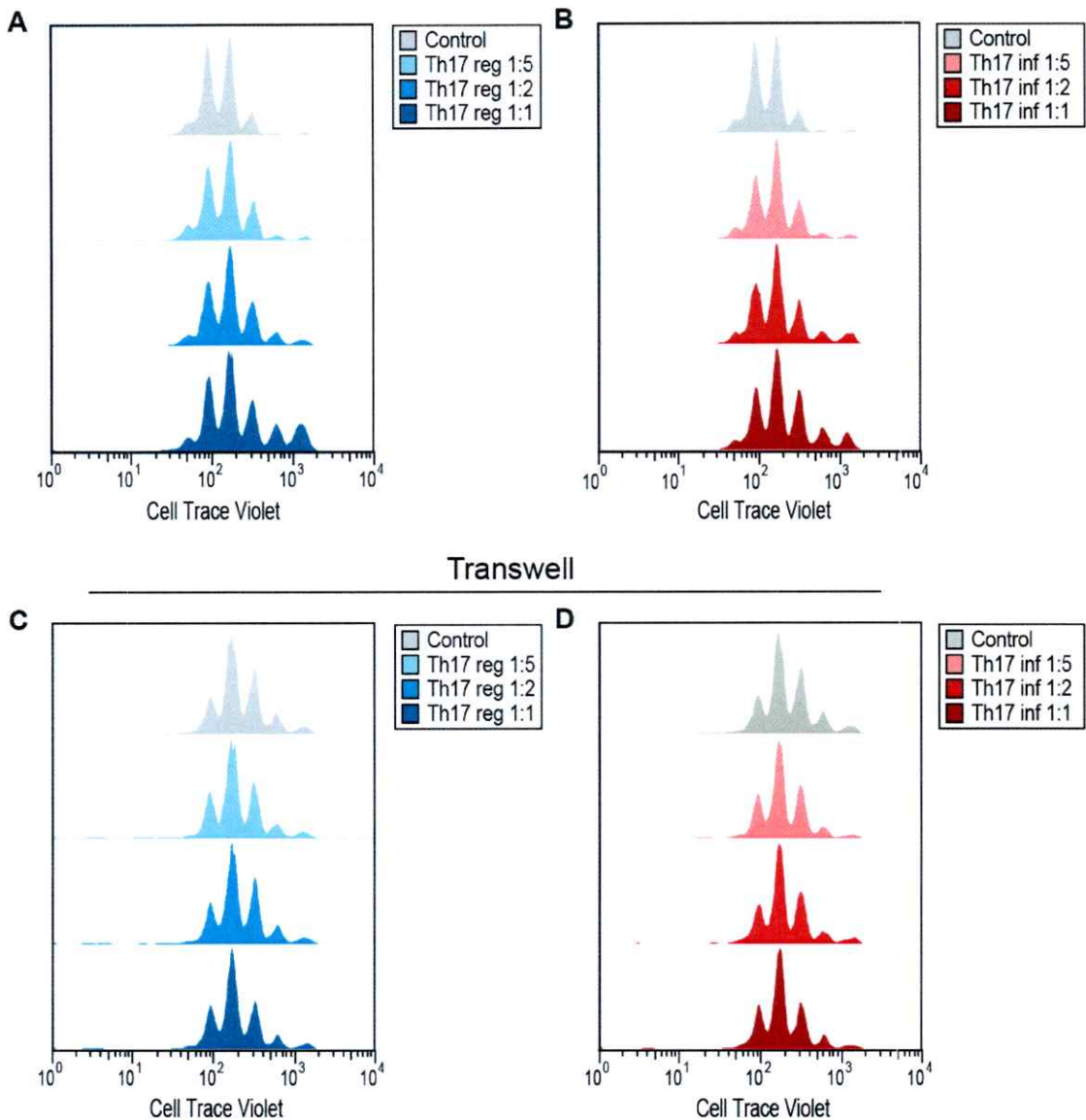


Figura 5. Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios generados *in vitro* no afectan la proliferación de linfocitos T CD4+. Linfocitos T CD4+ específicos para el péptido OVA fueron marcados con Cell Trace Violet y co-cultivados con células presentadoras (APC) y diferentes proporciones de Th17 regulatorios o inflamatorios, en presencia del péptido OVA 323-339. Los gráficos muestran la proliferación de linfocitos T CD4+ co-cultivados con Th17 regulatorios (A, C) o Th17 inflamatorios (B, D). (n=1)

7.5 Los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios son capaces de retrasar la progresión tumoral en ratones ROR- γ ^{t^{gfp/gfp}}

Para determinar el papel de los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios *in vivo*, realizamos una transferencia adoptiva de linfocitos Th17 en ratones que presentan tumores y que carecen de células Th17. Para esto se inyectaron ratones ROR- γ ^{t^{gfp/gfp}} con la línea tumoral B16.OVA y a los 7 días, cuando el tumor ya es palpable, se les inyectaron células Th17 regulatorias o inflamatorias (específicas contra OVA).

Como se observa en la Fig. 6, ambos tipos de linfocitos Th17 son capaces de retrasar el crecimiento tumoral, respecto al control con PBS. A pesar de que los tumores de los ratones inyectados con Th17, tanto regulatorios como inflamatorios, crecieron menos que los tumores de los ratones inyectados con PBS, solo se obtuvo una diferencia estadística significativa al final del experimento, es decir, en el día 17 de la cinética.

Importantemente, no se observaron diferencias en la acción antitumoral de los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios, ya que ambas curvas de progresión tumoral fueron prácticamente iguales. En conclusión, la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 no se relacionaría con un fenotipo protumoral.

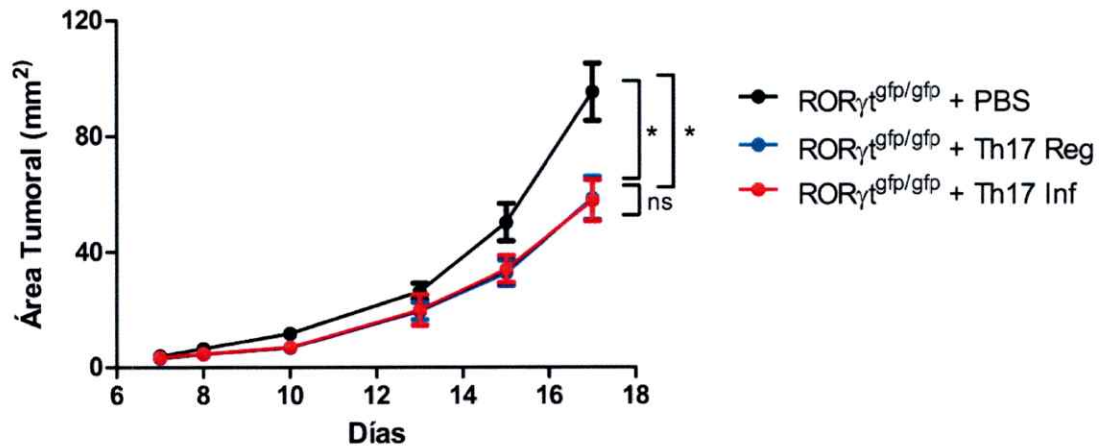


Figura 6. Curva de crecimiento tumoral en ratones ROR- γ^t ^{gfp/gfp} inyectados con linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios. Ratones ROR- γ^t ^{gfp/gfp} se inyectaron con la línea tumoral B16.OVA de forma intradérmica. Luego de 7 días, los ratones se dividieron en tres grupos que fueron inyectados con 1×10^6 linfocitos Th17 regulatorios o 1×10^6 linfocitos Th17 inflamatorias (sorteados en base a la expresión de CD4 e IL-17), o PBS. Se midió el tamaño tumoral hasta el día 17 (n=3-11). Los resultados se muestran como la media \pm SEM. * $p < 0,05$; Test Anova de 2 colas.

7.6 Células Th17 generadas *in vitro* aumentan o mantienen la expresión de CD39 en el microambiente tumoral

Se ha descrito que existe una variedad de factores que influyen en la expresión de CD39 y CD73, como por ejemplo algunas citoquinas (TGF- β , IL-6, IL-12) o la hipoxia (Ghiringhelli y col., 2012). Para estudiar si el microambiente tumoral podría influir en la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17, se observó el fenotipo tanto de los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios luego de la transferencia adoptiva en ratones con tumor.

Como se puede observar en la Fig. 7, la mayoría de los linfocitos Th17 regulatorios mantienen la expresión de CD39 en el tumor, sin embargo, no todas las células expresan CD39 en el bazo (Fig. 7C). Más aún, en el tumor cerca de un 10% de las células reduce la expresión de CD73.

En el caso de los linfocitos Th17 inflamatorios, un gran porcentaje de estas células aumentan la expresión de CD73 en bazo y tumor. Interesantemente, un gran porcentaje de estas células también aumentan la expresión de CD39 en el tumor y en menor medida en el bazo (Fig. 7D). Estos resultados sugieren que el microambiente tumoral induce la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17.

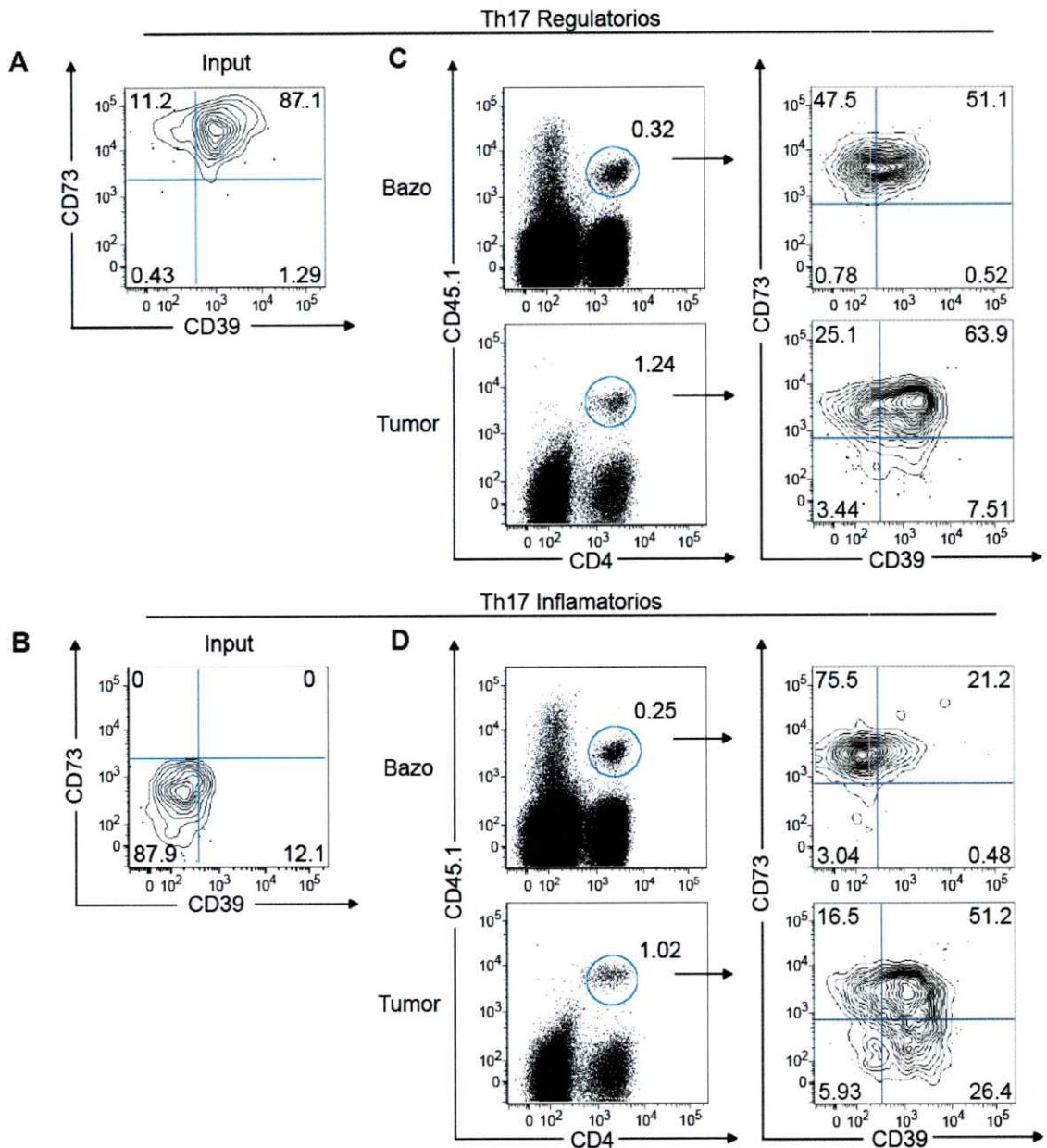


Figura 7 Las células Th17 transferidas a ratones con tumor son capaces de mantener o aumentar la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73.

Células Th17 regulatorias o inflamatorias específicas contra OVA fueron generadas *in vitro* y sorteadas en base a la expresión de CD4, IL-17, CD39 y CD73. Luego, fueron transferidas a ratones congénicos ROR- $\gamma^{\text{tgfp/gfp}}$ (CD45.2) inyectados con B16.OVA. Se analizó la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 por parte de los linfocitos Th17 a los 14 días luego de transferidas las células. (A, B) Fenotipo de las células previo a la inyección. Fenotipo de los Th17 transferidos en el bazo y el tumor de los ratones inyectados con Th17 regulatorios (C) o Th17 inflamatorios (D). Figura representativa (n=3-7).

7.7 Linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN- γ en el tumor

Se ha descrito que la capacidad antitumoral de los linfocitos Th17 depende de IFN- γ , presumiblemente debido a la capacidad de los linfocitos Th17 de convertirse en células Th1 (Muranski y col., 2008). Por lo mismo, además de estudiar la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios estudiamos la capacidad de estos linfocitos de adquirir un fenotipo Th1. Para esto se inyectaron ratones deficientes en linfocitos Th17 ($ROR\gamma^{gfp/gfp}$) con la línea tumoral B16.OVA y a los 7 días se les inyectaron células Th17 regulatorias o inflamatorias (específicas para OVA), las que fueron sorteadas en base a la expresión de CD39 y CD73.

Como se observa en la Fig. 8A y 8B, luego de 14 días post transferencia adoptiva, tanto los linfocitos Th17 inflamatorios como regulatorios son capaces de producir IFN- γ en el tumor. En el bazo los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios no producen IFN- γ y alrededor de un 40% de las células mantiene la expresión de IL-17 (Fig 8C). Interesantemente, en el tumor un mayor porcentaje de linfocitos Th17 regulatorios adquiere la capacidad de producir IFN- γ , en comparación con los linfocitos Th17 inflamatorios (Fig. 8D). Además, en la Fig. 8D se observa que un porcentaje similar de linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios mantiene la expresión de IL-17 (cerca del 35%), pero un mayor porcentaje de los linfocitos Th17 inflamatorios pierde la expresión de IL-17 y no es capaz de producir IFN- γ (aprox. 50%), respecto a los Th17 regulatorios (aprox. 30%). Estos resultados sugieren que la capacidad antitumoral de los linfocitos Th17 se relaciona con la capacidad de producir IFN- γ en el tumor.

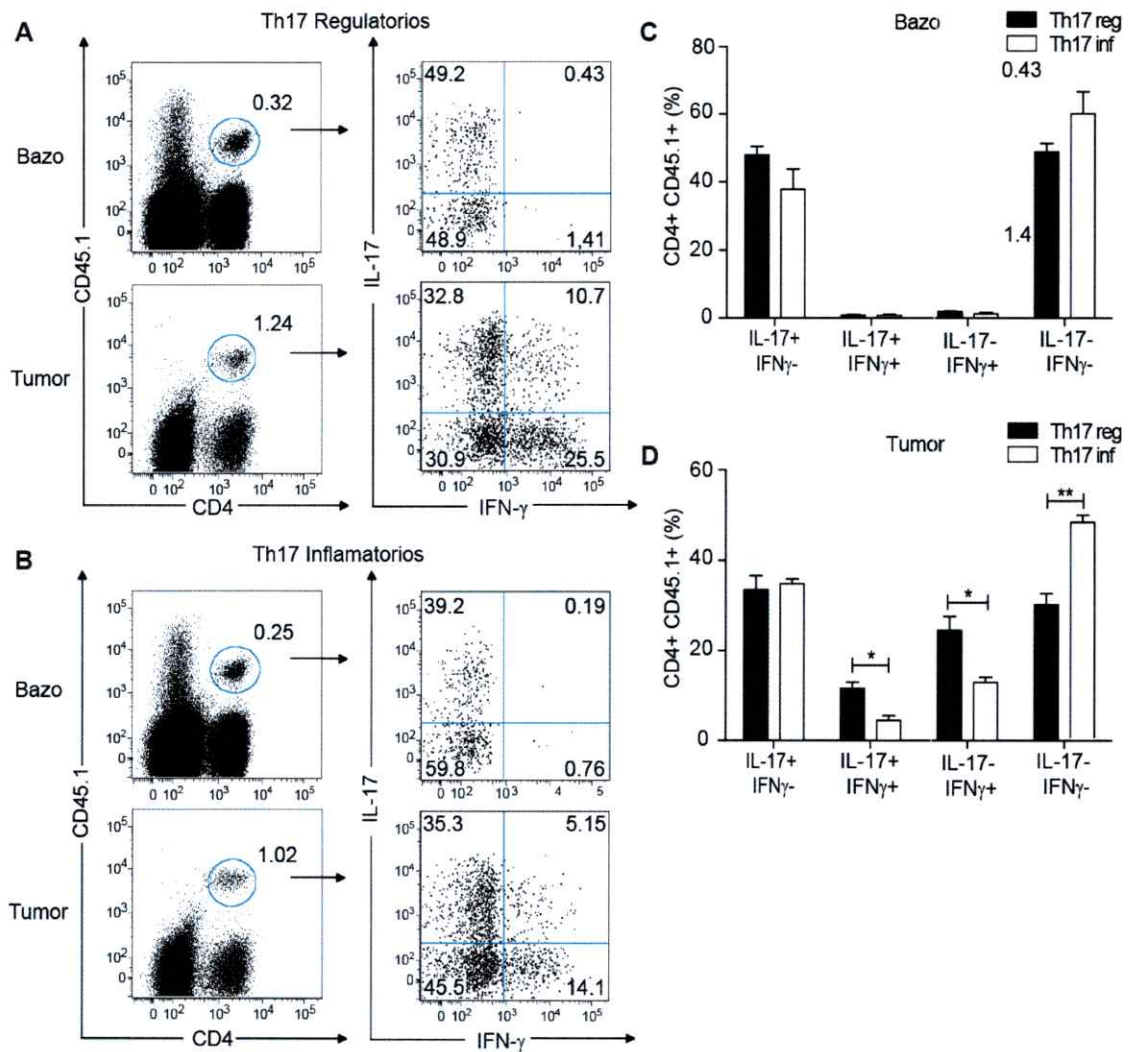


Figura 8. Las células Th17 transferidas a ratones con tumor son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN γ en el tumor.

Células Th17 regulatorias o inflamatorias específicas para OVA fueron generadas *in vitro* y sorteadas en base a la expresión de CD4, IL-17, CD39 y CD73. Luego, fueron transferidas a ratones congénicos ROR- γ ^{t^{gfp/gfp}} (CD45.2) inyectados con B16.OVA. Se analizó la adquisición de un fenotipo Th1 por parte de los linfocitos Th17 en el bazo y el tumor de los ratones inyectados con Th17 regulatorios (A) o Th17 inflamatorios (B) a los 14 días post transferidas las células. Se graficó el porcentaje de células transferidas (CD4⁺ CD45.1⁺) que expresan IL-17 y/o IFN- γ tanto en el bazo (C) como en el tumor (D) (n=4-8). Los datos se graficaron como la media \pm SEM. *p<0,05; **p<0,01; Test de Mann-Whitney.

8. Discusión

El sistema inmune tiene un rol fundamental durante el inicio y desarrollo del cáncer. Por una parte, tiene la capacidad de detectar y destruir células tumorales (Schreiber y col., 2011). Sin embargo, algunas células tumorales son capaces de evadir el sistema inmune y formar un tumor, el cual es capaz de reclutar células del sistema inmune con propiedades supresoras que favorecen el crecimiento tumoral. Debido a esto, es necesario conocer y estudiar el papel que juegan los diversos tipos de células inmunes que infiltran el tumor, entre los cuales se encuentran los linfocitos Th17.

Desde el descubrimiento de los linfocitos Th17 el año 2005 (Park y col., 2005; Harrington y col., 2005), se ha estudiado el rol de estos linfocitos en una variedad de enfermedades autoinmunes e inflamatorias, como por ejemplo: psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, asma, etc (Korn y col., 2009), en donde se les ha asignado un rol patogénico. Sin embargo, el rol que cumplen los linfocitos Th17 durante el desarrollo del cáncer sigue siendo controversial, asignándosele un rol pro o antitumoral en diversas investigaciones (Muranski y col., 2008; Gnerlich y col., 2010; Chalmin y col., 2012; Nuñez y col., 2013).

Las ectonucleotidasas CD39 y CD73 son dos enzimas capaces de hidrolizar el ATP extracelular y producir adenosina (Ghiringhelli y col., 2012), una molécula con propiedades inmunosupresoras (Huang y col., 1997). La expresión de estas ectonucleotidasas en linfocitos Treg ha sido descrito como uno de los mecanismos de

supresión de la respuesta inmune utilizado por estas células (Deaglio y col., 2007). Por otra parte, se ha descrito que linfocitos Th17 generados *in vitro* expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73 dependiendo de las citoquinas utilizadas al momento de la diferenciación (Chalmin y col., 2012). Estos antecedentes nos llevaron a plantear que estas podrían ejercer un rol protumoral en los linfocitos Th17.

En primer lugar, utilizando un modelo murino de melanoma, evaluamos la presencia de linfocitos Th17 en el tumor y demostramos que existe alrededor de un 2-3% de estos linfocitos en el tumor. A pesar de que los linfocitos Th17 representan una fracción pequeña comparada con otras poblaciones celulares asociadas al sistema inmune, datos en la literatura indican que los linfocitos Th17 tendrían un rol activo en la inmunidad antitumoral. (Qi y col., 2013).

Con el fin de caracterizar los linfocitos Th17 infiltrantes del tumor estudiamos la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Antecedentes en la literatura sugieren que las células Th17 expresan estas ectonucleotidasas y producen adenosina (Chalmin y col., 2012). Nuestros datos indican que los linfocitos Th17 son capaces de expresar CD73 en todos los órganos en los cuales se encuentran, sin embargo, no todos son capaces de expresar la ectonucleotidasa CD39. Al comparar los niveles de expresión de las ectonucleotidasas, mediante la comparación de la intensidad media de fluorescencia, no se detectaron diferencias en los niveles de expresión de CD73 entre los linfocitos Th17 del tumor y de aquellos presentes en TdLN y otros órganos linfoides periféricos. En concordancia con los datos de la literatura, nuestros datos demuestran que las células Th17 expresan estas ectonucleotidasas y que en el microambiente tumoral existe una mayor proporción de linfocitos Th17 CD39+CD73+

comparado a otros órganos linfoides, lo que podría relacionarse con un aumento en el número de linfocitos Th17 de memoria (Zhou y col., 2009; Moncrieffe y col., 2010)

De manera de dilucidar cuál es el papel de estas ectonucleotidasas en las células Th17, se comparó la expresión de CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 con la expresión de las ectonucleotidasas en los linfocitos Treg y Th1. Nuestros datos indican que en el tumor los linfocitos Th17 expresan niveles similares de CD73 y menores niveles de CD39 que los linfocitos Tregs. Sorprendentemente, observamos que las células Th1, células clave en la respuesta antitumoral, presentan mayores niveles de expresión de CD39 que las células Th17, en todos los órganos analizados y tumor. Este resultado permite especular que la expresión de CD39 no necesariamente está relacionada con la generación de adenosina y la inmunosupresión. En esta línea, algunos reportes en la literatura indican que CD39 es un marcador de activación, ya que se puede detectar su expresión en linfocitos T y B activados *in vitro* (Kansas y col., 1991; Maliszewski y col., 1994) mientras que otros grupos asocian esta molécula a un fenotipo de memoria (Zhou y col., 2009; Moncrieffe y col., 2010). Por lo mismo, el aumento de los linfocitos Th17 CD39+CD73+ en el tumor podría deberse a un incremento en el reclutamiento o proliferación de linfocitos Th17 de memoria o a un aumento en el estado de activación de estos linfocitos.

Para determinar si la expresión de CD39 y CD73 podría determinar un fenotipo de linfocito Th17 con características inmunosupresoras, se generaron linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios, los que difieren en los niveles de expresión de las ectonucleotidasas. Los linfocitos Th17 que fueron generados en presencia de TGF- β 1,

IL-6 e IL-1 β , y luego re-estimulados en presencia de TGF- β 1 e IL-6 (Th17 regulatorios), expresaron mayores niveles de las ectonucleotidasas CD39 y CD73. Se ha descrito que la IL-6 activa al factor de transcripción STAT3, el cual se une al promotor de CD39 y CD73 e induce su expresión (Chalmin y col., 2012). Al mismo tiempo, TGF- β 1 es capaz de disminuir la expresión del factor de transcripción GFI, el cual reprime la expresión de CD39 y CD73 (Chalmin y col., 2012). Por otra parte, los linfocitos Th17 que fueron generados con TGF- β 3, IL-6 e IL-1 β , y luego re-estimulados en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23 (Th17 inflamatorios), expresan niveles bajos de CD39 y CD73. En este protocolo la ausencia de TGF- β 1 sería la responsable de reprimir a través de la expresión de GFI. Ambos protocolos de generación de linfocitos Th17 generan células que secretan cantidades prácticamente iguales de IL-17. En cuanto al patrón de secreción de otras citoquinas, nuestros resultados indican que los linfocitos Th17 regulatorios son capaces de secretar bajas cantidades de IL-10, mientras que los linfocitos Th17 inflamatorios casi no secretan IL-10. Además, los linfocitos Th17 regulatorios secretan mayores cantidades de IFN- γ e IL-2. Estudios transcripcionales han determinado que los linfocitos Th17 inducidos en presencia de TGF- β 1 e IL-6 aumentan la expresión de genes involucrados en la producción de IL-10 (Lee y col., 2012). Incluso, debido a la ausencia de IL-23, estos linfocitos Th17 se caracterizan por tener un fenotipo menos estable, ya que la re-estimulación del TCR en estos linfocitos induce la producción de IFN- γ (Yang y col., 2009). Por otra parte, los linfocitos Th17 inflamatorios secretan mayores cantidades de la citoquina inflamatoria GM-CSF, lo que se relaciona directamente al efecto de la IL-23 y del TGF- β 3. Se ha descrito que el TGF- β 3 es capaz de inducir un perfil patogénico en los linfocitos Th17, aumentando los

niveles de expresión del receptor de IL-23 (Lee y col., 2012), y a su vez, la IL-23 es capaz de inducir la expresión de GM-CSF (El-Behi y col., 2011)

Al evaluar mediante ensayos de supresión *in vitro* si los linfocitos Th17 regulatorios tienen propiedades inmunosupresoras debido a la expresión de CD39 y CD73, encontramos que los linfocitos Th17 regulatorios no tienen un efecto inmunosupresor sobre linfocitos T CD4+. Esto se contradice a lo descrito en la literatura, en donde se ha demostrado que los linfocitos Th17 CD39+CD73+ tienen una actividad inmunosupresora, inhibiendo la producción de IFN- γ en linfocitos T CD4+ y T CD8+ (Chalmin y col., 2012). Nuestros resultados demuestran que los linfocitos Th17 regulatorios así como los linfocitos Th17 inflamatorios no son capaces de retrasar la proliferación de linfocitos T CD4+, obteniéndose el mismo resultado cuando los linfocitos se encuentran separados en cámaras transwell. Esto indicaría que la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 no estaría relacionada con un mecanismo de inmunosupresión.

Para comprobar si la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 les confieren a los linfocitos Th17 un fenotipo inmunosupresor protumoral *in vivo*, se inyectaron linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios en ratones que habían desarrollado un tumor y demostramos que ambos tipos celulares tienen capacidad antitumoral ya que disminuyó el crecimiento de los tumores. La capacidad antitumoral de los linfocitos Th17 regulatorios se contradice con un estudio de Chalmin y Mignot (Chalmin y col., 2012), en el cual ellos afirman que los linfocitos Th17 que expresan CD39 y CD73 son protumorales. Sin embargo, hay que tener en cuenta que ellos utilizaron una línea tumoral distinta (EL-4) y linfocitos Th17 no específicos contra un

antígeno tumoral, mientras que los linfocitos Th17 que utilizamos en este trabajo son específicos contra un antígeno tumoral. Además, hay que considerar que en el presente trabajo se utilizaron ratones deficientes en linfocitos Th17 (ROR- $\gamma^{gfp/gfp}$), ratones en los cuales los tumores crecen más debido a una menor infiltración de linfocitos T CD4+ en el tumor (Nuñez y col., 2013). En la literatura existen trabajos que demuestran un rol antitumoral de linfocitos Th17 específicos contra antígenos del tumor, tanto en ratones normales como deficientes en células Th17 (Muranski y col., 2008; Nuñez y col., 2013).

Luego de transferir linfocitos Th17 inflamatorios o regulatorios en ratones que han desarrollado un tumor, observamos cambios en la expresión de CD39 y CD73 en ambos tipos de linfocitos Th17. Estos cambios producidos en la expresión de las ectonucleotidasas pueden deberse a una variedad de factores. En el tumor, la expresión de CD73 es regulada mediante hipoxia y por variadas citoquinas, las cuales pueden aumentar su expresión (prostaglandina E2, TGF- β e IL-6) o disminuirla (IFN- γ e IL-12) (Ghiringhelli y col., 2012). Debido a que CD39 es considerado un marcador de activación linfoide (Kansas y col., 1991; Maliszewski y col., 1994), el aumento de su expresión en el tumor podría indicar que las células que llegan al tumor se encuentran mucho más activadas que las que permanecen en otros órganos. Estos resultados confirman que la expresión de CD39 y CD73 en linfocitos Th17 no está relacionada con la capacidad de suprimir la respuesta inmune y sugieren que estas moléculas podrían cumplir otras funciones además de la generación de un ambiente inmunosupresor. Por una parte, la expresión de CD39 y CD73 se ha relacionado con un fenotipo de células de memoria (Zhou y col., 2009; Moncrieffe y col., 2010). Adicionalmente, la expresión

de las ectonucleotidasas permitiría a las células sobrevivir en ambientes ricos en ATP, como el tumor o sitios altamente inflamados (Borsellino y col., 2007). También, se ha descrito como un mecanismo para prevenir la apoptosis inducida por el incremento en la secreción de ATP luego de la estimulación vía TCR (Umansky y col., 2014). Incluso, se ha sugerido que la expresión de las ectonucleotidasas en los linfocitos T de memoria constituiría un mecanismo autocrino para prevenir una activación excesiva desfavorable para el organismo (Umansky y col., 2014). En este sentido, la expresión de CD39 por las células Th17 les podría conferir resistencia en ambientes saturados de ATP, como lo es el microambiente tumoral. Por otra parte, la expresión de CD73 podría impedir una activación excesiva en estas células mediante la generación de adenosina, permitiendo que los linfocitos Th17 sobrevivan más tiempo en el organismo.

Se ha descrito que la capacidad antitumoral de los linfocitos Th17 depende de la producción de IFN- γ (Muranski y col., 2008; Nuñez y col., 2013; Muranski y col., 2011), lo que se relaciona con el hecho de que los linfocitos Th17 han sido descritos como un tipo celular menos diferenciado, lo que les confiere una mayor capacidad de supervivencia y una mayor capacidad antitumoral que los linfocitos Th1 (Muranski y col., 2011). En cuanto al rol protumoral de los linfocitos Th17, este se ha asociado a la promoción de angiogénesis por la IL-17 (Hemdan, 2013) y al efecto de la producción de IL-6 y la consecuente activación del factor de transcripción STAT3 en el crecimiento tumoral (Wang y col., 2009). Sin embargo, la inducción de la angiogénesis podría estar relacionada con un aumento en el tráfico celular y migración de células dendríticas hacia el tumor y, en consecuencia, un aumento de la respuesta antitumoral (Hemdan, 2013). Incluso se ha descrito un rol beneficioso de la IL-17 durante los tratamientos con quimioterapia (Ma et al., 2011). Por lo tanto, sería un error igualar la actividad biológica

de la IL-17 con la función efectora de los linfocitos Th17, ya que la producción de IL-17 no es su única función.

Nuestros resultados muestran que tanto linfocitos Th17 regulatorios como inflamatorios pueden adquirir un fenotipo tipo Th1 productor de IFN- γ , específicamente en el tumor, lo que confirma la gran plasticidad de este linaje de linfocitos T helper. La secreción de IL-12 e IL-23 por parte de las células dendríticas en el tumor (Langowski y col., 2006), influiría en la adquisición de un fenotipo tipo Th1 en los linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios, ya que se ha demostrado que la estimulación crónica de linfocitos Th17, ya sea con IL-12 o IL-23, induce además la expresión de IFN- γ y el factor de transcripción maestro de los linfocitos Th1, T-bet (Wang y col., 2014; Duhon y col., 2013). Interesantemente, los linfocitos Th17 regulatorios se transforman más a productores de IFN- γ que los linfocitos Th17 inflamatorios. Se ha demostrado que los linfocitos Th17 diferenciados en presencia de TGF- β e IL-6 son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN- γ al ser re-estimulados con su antígeno (Yang y col., 2009). Sin embargo, es interesante notar el nexo entre la expresión de CD39 y la capacidad de producir IFN- γ . Solo los linfocitos Th17 regulatorios secretan IFN- γ *in vitro*, y un mayor porcentaje de estas células es capaz de adquirir un fenotipo Th1 productor de IFN- γ *in vivo*. Por otra parte, los linfocitos Th17 inflamatorios sólo son capaces de producir IFN- γ en el tumor, lugar en el cual adquieren la expresión de CD39. Esto hace pensar que una mayor expresión de CD39 podría relacionarse con un mayor estado de activación de las células, lo que podría estar directamente relacionado con la capacidad de los linfocitos Th17 de adquirir un fenotipo tipo Th1 y producir IFN- γ , facilitando la plasticidad de los linfocitos Th17.

9. Resumen de Resultados

En resumen los resultados más importantes de este seminario de título son:

- Los linfocitos Th17 infiltran el tumor en un modelo murino de melanoma.
- Los linfocitos Th17 presentes en el tumor y en los órganos linfoides secundarios expresan las ectonucleotidasas CD39 y CD73.
- Se generaron *in vitro* linfocitos Th17 regulatorios o inflamatorios, los cuales difieren en la expresión de CD39 y CD73 (alta o baja expresión de CD39 y CD73, respectivamente), siendo posible separar a los linfocitos Th17 mediante *cell sorting* según la expresión de estas ectonucleotidasas.
- Los linfocitos Th17 regulatorios y los linfocitos Th17 inflamatorios generados *in vitro* no tienen propiedades inmunosupresoras, si no por el contrario, tienen propiedades antitumorales.
- Luego de la transferencia adoptiva a ratones con tumor, los linfocitos Th17 regulatorios mantienen la expresión de CD39 y CD73 en el tumor, mientras que los linfocitos Th17 inflamatorios aumentan la expresión de CD39 y CD73 en el tumor.
- Luego de la transferencia adoptiva, los linfocitos Th17 regulatorios y los linfocitos Th17 inflamatorios son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN- γ en el tumor.

10. Conclusiones

Contrario a la hipótesis planteada, en este trabajo se demostró que la expresión de las ectonucleotidasas CD39 y CD73 en los linfocitos Th17 no les confiere un fenotipo inmunosupresor protumoral. Por el contrario, demostramos que tanto los linfocitos Th17 regulatorios como los inflamatorios tienen un rol antitumoral y que son capaces de adquirir un fenotipo productor de IFN- γ en el tumor.

11. Bibliografía

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai. 2008. Propiedades Generales de las Respuestas Inmunitarias. *In* *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier, Barcelona, España. 3–18.
- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783–801.
- Bastid, J., A. Cottalorda-Regairaz, G. Alberici, N. Bonnefoy, J.-F. Eliaou, and A. Bensussan. 2013. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. *Oncogene*. 32:1743–51.
- Beavis, P.A., J. Stagg, P.K. Darcy, and M.J. Smyth. 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 33:231–7.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Höpner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rötzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*. 110:1225–32.
- Brucklacher-Waldert, V., K. Steinbach, M. Lioznov, M. Kolster, C. Hölscher, and E. Tolosa. 2009. Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression. *J. Immunol*. 183:5494–501.
- Chalmin, F., G. Mignot, M. Bruchard, A. Chevriaux, F. Végran, A. Hichami, S. Ladoire, V. Derangère, J. Vincent, D. Masson, S.C. Robson, G. Eberl, J.R. Pallandre, C. Borg, B. Ryffel, L. Apetoh, C. Rébé, and F. Ghiringhelli. 2012. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity*. 36:362–73.
- Cosmi, L., L. Maggi, V. Santarlasci, F. Liotta, and F. Annunziato. 2014. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry. A*. 85:36–42.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.-F. Chen, K. Enjyoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J. Exp. Med.* 204:1257–65.
- De Simone, V., F. Pallone, G. Monteleone, and C. Stolfi. 2013. Role of TH17 cytokines in the control of colorectal cancer. *Oncoimmunology*. 2:e26617.
- Dolcetti, L., I. Marigo, B. Mantelli, E. Peranzoni, P. Zanovello, and V. Bronte. 2008. Myeloid-derived suppressor cell role in tumor-related inflammation. *Cancer Lett*. 267:216–25.

Dong, C. 2006. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nat. Rev. Immunol.* 6:329–33.

Duhen, R., S. Glatigny, C.A. Arbelaez, T.C. Blair, M. Oukka, and E. Bettelli. 2013. Cutting Edge: The Pathogenicity of IFN- γ – Producing Th17 Cells Is Independent of T-bet. *J. Immunol.* 190:4478–82.

Egeblad, M., E.S. Nakasone, and Z. Werb. 2010. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev. Cell.* 18:884–901.

Ei-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G.-X. Zhang, B.N. Dittel, and A. Rostami. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* 12:568–75.

Elinav, E., R. Nowarski, C. a Thaiss, B. Hu, C. Jin, and R. a Flavell. 2013. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat. Rev. Cancer.* 13:759–71.

Ghiringhelli, F., M. Bruchard, F. Chalmin, and C. Rébé. 2012. Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012:473712.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X.-P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.-W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O’Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature.* 467:967–71.

Gnerlich, J.L., J.B. Mitchem, J.S. Weir, N. V Sankpal, H. Kashiwagi, B. a Belt, M.R. Porembka, J.M. Herndon, T.J. Eberlein, P. Goedegebuure, and D.C. Linehan. 2010. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol.* 185:4063–71.

Grinberg, S., G. Hasko, D. Wu, and S.J. Leibovich. 2009. Suppression of PLC β 2 by endotoxin plays a role in the adenosine A(2A) receptor-mediated switch of macrophages from an inflammatory to an angiogenic phenotype. *Am. J. Pathol.* 175:2439–53.

Hanahan, D., and R.A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 144:646–74.

Harrington, L.E., R.D. Hatton, P.R. Mangan, H. Turner, T.L. Murphy, K.M. Murphy, and C.T. Weaver. 2005. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6:1123–32.

Hemdan, N.Y. a. 2013. Anti-cancer versus cancer-promoting effects of the interleukin-17-producing T helper cells. *Immunol. Lett.* 149:123–33.

Huang, S., S. Apasov, M. Koshiba, and M. Sitkovsky. 1997. Role of A2A Extracellular Adenosine Receptor-Mediated Signaling in Adenosine-Mediated Inhibition of T-Cell Activation and Expansion. *Blood*. 90:1600–1610.

Iida, T., M. Iwahashi, M. Katsuda, K. Ishida, M. Nakamori, M. Nakamura, T. Naka, T. Ojima, K. Ueda, K. Hayata, Y. Nakamura, and H. Yamaue. 2011. Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol. Rep.* 25:1271–7.

Janeway, C. a, and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.

Joyce, J.A., and J.W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer.* 9:239–52.

Junger, W.G. 2011. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 11:201–12.

Kansas, G.S., G.S. Wood, and T.F. Tedder. 1991. Expression , Distribution , and Biochemistry of Human CD39: Role in Activation-Associated Homotypic Adhesion o f Lymphocytes '. *J. Immunol.* 146:2235–2244.

Kapsenberg, M.L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984–93.

Khader, S.A., S.L. Gaffen, and J.K. Kolls. 2009. Th17 cells at the crossroads of innate and adaptive immunity against infectious diseases at the mucosa. *Mucosal Immunol.* 2:403–11.

Kim, J.M. 2010. Molecular mechanisms of regulatory T cell development and suppressive function. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 92:279–314.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485–517.

Kryczek, I., M. Banerjee, P. Cheng, L. Vatan, W. Szeliga, S. Wei, E. Huang, E. Finlayson, D. Simeone, T.H. Welling, A. Chang, G. Coukos, R. Liu, and W. Zou. 2009. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood*. 114:1141–9.

Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, S. Altuwajri, W. Szeliga, J. Kolls, A. Chang, and W. Zou. 2007. Cutting edge: Th17 and regulatory T cell dynamics and the regulation by IL-2 in the tumor microenvironment. *J. Immunol.* 178:6730–3.

Kuang, D.-M., C. Peng, Q. Zhao, Y. Wu, M.-S. Chen, and L. Zheng. 2010. Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma promote expansion of memory T helper 17 cells. *Hepatology*. 51:154–64.

- Kumar, V. 2013. Adenosine as an endogenous immunoregulator in cancer pathogenesis: where to go? *Purinergic Signal*. 9:145–65.
- Lakshmi-Narendra, B., K. Eshvendar Reddy, S. Shantikumar, and S. Ramakrishna. 2013. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm. Res*. 62:823–34.
- Langowski, J.L., X. Zhang, L. Wu, J.D. Mattson, T. Chen, K. Smith, B. Basham, T. McClanahan, R. a Kastelein, and M. Oft. 2006. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature*. 442:461–5.
- Lee, Y., A. Awasthi, N. Yosef, F.J. Quintana, S. Xiao, A. Peters, C. Wu, M. Kleinewietfeld, S. Kunder, D. a Hafler, R. a Sobel, A. Regev, and V.K. Kuchroo. 2012. Induction and molecular signature of pathogenic TH17 cells. *Nat. Immunol*. 13:991–9.
- Lin, W., and M. Karin. 2007. A cytokine-mediated link between innate immunity , inflammation , and cancer. *J. Clin. Invest*. 117:1175–1183.
- Ma, Y., L. Aymeric, C. Locher, S.R. Mattarollo, N.F. Delahaye, P. Pereira, L. Boucontet, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, N. Casares, J.J. Lasarte, G. Matsuzaki, K. Ikuta, B. Ryffel, K. Benlagha, A. Tesnière, N. Ibrahim, J. Déchanet-Merville, N. Chaput, M.J. Smyth, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2011. Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J. Exp. Med*. 208:491–503.
- Maddur, M.S., P. Miossec, S. V Kaveri, and J. Bayry. 2012. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am. J. Pathol*. 181:8–18.
- Maliszewski, C.R., J. Guy, M.A. Schoenborn, R.J. Armitage, W.C. Fanslow, T. Nakajima, E. Baker, G.R. Sutherland, K. Poindexter, C. Birks, A. Alpert, D. Friend, S.D. Gimpel, and R.B.G. III. 1994. The CD39 Lymphoid Cell Activation Antigen. *J. Immunol*. 153:3574–3583.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature*. 454:436–44.
- Miller, J.S., T. Cervenka, J. Lund, I.J. Okazaki, and J. Moss. 1999. Purine metabolites suppress proliferation of human NK cells through a lineage-specific purine receptor. *J. Immunol*. 162:7376–82.
- Miossec, P., T. Korn, and V.K. Kuchroo. 2009. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med*. 361:888–98.
- Moncrieffe, H., K. Nistala, Y. Kamhieh, J. Evans, A. Eddaoudi, S. Eaton, and L.R. Wedderburn. 2010. High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J. Immunol*. 185:134–43.

Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. Th1 and Th2 cells: Different Patterns of Lymphokine Functional Properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145–173.

Muranski, P., A. Boni, P. a Antony, L. Cassard, K.R. Irvine, A. Kaiser, C.M. Paulos, D.C. Palmer, C.E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C.S. Hinrichs, K.W. Kerstann, L. Feigenbaum, C.-C. Chan, and N.P. Restifo. 2008. Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood.* 112:362–73.

Muranski, P., Z. a Borman, S.P. Kerkar, C. a Klebanoff, Y. Ji, L. Sanchez-Perez, M. Sukumar, R.N. Reger, Z. Yu, S.J. Kern, R. Roychoudhuri, G. a Ferreyra, W. Shen, S.K. Durum, L. Feigenbaum, D.C. Palmer, P. a Antony, C.-C. Chan, A. Laurence, R.L. Danner, L. Gattinoni, and N.P. Restifo. 2011. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity.* 35:972–85.

Murugaiyan, G., and B. Saha. 2009. Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J. Immunol.* 183:4169–75.

Novitskiy, S. V, S. Ryzhov, R. Zaynagetdinov, A.E. Goldstein, Y. Huang, O.Y. Tikhomirov, M.R. Blackburn, I. Biaggioni, D.P. Carbone, I. Feoktistov, and M.M. Dikov. 2008. Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood.* 112:1822–31.

Núñez, S., J.J. Saez, D. Fernandez, F. Flores-Santibañez, K. Alvarez, G. Tejon, P. Ruiz, P. Maldonado, Y. Hidalgo, V. Manriquez, M.R. Bono, M. Roseblatt, and D. Sauma. 2013. T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology.* 139:61–71.

Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng. 2008. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity.* 28:454–67.

Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.-H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat. Immunol.* 6:1133–41.

Pulte, E.D., M.J. Broekman, K.E. Olson, J.H.F. Drosopoulos, J.R. Kizer, N. Islam, and A.J. Marcus. 2007. CD39/NTPDase-1 activity and expression in normal leukocytes. *Thromb. Res.* 121:309–17.

Qi, W., X. Huang, and J. Wang. 2013. Correlation between Th17 cells and tumor microenvironment. *Cell. Immunol.* 285:18–22.

Quail, D.F., and J.A. Joyce. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat. Med.* 19:1423–37.

Resta, R., Y. Yamashita, and L.F. Thompson. 1998. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol. Rev.* 161:95–109.

Ryzhov, S., S. V Novitskiy, A.E. Goldstein, A. Biktasova, M.R. Blackburn, I. Biaggioni, M.M. Dikov, and I. Feoktistov. 2011. Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b+Gr1+ cells. *J. Immunol.* 187:6120–9.

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155:1151–64.

Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth. 2011. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science.* 331:1565–70.

Sfanos, K.S., T.C. Bruno, C.H. Maris, L. Xu, C.J. Thoburn, A.M. DeMarzo, A.K. Meeker, W.B. Isaacs, and C.G. Drake. 2008. Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. *Clin. Cancer Res.* 14:3254–61.

Su, X., J. Ye, E.C. Hsueh, Y. Zhang, D.F. Hoft, and G. Peng. 2010. Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. *J. Immunol.* 184:1630–41.

Umansky, V., I. Shevchenko, A. V Bazhin, and J. Utikal. 2014. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol. Immunother.* 63:1073–80.

Vignali, D. a a, L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nat. Rev. Immunol.* 8:523–32.

Visser, K.E. de, A. Eichten, and L.M. Coussens. 2006. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat. Rev. Cancer.* 6:24–37.

Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D.M. Pardoll, D. Zeng, and H. Yu. 2009. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J. Exp. Med.* 206:1457–64.

Wang, Y., J. Godec, K. Ben-aissa, K. Cui, K. Zhao, A.B. Pucsek, Y.K. Lee, C.T. Weaver, R. Yagi, and V. Lazarevic. 2014. The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. *Immunity.* 40:1–12.

Wilke, C.M., I. Kryczek, S. Wei, E. Zhao, K. Wu, G. Wang, and W. Zou. 2011. Th17 cells in cancer: help or hindrance? *Carcinogenesis.* 32:643–9.

Yang, Y., J. Weiner, Y. Liu, A.J. Smith, D.J. Huss, R. Winger, H. Peng, P.D. Cravens, M.K. Racke, and A.E. Lovett-Racke. 2009. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J. Exp. Med.* 206:1549–64.

Yu, P., Y. Lee, W. Liu, T. Krausz, A. Chong, H. Schreiber, and Y.-X. Fu. 2005. Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. *J. Exp. Med.* 201:779–91.

Zamarron, B.F., and W. Chen. 2011. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int. J. Biol. Sci.* 7:651–8.

Zarek, P.E., C.-T. Huang, E.R. Lutz, J. Kowalski, M.R. Horton, J. Linden, C.G. Drake, and J.D. Powell. 2008. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood.* 111:251–9.

Zhang, B., G. Rong, H. Wei, M. Zhang, J. Bi, L. Ma, X. Xue, G. Wei, X. Liu, and G. Fang. 2008. The prevalence of Th17 cells in patients with gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 374:533–7.

Zhou, L., I.I. Ivanov, R. Spolski, R. Min, K. Shenderov, T. Egawa, D.E. Levy, W.J. Leonard, and D.R. Littman. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8:967–74.

Zhou, Q., J. Yan, P. Putheti, Y. Wu, X. Sun, V. Toxavidis, J. Tigges, N. Kassam, K. Enjoji, S.C. Robson, T.B. Strom, and W. Gao. 2009. Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am. J. transplantation.* 9:2303–11.

Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul. 2010. Differentiation of effector CD4 T cell populations. *Annu. Rev. Immunol.* 28:445–89.

Zou, W., and N.P. Restifo. 2010. T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 10:248–56.