



TESIS DOCTORAL

Análisis de la expresión de checkpoints, receptores activadores y proteínas citotóxicas intracelulares en células Natural Killer, células NKT-like y linfocitos T en pacientes de Leucemia Mieloide Aguda

ISABEL VALHONDO GARCÍA

Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

2021

TESIS DOCTORAL

Análisis de la expresión de checkpoints, receptores activadores y proteínas citotóxicas intracelulares en células Natural Killer, células NKT-like y linfocitos T en pacientes de Leucemia Mieloide Aguda

ISABEL VALHONDO GARCÍA

Conformidad de la Directora de la Tesis:

Fdo.: Raquel Tarazona Lafarga

Doctorado en Biomarcadores de Salud y Estados Patológicos

2021

A la memoria de mi Grandmadre, Josefa Torres de la Riva,

Fallecida el 12 de septiembre del 2009 de Leucemia.

Mis alas en este y cada uno de mis Vuelos

Gracias, Siempre.

El Grupo de investigación *Inmunopatología Tumoral (INPATT)* en el que se ha desarrollado este trabajo está financiado por el proyecto SAF2017-87538-R del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades y las ayudas de la Junta de Extremadura (IB16164 y GR18085), cofinanciados por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



Fondo Europeo de Desarrollo Regional
Una manera de hacer Europa



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
I. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA.....	2
I.1 Historia de la LMA.....	3
I.2 Clasificación de la LMA.....	4
I.3 Epidemiología.....	7
I.4 Clínica y diagnóstico.....	7
I.5 Pronóstico de la LMA.....	8
I.6 Tratamiento de la LMA.....	8
I.7 Terapia dirigida a mutaciones genéticas y epigenéticas.....	12
I.8 Nuevas perspectivas en los tratamientos de la LMA.....	14
II. SISTEMA INMUNITARIO y LMA.....	15
II.1 Células Natural Killer.....	20
II.2 Células NKT-like.....	22
II.3 Células T $\alpha\beta$	23
III RECEPTORES DE LINFOCITOS.....	24
III.1 CD56.....	25
III.2 CD16.....	25
III.3 NCRs.....	26
III.4 NKp80.....	28
III.5 NKG2D.....	29
III.6 CD6.....	31
III.7 CD244.....	32
III.8 Receptores de Moléculas de MHC-I.....	33
III.8.a KIR.....	33
III.8.b CD85j.....	35
III.8.c NKG2A/C.....	36
III.9 Receptores de Nectinas.....	37
III.9.a DNAM-1.....	38
III.9.b TIGIT.....	38
III.9.c TACTILE.....	39
III.9.d PVRIG.....	40
III.10 PD-1.....	41
III.11 TIM3.....	42
III.12 LAG3.....	44
IV. INMUNOTERAPIA.....	46
IV.1 Anticuerpos Terapéuticos en LMA.....	47
IV.2 Vacunas de péptidos.....	54

IV.3 Terapia Adoptiva Celular.....	54
IV.4 Células modificadas con receptores quiméricos (CAR).....	57
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	59
MATERIALES Y MÉTODOS	61
RESULTADOS	72
V.1 ANÁLISIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS	73
a) Linfocitos	73
b) Células NK.....	74
c) Células NKT-like y células T.....	76
d) Análisis de supervivencia: Poblaciones linfocitarias	78
e) Análisis de poblaciones positivas para el marcador CD57	79
V.2 ANÁLISIS DE RECEPTORES DE SUPERFICIE	80
a) Análisis de CD16	80
b) Análisis de NCRs	82
c) Análisis de NKp80	88
d) Análisis de NKG2D	90
e) Análisis de CD6	93
f) Análisis de CD244	95
g) Análisis de KIRs	97
h) Análisis de CD85j	99
i) Análisis de NKG2C y NKG2A.....	101
j) Receptores de Nectinas: DNAM-1, TIGIT y TACTILE	105
K) Análisis de la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1	116
l) Análisis de correlaciones: receptores de superficie	128
V.3 MÉDULA ÓSEA	135
V.4 FENOTIPO DE BLASTOS.....	140
V.5 PROTEÍNAS CITOTÓXICAS INTRACELULARES	148
RESUMEN DE RESULTADOS	156
DISCUSIÓN.....	160
CONCLUSIONES.....	186
BIBLIOGRAFÍA.....	189
ANEXOS	216
a) Índice de figuras	217
b) Índice de Tablas.....	220
c) Abreviaturas.....	221
d) Publicaciones.....	222

RESUMEN

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia mieloide maligna caracterizada por un mal pronóstico y una baja supervivencia. Diferentes alteraciones descritas en las células NK y T limitan el control de los blastos.

El objetivo del presente estudio fue analizar la expresión de checkpoints, receptores activadores y proteínas citotóxicas intracelulares en las células NK, NKT-like (CD3+CD56+) y T (CD3+CD56-) de los pacientes de LMA. El análisis se realizó mediante citometría de flujo en 36 pacientes recién diagnosticados de LMA.

Los resultados mostraron un aumento de la coexpresión de PD-1/TIM3 y TIGIT/TACTILE en las células NK y T de los pacientes de LMA que se asoció a una peor supervivencia. Igualmente, una mayor expresión de TIGIT y TACTILE en las células T se asoció a un peor pronóstico. Se observó también un incremento de la expresión de NKG2A en las células NK.

En los resultados también se observó un descenso en la expresión de DNAM-1, CD6 y NKp80 en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA al compararlo con los controles sanos. Además, las células NK presentaron una menor expresión de CD16 y la coexpresión de NKp46 y NKp30 se encontró disminuida.

La concentración intracelular de Granulicina y Granzima B en las células NK y NKT-like fue menor en los pacientes de LMA.

En conclusión, la expresión de checkpoints, la pérdida de expresión de receptores activadores y el descenso de la concentración intracelular de proteínas citotóxicas pueden contribuir al escape de los blastos leucémicos en los pacientes de LMA.

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematopoietic malignancy characterized by a poor prognosis and poor overall survival. Several alterations have been described in T and NK cells in AML patients that limit tumor control by the immune system.

The aim of this work was to analyze the expression of checkpoints, activating receptors and intracellular cytotoxic proteins in NK cells, NKT-like (CD3+CD56+) and T cells (CD3+CD56-) from AML patients. We have studied 36 AML patients at the time of diagnosis. The analysis was performed by flow cytometry.

Our results showed an increase in the co-expression of PD-1/TIM3 as well as TIGIT/TACTILE in NK and T cells from AML patients when compared with healthy controls that was associated with lower survival. High percentages of TIGIT+TACTILE+ T cells were also associated with lower survival. The expression of NKG2A in NK cells was also increased in AML patients.

We found a reduced expression of DNAM-1, CD6 and NKp80 in NK, NKT-like and T cells from AML patients when compared with healthy controls. In addition, NK cells from AML patients showed a lower expression of CD16 and the percentage of cells co-expressing NKp46 and NKp30 was also reduced.

The intracellular concentration of Granulysin and Granzyme B decreased in the NK and NKT-like cells from AML patients.

In conclusion, the increased expression of several checkpoints, the downregulation of activating receptors as well as the decrease of intracellular cytotoxic proteins in NK cells and T cells from AML patients may contribute to tumor escape.

INTRODUCCIÓN

I. LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una neoplasia clonal mieloide, originada por la acumulación de una serie de mutaciones genéticas y epigenéticas en una célula madre hematopoyética que impiden su diferenciación, pero no su proliferación. Estas células inmaduras denominadas blastos se infiltran en la médula ósea, sangre periférica y tejidos, e impiden la formación de células sanguíneas funcionales ¹. La leucemia es considerada aguda cuando hay una hiperproliferación de blastos superior al 20% en la médula ósea y mieloide cuando la expansión clonal es a partir de precursores mieloides ². La expansión clonal e infiltración en la médula ósea de precursores mieloides inmaduros limita el proceso de hematopoyesis normal (Fig.1) e impide la formación de células funcionalmente maduras ³.

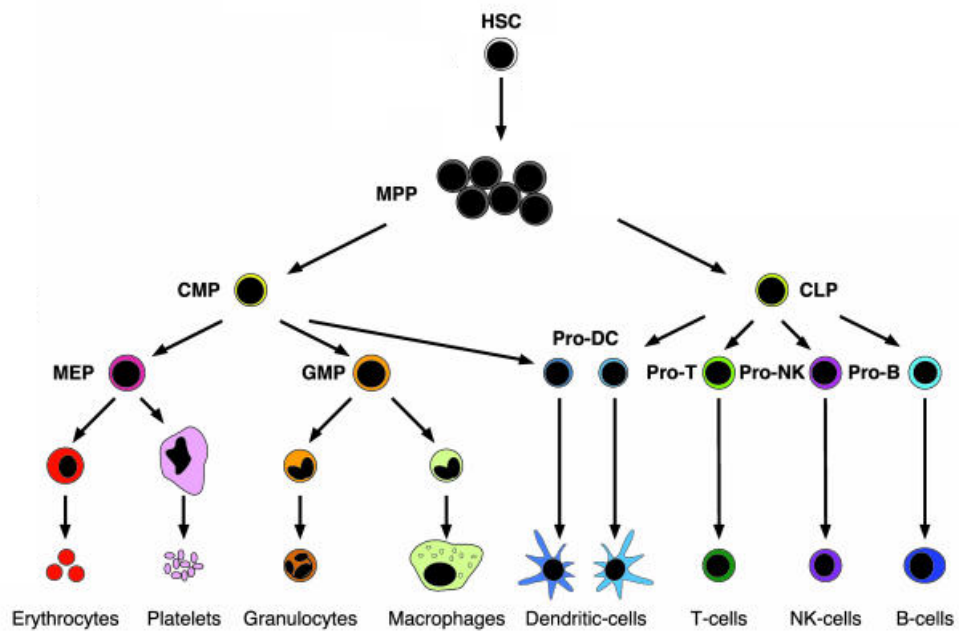


Figura 1: Proceso de Hematopoyesis. En el proceso normal de hematopoyesis, una célula madre hematopoyética (HSC) da lugar a progenitores multipotentes (MPP) que podrán diferenciarse bien en una célula progenitora mieloide (CMP) (que dan lugar a progenitores GMP, que se diferencian en monocitos / macrófagos y granulocitos, y MEP que se diferencian en plaquetas y eritrocitos) o bien en una célula progenitora linfóide (CLP) (que dan lugar a linfocitos T, linfocitos B y células asesinas naturales (NK)). Tanto las CMP como las CLP pueden dar lugar a células dendríticas. Fuente: Modificado de Passegué et al. 2003.

I.1 Historia de la LMA

La aceptación de la leucemia como una enfermedad independiente llevo muchos años de debate clínico-científico, A continuación se indica el año y los hechos de mayor relevancia hasta el establecimiento de sistemas para la caracterización de los blastos y la clasificación de los diferentes subtipos de LMA ^{4,5}.

❖ 1845

Bennett y Virchow describieron alteraciones en el color y consistencia de la sangre “blanca” de pacientes que habían fallecido.

❖ 1846

El Dr. Henry Fuller, diagnostica por primera vez con el uso del microscopio alteraciones en la sangre de un paciente en el hospital St. George's de Londres.

❖ 1852

Bennett publicó 35 casos clínicos de pacientes con alteraciones en la sangre.

❖ 1857

El patólogo Nikolaus Friedreich, utiliza por primera vez el término de leucemia aguda en una paciente que murió en tal solo 6 semanas.

❖ 1872

Neumann afirmaba que la leucemia era una enfermedad de la médula y que los glóbulos de la sangre periférica se derivaban de una célula ancestral.

❖ 1887

Paul Ehrlich, define la leucemia como una enfermedad primaria del sistema hematopoyético y la clasifica en mieloide y linfoide.


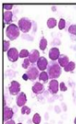


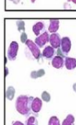

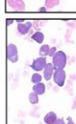

❖ 1900

El hematólogo suizo Naegeli caracteriza los mieloblastos y linfoblastos para el diagnóstico de las leucemias.

I.2 Clasificación de la LMA

En 1976 un grupo de expertos franceses, estadounidenses y británicos clasificaron las leucemias mieloides agudas en varios subtipos que iban desde la M1 a la M6. Pocos años después, basándose en marcadores inmunológicos se definieron dos nuevos subtipos la M0 y la M7. La Tabla I recoge estos 8 subtipos, las características morfológicas y la incidencia. Los subtipos de la M0 a la M5 presentan formas inmaduras de glóbulos blancos, la M6 de glóbulos rojos, mientras que la LMA M7 deriva de megacariocitos ^{6,7}

Tabla I: Clasificación de la LMA según FAB

LMA	Características Morfológicas	% incidencia
	➤ M0: LMA Indiferenciada : Los blastos no presentan una morfología mieloide caracterizada	<5 %
	➤ M1: LMA sin maduración : Las células tienen algo más de maduración que la M0 y la relación núcleo citoplasma es alta.	15-20%
	➤ M2: LMA Diferenciada o con Maduración : Los blastos presentan un núcleo irregular con nucléolos y citoplasma abundante granular	15-25%
	➤ M3: LMA Promielocítica : blastos con citoplasma hipergranular, El núcleo de los blastos es irregular y con frecuencia lobulado	5-10%
	➤ M4: LMA Mielomonocítica : Los blastos son de 2 tipos, unos son irregulares y de gran tamaño y otros redondos y medianos	20%
	➤ M5: LMA Monocítica : Los blastos son de gran tamaño y el núcleo suele tener forma de riñón y el citoplasma ligeramente granuloso.	10-20 %
	➤ M6: Eritroleucemia : El eritroblasto presenta un núcleo regular y son redondos	3-5%
	➤ M7: Megacarioblastica : Blastos irregulares de diferentes tamaños	<5 %

Fuente de las imágenes de LMA: Paz et al. 2017

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incorpora de manera continua hallazgos genéticos y características clínicas de la LMA en un intento por definir entidades biológicamente homogéneas que puedan facilitar el pronóstico y la elección del tratamiento en los pacientes de LMA ^{8,9}. La clasificación de la LMA según la OMS se recoge en la Tabla II.

Tabla II: Clasificación de la LMA según la OMS

LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS
<p>I. LMA con anomalías genéticas recurrentes</p> <ul style="list-style-type: none"> • LMA con t(8;21)(q22;q22), (RUNX1-RUNX1T1 ó AML1-ETO) • Leucemia promielocítica aguda con t(15;17)(q22;q21)(PML/RARα) • LMA con eosinófilos anormales en médula ósea con inv(16)(p13;q22) ó t(16;16)(p13;q22)(CBFβ/MHY11) • LMA con anomalías en 11q23 (MLL)
<p>II. LMA con características relacionadas con la displasia multilineal</p> <ul style="list-style-type: none"> • Secundaria a síndrome mielodisplásico previo • Sin antecedentes de síndrome mielodisplásico previo.
<p>III. LMA relacionada con la terapia ó secundaria al tratamientos previos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Relacionadas con tratamientos alquilantes/ radiaciones ionizantes. • Relacionadas con inhibidores de la topoisomerasa II • Otros
<p>IV. LMA no incluidas en otras categorías</p> <ul style="list-style-type: none"> • LMA mínimamente diferenciada (FAB= M0) • LMA sin maduración (FAB= M1) • LMA con maduración (FAB= M2) • LMA basofílica (FAB= M2 con basofilia) • LMA mielomonocítica (FAB= M4) • LMA monocítica (FAB= M5) • Eritroleucemia (FAB= M6) • LMA Megacariocítica (FAB= M7)
<p>V. Sarcoma Mieloide</p>
<p>VI. Proliferación Mieloide relacionada con el síndrome de Down</p>

En el año 2016, Papaemmanuil et al. ¹⁰ publicaron un análisis retrospectivo de mutaciones genéticas en más de 1500 pacientes de LMA para establecer subgrupos genómicos de LMA y su relación con la evolución de la enfermedad. La figura 2 muestra la frecuencia de aberraciones genéticas en los pacientes de LMA basado en dichos análisis ¹¹.

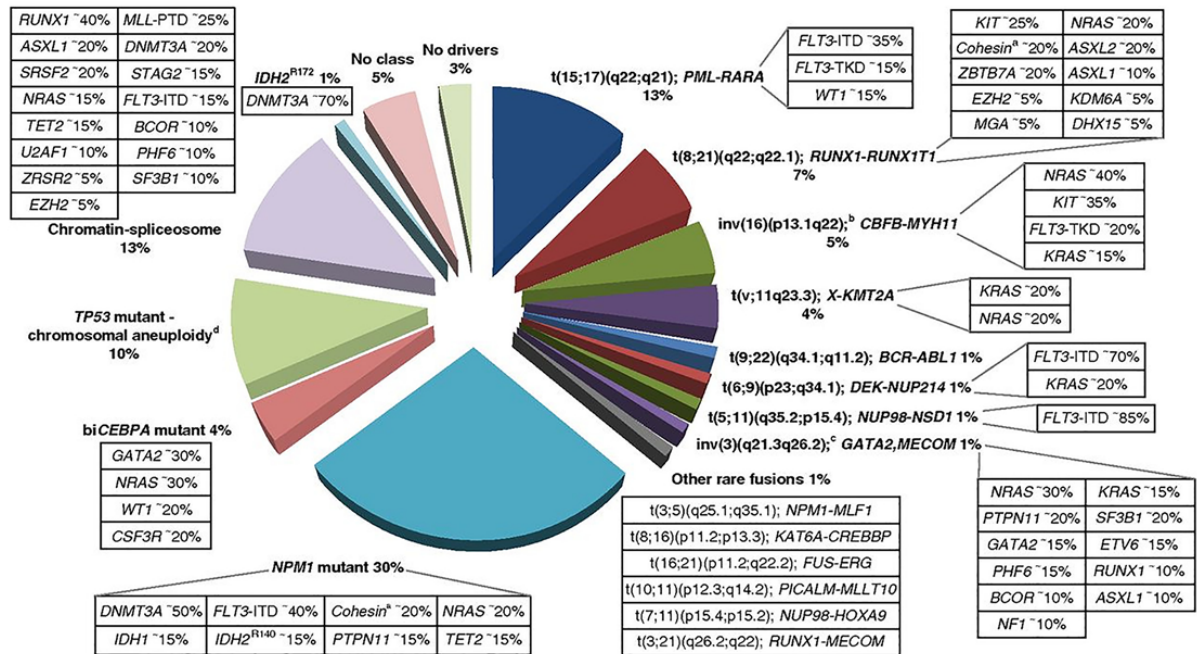


Figura 2: Clases moleculares de LMA y mutaciones genéticas concurrentes. En el gráfico circular se indican las clases de AML basadas en el estudio de Papaemmanuil et al. y en los cuadros las mutaciones concurrentes frecuentes. Los datos sobre la frecuencia de las mutaciones genéticas fueron recopilados de las bases de datos del British Medical Research Council (MRC), del German-Austrian AML Study Group (AMLSG) y de otros estudios seleccionados. La estructura del gráfico circular está adaptada de Grimwade et al., generada por Adam Ivey (King's College London, Londres, Reino Unido). Fuente: Döhner et al. 2017.

I.3 Epidemiología

La incidencia de nuevos casos de LMA al año es de aproximadamente 4,2 por 100.000 habitantes. La media de edad en el momento del diagnóstico es de unos 65 años. La frecuencia es mayor en hombres que en mujeres con una proporción de 5:3 ¹².

I.4 Clínica y diagnóstico

En los pacientes de LMA aparecen con frecuencia manifestaciones clínicas como la pérdida de peso o la palidez que alertan de la enfermedad. Las analíticas suelen mostrar citopenias inexplicables (disminución del recuento de glóbulos blancos, hemoglobina o plaquetas), LDH elevada, hiperuricemia, hiperfosfatemia, hipercalcemia, e hiperpotasemia. En ocasiones la acumulación de células leucémicas puede derivar en afecciones a nivel pulmonar, cardiovascular y a nivel del Sistema Nervioso Central ¹². La edad avanzada en los pacientes de LMA puede incrementar la aparición de infecciones recurrentes, debido a ciertas alteraciones habituales del sistema inmunitario como pudieran ser un recuento inferior al normal de glóbulos blancos maduros, glóbulos rojos y plaquetas ¹³. La edad también se asocia a anomalías cromosómicas y perfiles mutacionales altos ¹⁴.

En cuanto al diagnóstico de los pacientes de LMA las recomendaciones europeas establecen las siguientes pruebas ¹¹.

Pruebas para establecer el diagnóstico

- Recuento sanguíneo completo y diferencial
- Aspirado de médula ósea
- Inmunofenotipaje
- Análisis genético molecular

Pruebas adicionales en el momento del diagnóstico

- Análisis de comorbilidades
- Bioquímica, pruebas de coagulación, análisis de orina
- Hepatitis A, B, C; Prueba de VIH-1
- Radiografía de tórax, y electrocardiograma

I.5 Pronóstico de la LMA

Actualmente, el estudio para establecer una correlación entre la clínica y los resultados en los pacientes de LMA, se basa principalmente en valorar el riesgo citogenético según las mutaciones genéticas diagnosticadas ¹¹.

A continuación, en la Tabla III, se indica la clasificación del riesgo citogenético en los pacientes de LMA según las recomendaciones del *European Leukemia Net* (ELN) para el diagnóstico y el tratamiento de la LMA en adultos, publicada en 2010.

Tabla III: Clasificación del riesgo citogenético de la LMA (ELN 2017)

Riesgo Citogenético	Anomalía genética
FAVORABLE	t (8; 21) (q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
	inv (16) (p13.1q22) ot (16; 16) (p13.1; q22); <i>CBFB-MYH11</i>
	<i>NPM1</i> mutado sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD ^{bajo}
	<i>CEBPA</i> bialélica mutada
INTERMEDIO	<i>NPM1</i> mutado y <i>FLT3</i> -ITD ^{alto}
	<i>NPM1</i> de tipo salvaje sin <i>FLT3</i> -ITD o con <i>FLT3</i> -ITD ^{bajo}
	t (9; 11) (p21.3; q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>
	Anomalías citogenéticas no clasificadas como favorables o adversas
ADVERSO	t (6; 9) (p23; q34.1); <i>DEK - NUP214</i>
	t (v; 11q23.3); <i>KMT2A</i> reorganizado
	t (9; 22) (q34.1; q11.2); <i>BCR - ABL1</i>
	inv (3) (q21.3q26.2) o t (3; 3) (q21.3; q26.2); <i>GATA2</i> , <i>MECOM (EVI1)</i>
	-5 o del (5q); -7; -17 / abn (17p)
	Cariotipo complejo, § cariotipo monosómico
	<i>NPM1</i> de tipo salvaje y <i>FLT3</i> -ITD ^{alto}
	<i>RUNX1</i> mutado
	<i>ASXL1</i> mutado
<i>TP53</i> mutado	

I.6 Tratamiento de la LMA

Durante décadas el tratamiento de los pacientes de LMA se ha basado únicamente en dosis de quimioterapia (a excepción del tratamiento con ATRA en los pacientes de leucemia promielocítica aguda) y trasplante de médula ósea. Detallamos a continuación en qué consisten estos tratamientos.

a) Quimioterapia

El tratamiento de quimioterapia de la LMA se divide en dos fases:

- Fase de inducción

Esta primera fase del tratamiento tiene como objetivo reducir la infiltración de blastos en la médula ósea en menos de un 5%, usando para ello mielosupresores.

La terapia más utilizada en esta fase de inducción es la denominada 7+3, que combina un antibiótico con un inhibidor del ciclo celular. Comienza con la administración diaria de antineoplásicos derivados de la tetraciclina (idarrubicina o daunorrubicina) durante 3 días seguido de la administración diaria de 100-200mg/m² de citarabina (análogo de pirimidina) durante 7 días¹⁵.

La intensidad del tratamiento dependerá del estado de salud y la edad del paciente. La mayoría de los pacientes mayores de 70 años no pueden beneficiarse de los tratamientos de quimioterapia intensiva debido a la toxicidad y elevada muerte asociada al tratamiento. Aunque hay ensayos en pacientes mayores de 65 años que demuestran que a pesar de tener peor pronóstico, la terapia de inducción si mejora la supervivencia cuando la comparamos con tratamientos paliativos¹⁶.

En más de un 60% de los pacientes de LMA recién diagnosticados que son tratados con la terapia de inducción se consigue una remisión completa, mientras que otros requieren terapias de re-inducción que consiste en un ciclo único de mitoxantrona, etopósido y citarabina durante un período de 6 horas diarias durante 6 días (Régimen MEC)¹⁷.

- Fase de consolidación

Una vez que se ha logrado eliminar la mayor parte de los blastos con la terapia de remisión, se debe pasar a la siguiente fase de post remisión que evitará la recaída del paciente y eliminará las posibles células leucémicas residuales.

En pacientes con pronóstico favorable en este estadio de la enfermedad se recomienda 2-4 ciclos de quimioterapia de 6 dosis 1.5-6 g/m² de citarabina ¹⁸.

Existe un gran problema de tolerabilidad de los tratamientos intensivos en edades avanzadas ¹⁹ y para resolverlos se están probando diferentes dosis (por ejemplo con la daurubina) ²⁰ y combinaciones de fármacos como la denominada FLAG que incluye fludarabina (análogo de purina), citarabina y G-CSF (factor estimulante de colonias de granulocitos) ²¹.

En pacientes con LMA recidivante se está llevando a cabo un ensayo clínico con clofarabina oral (análogo de purina) en combinación con dosis bajas de citarabina ²²

En mayores de 60 años, las mejores tasas de supervivencia y remisión completa se han demostrado añadiendo cladribina (análogo de purina) en lugar de fludarabina al tratamiento estándar DAC (docetaxel en combinación con adriamicina y ciclofosfamida) o DAF5 (fluorouracilo, adriamicina y ciclofosfamida) ²³. En otro ensayo clínico (VALOR) en pacientes de LMA mayores de 60 años combina vasaroxin, un inhibidor de la topoisomerasa II, con citarabina ²⁴.

b) Tratamiento no quimioterapéutico: ATRA

El ácido all-trans retinoico es un derivado de la vitamina A que induce diferenciación y se usa como tratamiento logrando altas tasas de remisión completa, en los pacientes de Leucemia Promielocítica Aguda (LPA) típica, que se caracteriza por la expresión aberrante del gen de fusión PML-RARA generado por translocación cromosómica en pacientes portadores t(15; 17) (q24; q21). Los pacientes con LPA atípicas parecen tener un peor pronóstico que la LPA típica debido a la resistencia a ATRA. Actualmente, se han informado de varias fusiones RARA, RARB o RARG con al menos 17 genes asociados alternativos en pacientes con LPA, incluidos PLZF, NPM1, NUMA, STAT5B, PRKAR1A, BCOR, FIP1L1, OBFC2A, GTF2I, TBLR1, IRF2BP2, NUP98, FNDC3B , PML, STAT3, CPSF6 ²⁵.

c) Trasplante de progenitores hematopoyéticos

En pacientes con elevado riesgo de recaída suele considerarse el trasplante de células madre. Los progenitores hematopoyéticos pueden proceder de la médula ósea, de la sangre periférica o de cordón umbilical. El trasplante puede ser trasplante autólogo cuando los progenitores hematopoyéticos son del propio paciente y trasplante alogénico cuando proceden de un donante compatible ²⁶.

Los trasplantes alogénicos de donantes con incompatibilidad HLA en algún alelo son los que mejores resultados presentan para tratar las recaídas y las LMA recurrentes debido al efecto alorreactivo del injerto contra el tumor, si bien es cierto que dicho efecto puede perder cierta eficacia con el uso de los inmunosupresores y corticoides ²⁷.

La alorreactividad de las células NK puede mejorar la eficacia y seguridad del trasplante protegiendo a los pacientes contra la enfermedad injerto contra el huésped (EICH). Por el contrario en agotamiento de las células T alorreactivas previene la EICH ²⁸.

Los donantes alorreactivos de células NK cuyos ligandos de HLA-I carecen de receptor KIR en los pacientes se asocia a una menor tasa de recaída y una mejor supervivencia sin eventos en pacientes trasplantados en recaída y en remisión ²⁹.

En pacientes mayores pueden usarse incluso dosis menores de quimioterapia, con menor toxicidad, que no eliminan por completo las células del receptor y es el efecto injerto contra tumor, el que consigue que las células efectoras del donante eliminen las células tumorales del paciente ³⁰.

A pesar de que los resultados de los trasplantes de células madre hematopoyéticas son relativamente favorables, menos del 10% de los pacientes de LMA con edades avanzadas son sometidos a dichos tratamientos ¹⁹.

I.7 Terapia dirigida a mutaciones genéticas y epigenéticas

a) Terapia dirigida a mutaciones genéticas

Las mutaciones genéticas en FLT3, PLK (mutación PLK1 o sobreexpresión de MDR1(Gen de resistencia a multidroga, que codifica la proteína 1 de resistencia a multidrogas o glicoproteína P)) o NPM1 provocan alteraciones en el ciclo celular de las células leucémicas ³¹. Estos hallazgos han permitido el diseño de terapias dirigidas:

- Inhibidores de FLT-3

Hasta un 30% de los pacientes de LMA pueden presentar mutación en el gen FLT3 que codifica la proteína tirosina quinasa 3, implicada en diferentes rutas de señalización como son PI3K/AKT, JAK/STAT5 y RAS/RAF/MEK que controlan la proliferación y el ciclo celular ³². El tratamiento con inhibidores de FLT3 ha mostrado ser beneficioso incluso en pacientes que no tenían mutado el gen FLT3 ²²

Se ha sugerido que pudiera tener un efecto inmunomodulador administrado como terapia de mantenimiento después del trasplante alogénico ³³. Diferentes inhibidores de FLT3 están en ensayo clínico como tratamiento para los pacientes de LMA como son Quizartinib (NCT02668653), Gilteritinib (NCT02236013, NCT03836209) y Crenolanib (NCT02236013) ³⁴. Los resultados del uso de Sorafenib (inhibidor de FLT3 de segunda generación) en combinación con quimioterapia en pacientes de LMA de nuevo diagnóstico muestran mejoras significativas en la supervivencia de estos pacientes ^{22,35}

- Inhibidores de STAT

La fosforilación de STAT (Señales de Transducción y Activación de la Transcripción) promueve la expresión de genes en el núcleo. La activación continua de STAT3 se asocia a oncovirus como el virus de Epstein Barr ³⁶. Obp-31121 es un inhibidor de STA3 y STAT5 que ha demostrado efecto antitumoral frente a blastos de leucemia ³⁷.

- Inhibidores de PLK

Las quinasas tipo polo, es una familia de proteínas quinasas que intervienen en el ciclo celular y que se encuentra habitualmente sobreexpresada en LMA. Recientemente se ha descrito que los blastos pueden adquirir resistencia a los inhibidores de PLK, cuando se usa en monoterapia, mediada por la mutación del gen PLK1 y la sobreexpresión de MDR1 ³⁸.

b) Terapia dirigida a mutaciones epigenéticas

Las células tumorales presentan con frecuencia mutaciones en enzimas implicadas en procesos epigenéticos como la metilación del DNA y modificación de las histonas ³⁹. En los pacientes de LMA, por ejemplo, los genes PML-RAR y AML1-ETO intervienen en el mecanismo de metilación del DNA y en ocasiones están fusionados ⁴⁰.

En pacientes de LMA mayores de 65 años los tratamientos con agentes hipometilantes (HMA) están logrando altas tasas de remisión de la enfermedad ⁴¹. La guadecitabina está en ensayo clínico en fase III ⁴² y la sapacitabina en ensayo clínico en fase III ⁴³. También son utilizados tratamientos con inhibidores de la desacetilasas de histonas (HDACIs) que reprimen las modificaciones postraduccionales ⁴⁴.

Las mutaciones en los genes que codifican para las isocitrato deshidrogenasas IDH1/IDH2 son recurrentes en pacientes de LMA y provocan alteraciones en la regulación de la expresión génica y la hiperproliferación de células hematopoyéticas ³⁷. Enasinebib es un inhibidor de la IDH2, recientemente aprobado para el tratamiento de las recaídas de LMA y LMA recurrentes ⁴⁵. El inhibidor de la IDH2 Enasidenib (NCT03825796) y el inhibidor de la IDH1 Ivosidenib (NCT03839771) están en ensayo clínico como tratamiento de los pacientes de LMA ³⁴.

I.8 Nuevas perspectivas en los tratamientos de la LMA

La LMA es la leucemia aguda más común en adultos. El tratamiento estándar de quimioterapia, a pesar de lograr una remisión de entre el 50 a 75% de los casos, no es eficaz y la mayoría de los pacientes recaerán y morirán a causa de su enfermedad. A día de hoy el desarrollo de resistencia a la quimioterapia así como la enfermedad injerto contra el huésped en los pacientes trasplantados sigue siendo un gran problema para los pacientes de LMA y se necesitan opciones de tratamiento que consigan mejorar los resultados clínicos ⁴⁶. Recientemente numerosos estudios han centrado la atención en la capacidad del sistema inmunológico para prevenir el crecimiento tumoral y controlar la metástasis ⁴⁷

El término de la inmunovigilancia del cáncer comenzó a establecerse por el año 1908. Paul Ehrlich fue uno de los primeros científicos que propuso la capacidad del sistema inmunológico para reducir la frecuencia del cáncer. Cincuenta años más tarde Burnet proponía las propiedades antigénicas del cáncer como responsables de la inmunidad antitumoral y Thomas que la función principal del sistema inmunológica era proteger al huésped contra las células alteradas y la malignidad, en la década de los 70 Burnet y Thomas asumieron el importante papel de los linfocitos en la vigilancia del cáncer. En 1974 Zinkernagel y Doherty publicaron su trabajo pionero sobre la función del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y 20 años más tarde Shankaran et al. demostraron que los linfocitos no solo suprimen el crecimiento tumoral, sino que son capaces de reducir la inmunogenicidad del mismo ⁴⁸.

La aparición y desarrollo de la enfermedad de la LMA implica la incapacidad del sistema inmunológico de eliminar las células leucémicas, el fracaso de la inmunovigilancia y el triunfo de la inmuoedición del cáncer. El diseño de nuevas terapias biológicas basadas en la reactivación del sistema inmune amplía las posibilidades de tratamiento para los pacientes de LMA pudiéndose beneficiar también pacientes de edad avanzada que son particularmente susceptibles a la toxicidad de los tratamientos de quimioterapia convencionales ⁴⁹

II. SISTEMA INMUNITARIO y LMA

El sistema inmunitario juega un importante papel tanto en la inmunomodulación como en la progresión del cáncer, pero a menudo se encuentra inhibido e incapacitado para eliminar las células transformadas en los pacientes de LMA. A lo largo del tiempo las diferentes amenazas tanto internas como externas a las que se expone el cuerpo producen un deterioro gradual funcional de la capacidad del sistema inmunitario para responder a estímulos, lo que dificulta aún más el éxito en la eliminación de los blastos de LMA en pacientes de edades avanzadas⁵⁰.

El envejecimiento celular puede provocar daños en el DNA, mitocondrias disfuncionales, desregulaciones epigenéticas y acortamiento de telómeros de las células leucocitarias, así como cambios en el fenotipo induciendo fenotipos característicos de células exhaustas y anérgicas (Fig. 3).

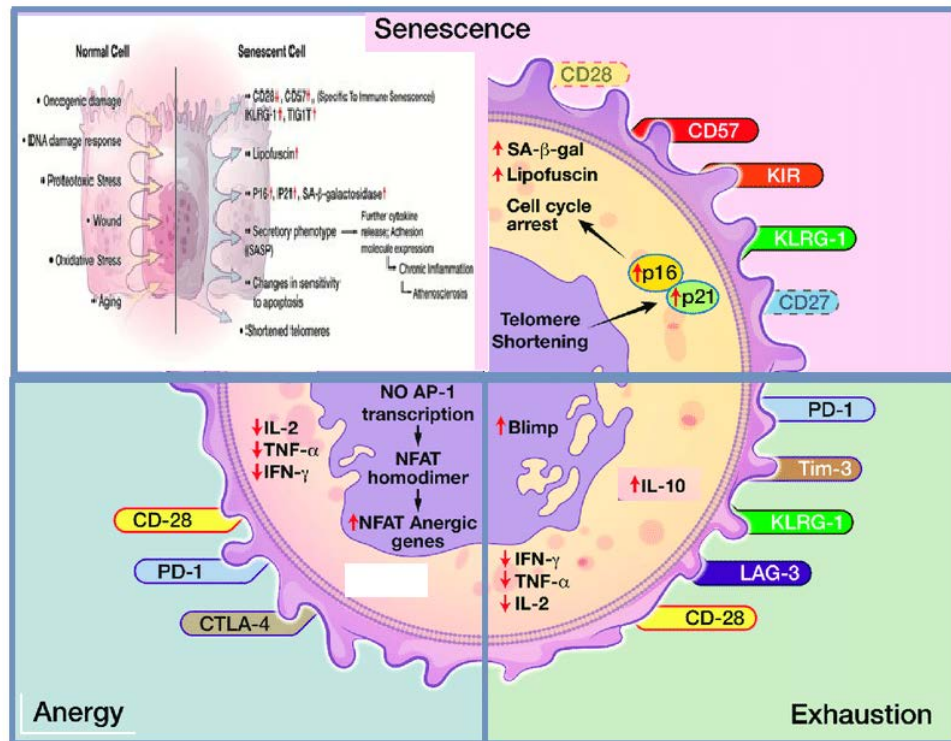


Figura 3: Cambios moleculares y de fenotipo celular asociados a la edad. Fuente: Modificado de Huff et al. 2019.

Las células senescentes presentan un fenotipo secretor de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, factores de crecimiento y proteasas característico denominado SASP (fenotipo secretor asociado a la senescencia). La acumulación de células secretoras con este fenotipo SASP promueve la secreción de moduladores del sistema inmunitario que provocan un deterioro de la inmunidad antitumoral ⁵¹.

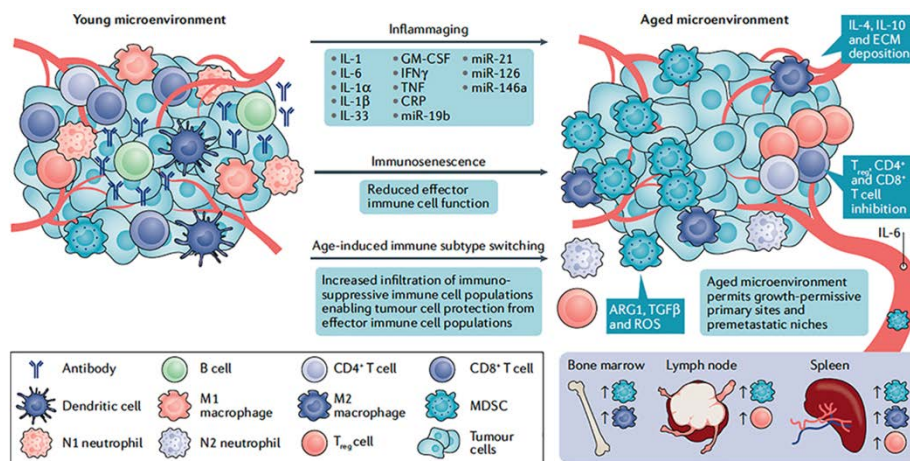


Figura 4: Cambios asociados a la edad como impulsores de la progresión tumoral. Disminuye el número de macrófagos M1, neutrófilos, células dendríticas, células B y la producción de anticuerpos específicos y aumenta el número de células supresoras derivadas de la estirpe mieloide (MDSC), macrófagos M2 y células linfoides exhaustas. Cambios en el microambiente que implican un aumento de la concentración de IL-4, IL-6, IL-10, ROS y TGF favorecen la progresión del cáncer. Fuente: Fane & Weeraratna (2019).

Un microentorno característico de inflamación y activación crónica deteriora aún más la capacidad de las células inmunitarias para responder a estímulos, disminuye la actividad citotóxica de los linfocitos, la capacidad funcional de los macrófagos y células dendríticas, recluta células mieloides inmaduras, promueve angiogénesis tumoral e induce la infiltración de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y células T reguladoras (Treg) en los tejidos y en la sangre ⁵².

Para evitar un microambiente que facilite el escape de células transformadas, el sistema inmunitario requiere de un equilibrio. Una de las estrategias tumorales para escapar de la inmunovigilancia es alterar el equilibrio (Fig. 5) entre la respuesta inmune Th1 (inmunidad celular) y la respuesta inmune Th2 (inmunidad humoral), resultando en una respuesta Th2 dominante.

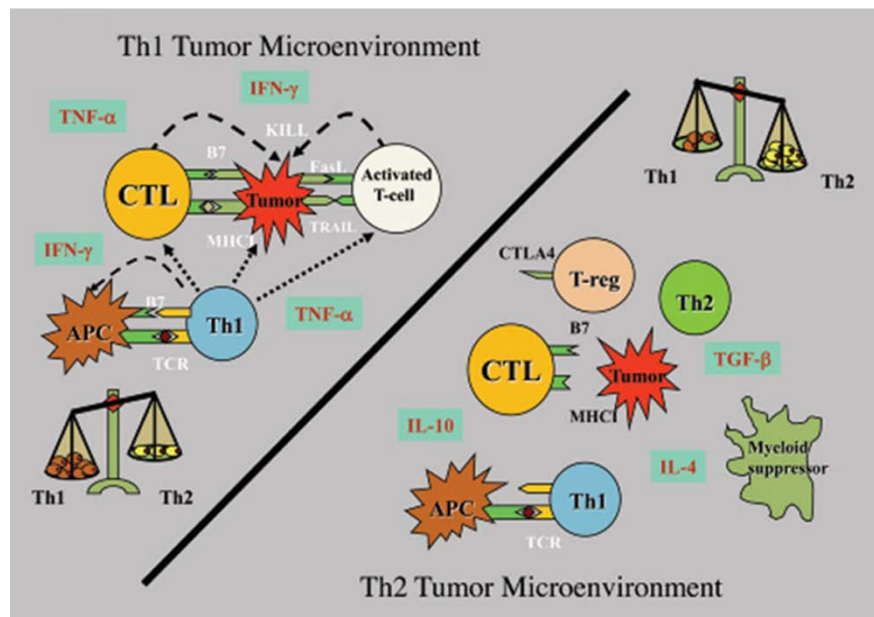


Figura 5: Microambiente Tumoral (Equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2). En presencia de citoquinas Th1, los tumores regulan positivamente moléculas que reclutan y estimulan macrófagos y células T citolíticas (CTL) para que reconozcan y destruyan los tumores. Además, el entorno inflamatorio Th1 puede inducir las células T para eliminar los tumores a través de moléculas efectoras como FasL y TRAIL. En presencia de citoquinas Th2 se atraen a las células supresoras mieloides y células Treg y se regula negativamente las moléculas coestimuladoras en las células presentadoras de antígenos (APC). Fuente: <https://www.isracast.com/exclusive-a-new-strategy-for-immunotherapy-of-cancer/>

En los pacientes de LMA se ha observado en el momento del diagnóstico un aumento del número de células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), una relación fenotípica de macrófagos M2/M1 elevada y una mayor infiltración de células Treg que se ha asociado a una menor supervivencia⁵³.

Las células B reguladoras (Breg) son un grupo de células B que regulan negativamente la actividad del sistema inmunitario secretando entre otras citoquinas, la IL-10. En los pacientes de LMA se ha encontrado una frecuencia mayor de células Breg (en sangre periférica y médula ósea) y se asocia a una supervivencia global más corta ⁵⁴.

Las citoquinas influyen muy directamente en la progresión de la LMA de tal manera que los mediadores proinflamatorios como IL-1 β , TNF- α e IL-6 potencian la agresividad de la leucemia mientras los mediadores antiinflamatorios como TGF- β frenan su desarrollo ⁵⁵. Nuestro grupo de investigación observó en pacientes de LMA una producción aberrante de las citoquinas proinflamatorias IL-6 y TNF- α y de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Niveles altos de IL-6 en los pacientes de LMA se correlacionaron con una supervivencia menor de los pacientes ⁵⁶.

La IL-2 juega un importante papel en la activación y el mantenimiento de la respuesta inmunitaria, así como en la promoción del desarrollo de linfocitos. Numerosos estudios han confirmado que la IL-2 activa a las células NK y mejora su actividad antitumoral de hecho la IL-2 como fármaco antitumoral para tratar los pacientes de LMA se usó por primera vez en la década de los 80 ⁵⁷. Otras citoquinas como la IL-12 y la IL-15 han dado resultados mejores con menor toxicidad que la IL-2 y también consiguen mejorar el perfil de expresión de los receptores activadores de las células NK y mejorar su citotoxicidad en los pacientes de LMA ^{58,59}.

La capacidad de las células NK para reconocer y eliminar las células leucémicas sin previa sensibilización ha sido descrita desde los principios de su descubrimiento, por lo que no es de extrañar los hallazgos posteriores que señalan una alteración de esta población en los pacientes de LMA tanto en número como en fenotipo y capacidad citotóxica ^{60,61}.

Otras de las células del sistema inmunitario innato que se ven alteradas durante la enfermedad de la LMA, son las células dendríticas. La interacción bidireccional entre las células NK y las células dendríticas es fundamental para crear sinergia con la respuesta inmunitaria adaptativa ^{62,63}.

Las células dendríticas son fundamentales para la activación y expansión de las células T $\gamma\delta$ después del trasplante hematopoyético alogénico. Las células T $\gamma\delta$ son un subtipo de células T con capacidades tanto adaptativas como innatas que ejercen un efecto antileucémico contra los blastos de LMA ⁶⁴, aunque se le ha adjudicado un papel dual a estas células al observar que las citoquinas secretadas por el tumor inducen a las células T $\gamma\delta$ a la secreción de IL17 que interactúa con los receptores de la IL17 e induce invasión, migración y proliferación del tumor. Por otro lado, la interacción de las células T $\gamma\delta$ que expresan PD-L1 induce el agotamiento en las células T $\alpha\beta$ PD-1+ ⁶⁵.

Las células NKT-like son un subconjunto de células T que poseen características tanto innatas como adaptativas, esta población se incrementa con la edad. Se han descrito alteraciones del fenotipo y función de las células NKT-like en infecciones y cáncer ⁶⁶⁻⁶⁸ concretamente en los pacientes de LMA un porcentaje más bajo de células NKT-like se ha asociado a una supervivencia mayor ⁶⁹.

En cuanto a las células T en los pacientes de LMA, se han descrito cambios en la relación CD4/CD8 y número absoluto. También se han descrito cambios en el fenotipo de los linfocitos T debido a una sinapsis inmunitaria defectuosa con los blastos ⁷⁰ mostrando un aumento de la expresión de puntos de control inhibitorio (*checkpoints*) y una menor actividad citotóxica ^{71,72}.

Siendo el objetivo del presente trabajo el estudio de las células NK, NKT-like y células T convencionales en los pacientes de LMA, procederemos a continuación a describir las principales características de estas poblaciones y de sus receptores de membrana.

II.1 Células Natural Killer

Las células NK son el miembro prototipo de las células linfoides innatas (ILC) de tipo 1. Las células ILC1 junto con las células ILC2 e ILC3 constituyen un conjunto de células identificadas de manera reciente que se diferencian entre ellas por la expresión de factores de transcripción específicos y en las citoquinas que producen, en concreto las células NK poseen actividad citotóxica y se caracterizan por la capacidad de producir gran cantidad de IFN- γ después de la activación ⁷³.

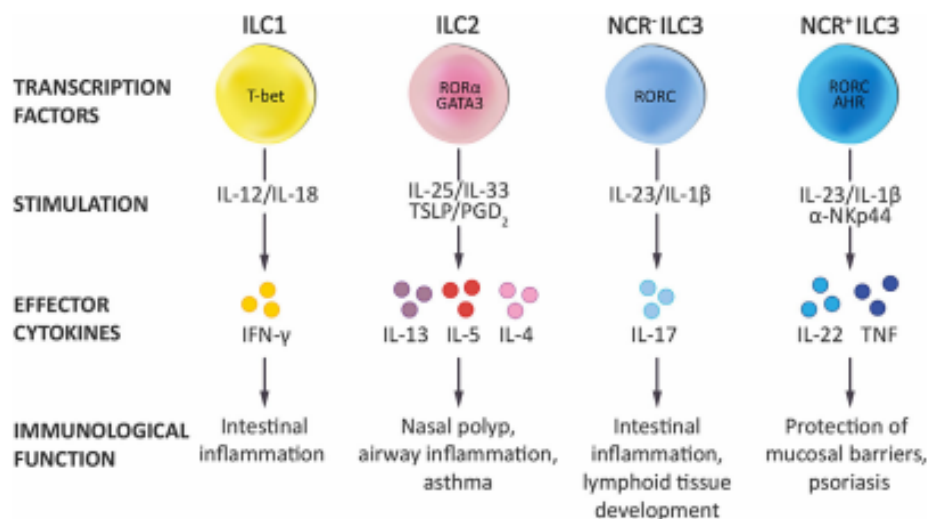


Figura 6: Células linfoides Innatas (ILC). Las ILC1 son responsables de la respuesta inmunitaria frente a bacterias y protozoos intracelulares, las ILC2 frente a helmintos y las ILC3 frente a bacterias extracelulares. El grupo de las ILC2 se asocia a la capacidad de producir citoquinas que inducen respuestas tipo Th2 y las ILC3 respuestas Th17. Fuente: Artis y Spits. 2015.

Las primeras publicaciones sobre las células NK, que datan de 1975, ⁷⁴ demostraban la existencia de una población linfóide con actividad antitumoral que carecía de marcadores de superficie celular típicos de linfocitos T o B. Paralelamente investigaciones realizadas en el Instituto Karolinska demostraban la presencia de actividad citotóxica espontánea de las células del bazo de ratón normales contra las células de leucemia ⁷⁵. A estas células las llamaron células asesinas naturales "*Natural Killer cells*".

Las células NK se originan en la médula ósea a partir de un progenitor hematopoyético común a linfocitos T, linfocitos B, y células dendríticas ⁷⁶. La actividad de las células NK requiere de un balance de señales activadoras e inhibitoras ⁷⁷. Son capaces de eliminar aquellas células que no reconoce como propias por la baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) que a su vez expresen ligandos de receptores activadores ⁷⁸. También son capaces de mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés antibody-dependent cell cytotoxicity) a través del receptor CD16 expresado en su superficie. La liberación del contenido de los gránulos citotóxicos que incluye Granzimas y Perforina va acompañada de una restructuración del citoesqueleto ⁷⁹. Además, las células NK inducen apoptosis de las células diana tras la unión del ligando del receptor de muerte celular (FasL) expresado en su superficie al receptor Fas expresado en las células diana ⁷⁷.

Las células NK se caracterizan por expresar CD56 y/o CD16 y carecer de la molécula CD3 en la superficie. En función del porcentaje de expresión de la molécula CD56 pueden definirse principalmente dos subpoblaciones de células NK en sangre periférica:

Células NK CD56^{bright}: Representan un máximo del 10% de las células NK en la sangre periférica y es una población más inmadura. Tienen la capacidad de responder mejor a ligandos solubles que las CD56^{dim}, se caracterizan por producir niveles elevados de citoquinas reguladoras de la respuesta inmunitaria ⁸⁰.

Células NK CD56^{dim}: Corresponde a una población más madura con elevada capacidad citotóxica que migran a los sitios de inflamación aguda, guiadas por determinados receptores de quimioquinas y moléculas de adhesión y son capaces de provocar la lisis de las células diana al liberar los gránulos de Perforina y Granzimas que contienen en su interior. ⁸⁰

Teniendo en cuenta la expresión de CD56 y CD16, dentro de las células NK CD56^{bright} se pueden distinguir dos subpoblaciones, células CD16^{negativo} (70%) y células CD16^{dim} (30%). Las células NK CD56^{dim} se pueden a su vez subdividir en otras dos subpoblaciones, células CD16^{negativo} y CD16^{bright} ⁸⁰.

II.2 Células NKT-like

Las células NKT-like (*Natural Killer T*) son una subpoblación de linfocitos T que expresan receptores característicos de las células NK y poseen unas características diferenciales del resto de células T convencionales y un programa de diferenciación también diferente ⁸¹.

La proporción de células NKT-like en individuos sanos puede variar del 0,01 al 5,0% en sangre periférica. A diferencia de las células NKT invariantes,(iNKT), el receptor TCR de las NKT-like no tiene una cadena α invariante $V\alpha 24J\alpha 18$ emparejada con una cadena $V\beta 11$ y no reconoce únicamente antígenos glucolipídicos presentados en la molécula CD1d a través de su TCR ⁸².

Las células NKT-like desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria antitumoral, son capaces de inducir apoptosis en células diana vía Fas-FasL, secretan proteínas citotóxicas para destruir las células diana y producen citoquinas ⁸³.

Las células NKT-like son capaces de reconocer estructuras conservadas características de virus. Se ha informado de cambios tanto en el fenotipo como en el número de estas células durante las infecciones virales ⁸⁴ concretamente el porcentaje de estas células aumenta con la edad en individuos CMV positivos ⁸⁵.

Las células NKT-like juegan un papel importante en la respuesta inmunitaria contra el cáncer y sufren alteraciones en neoplasias hematológicas ⁶⁹

Situaciones de inflamación o infecciones virales crónicas, así como la exposición a antígenos tumorales y el envejecimiento modifica la expresión de receptores coestimuladores y co-inhibidores pudiendo inducir un fenotipo de memoria en las células NKT-like CD8+ ⁸⁶.

II.3 Células T $\alpha\beta$

Las células T $\alpha\beta$ (linfocitos T convencionales) son un componente principal del sistema inmunitario adaptativo, se dividen mayoritariamente en linfocitos T CD8+ y linfocitos T CD4+. Ambas subpoblaciones se diferencian en el timo a partir de linfocitos T $\alpha\beta$ CD4+CD8+ "dobles positivos" tras un proceso de selección positiva. Los linfocitos T CD8+ (citotóxicos) tienen la capacidad de destruir células diana mediante la liberación sus gránulos citotóxicos que contienen Perforina y Granzima, inducen apoptosis en células diana mediada por la unión de Fas-FasL y producen altas cantidades de citoquinas, como el IFN- γ y el TNF- α ⁸⁷. En infecciones virales agudas se activan y se expanden tras el reconocimiento del antígeno presentado en el MHC de clase I, pero ciertas situaciones de infección crónica o transformación tumoral pueden provocar un fenotipo típico de agotamiento funcional que imposibilita a estas células efectoras para responder a estímulos ⁸⁸.

Los linfocitos T CD4+ (colaboradores) se diferencian principalmente en los subtipos Th1 y Th2. Las citoquinas liberadas por las células Th1 reclutan macrófagos, activan las células dendríticas e inducen la expresión de receptores de muerte celular en las células tumorales. Una excesiva polarización de Th1 a Th2 puede generar un microambiente inmunosupresor ⁴⁸.

En sangre periférica, aunque en frecuencias bajas, se pueden observar linfocitos T $\alpha\beta$ dobles negativos (CD4-CD8-) y en menor proporción linfocitos T doble positivos que coexpresan ambos correceptores (CD4+CD8+). Los linfocitos T CD4-CD8- presentan habitualmente una frecuencia en sangre periférica de 0.1% a 2% aunque se han descrito en algunos individuos sanos frecuencias de hasta el 14%. Los linfocitos T $\alpha\beta$ CD4+CD8+ representan habitualmente menos del 2% y funcionalmente tienen capacidad de producir IFN- γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-17A. Ambas poblaciones expresan diferentes receptores característicos de células NK ^{89,90}.

III. RECEPTORES DE LINFOCITOS

La activación de las células NK depende del balance de señales transmitidas a través de los receptores activadores e inhibidores que interaccionan con sus ligandos en las células diana (Fig. 7) ⁷⁷. En el caso de los linfocitos T el reconocimiento del antígeno a través de su receptor inicia la cascada de señales, siendo necesaria para la activación del linfocito T naïve la coestimulación a través de CD28. Asimismo, otros receptores coestimuladores y receptores inhibidores contribuirán al balance final de activación de los linfocitos T (Fig. 7). A continuación, se describen los principales receptores activadores e inhibidores presentes en las células NK y linfocitos T.

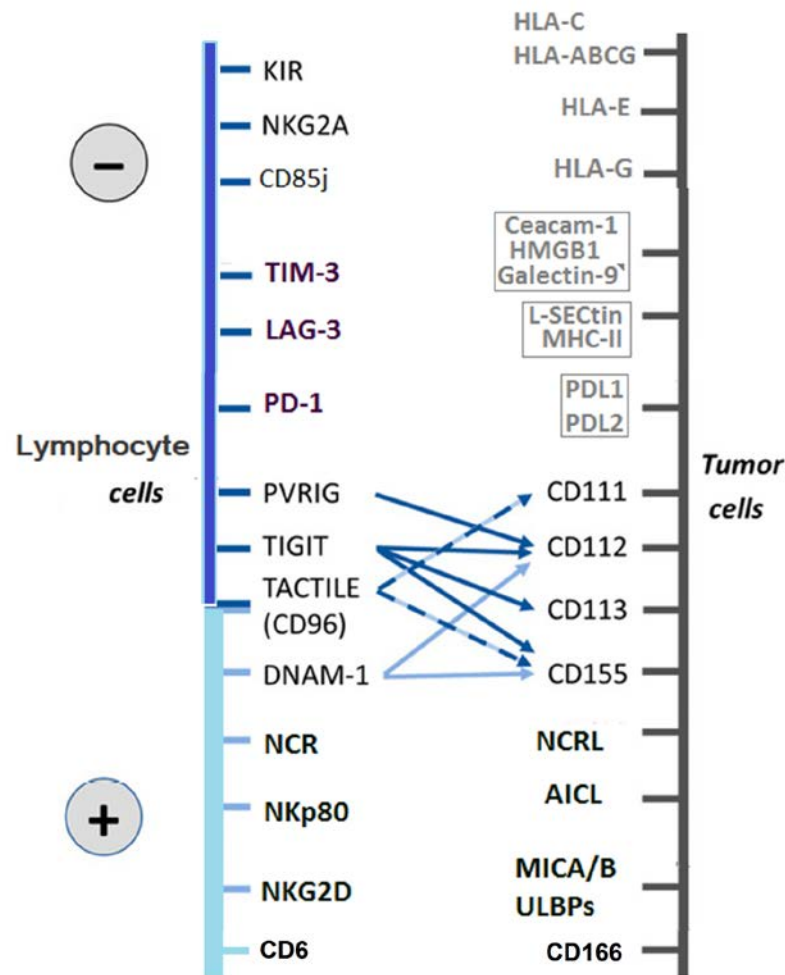


Figura 7: Receptores activadores e inhibidores y sus ligandos expresados en células tumorales. Los receptores inhibidores (-) aparecen representados en azul oscuro en la figura y los activadores (+) en azul claro.

III.1 CD56: Molécula de adhesión NCAM

CD56 es una glicoproteína de adhesión que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Contiene 5 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina y dos dominios anclados a la membrana tipo fibronectina III (FNIII) ⁹¹. A pesar de que CD56 es utilizado como marcador típico de células NK, puede expresarse en otro tipo de células del sistema inmunitario como monocitos, células dendríticas, las células T $\alpha\beta$ (CD4 y CD8) y T $\gamma\delta$ ⁹². Las células leucémicas, sobre todo de los subtipos M2 y M5 de LMA pueden expresar CD56, y la expresión de CD56 se asocia a un factor pronóstico adverso, a una baja probabilidad de lograr una remisión completa y a una menor supervivencia ⁹³.

III.2 CD16

CD16 es un receptor implicado en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), capaz de inducir la lisis directa de las células tumorales mediante degranulación y producción de citoquinas. Se expresa en células mieloides y linfocitos. CD16 está además implicado en la opsonización mediada por IgG ⁹⁴⁻⁹⁶.

Contiene dos dominios extracelulares de tipo inmunoglobulina y una glicoproteína anclada a la membrana por la molécula de fosfatidilinositol-glicano que reconoce la fracción cristalizable (Fc) de la IgG (Fc γ RIII). El grado de glicosilación de la IgG es determinante para la unión a CD16 y altos niveles residuales de ácido siálico y N-acetilglucosamina en la IgG se han asociado a baja afinidad por CD16 y escasa actividad ADCC ⁹⁷.

En la cola citoplasmática presenta un motivo conservado de activación basado en tirosina (ITAM). El acoplamiento de Syc en la cola citoplasmática induce la fosforilación de la PI3K y de SLP76 que activa la ruta ERK/AKT y la fosfolipasa PLC γ ⁹⁸. El IFN- γ , TGF- β y la IL-10 inducen la expresión de CD16 y la metaloproteasa ADAM17 modula la densidad de CD16 en la superficie de las células mediante la escisión de su ectodominio ⁹⁹.

III.3 Receptores de citotoxicidad natural

La familia de receptores de citotoxicidad natural (NCR, del inglés Natural cytotoxicity receptors) está compuesta por tres receptores codificados por tres genes diferentes: NCR1 o NKp46, NCR2 o NKp44 y NCR3 o NKp30. Los NCR son proteínas transmembrana tipo I que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Pueden presentar en la región extracelular uno (NKp30 y NKp44) o dos dominios tipo inmunoglobulina (NKp46). La región intracelular de los NCR carece de un dominio funcional (a excepción de NKp44 que presenta un dominio de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM)) por lo que han de asociarse a una molécula adaptadora que contenga dominios ITAM como son CD3 ζ , DAP12 o Fc ϵ R γ . Esta asociación es posible gracias a unos residuos de carga positiva de arginina (R) o lisina (K) presentes en la región transmembrana que se unen a un residuo de aspartato (D) en los dominios transmembrana de las proteínas adaptadoras que contienen los motivos ITAM ¹⁰⁰⁻¹⁰².

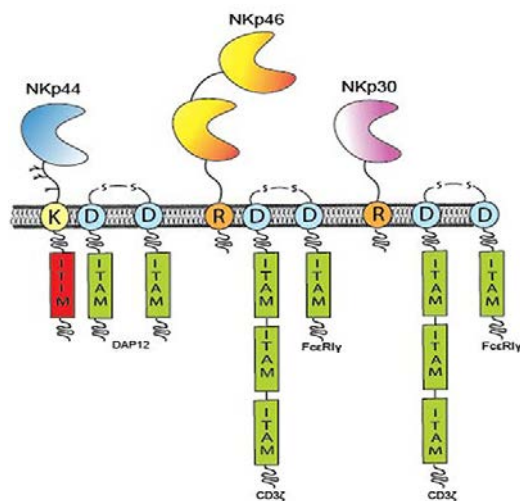


Figura 8: Estructuras de los dominios de los NCR: NKp44, NKp46 y NKp30 se asocian a proteínas adaptadoras DAP12, CD3 ζ , o Fc ϵ R γ que poseen en la región intracitoplasmática motivos de activación basados en tirosina (ITAM) y NKp44 posee además un motivo inhibitorio ITIM en el citoplasma. Fuente: Barrow et al. 2019.

Los receptores NCR se expresan en linfocitos, células linfoides innatas ILC y células dendríticas. Los receptores NKp46 y NKp30 se expresan de manera constitutiva mientras que NKp44 solo se expresa en linfocitos activados y es dependiente de la concentración de citoquinas.

La expresión de la isoforma inhibitoria NKp44-1 podría estar inducida por citoquinas como la IL-2 y alta expresión de esta isoforma, resultarían en una menor actividad lítica en las células NK. El bloqueo de NKp44 en la línea celular de LMA, THP-1 mejoró significativamente la lisis ¹⁰³. Una variante de la proteína 5 de la leucemia de linaje mixto (MLL5) que se expresa en células hematopoyéticas malignas es uno de los ligandos capaz de inducir activación celular al unirse a NKp44 ¹⁰⁴. En general, los ligandos de los NCR pueden expresarse tanto en la superficie de células sanas como en células transformadas tumoralmente o infectadas por virus, también pueden secretarse formas solubles ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La figura 8 muestra los ligandos descritos para NKp46, NKp30 y NKp44.

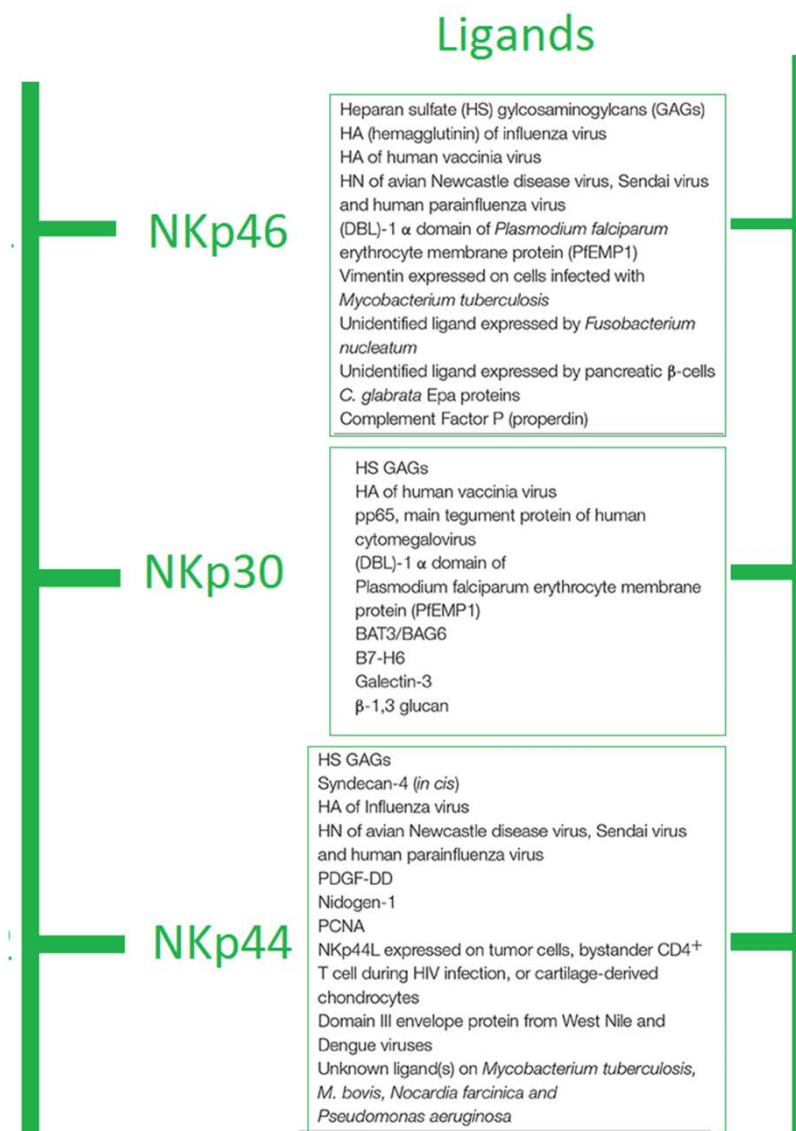


Figura 9: Ligandos de los receptores NCR. Fuente: Modificado de Barrow et al. 2019.

III.4 NKp80

NKp80 también denominado KLRF1 (del inglés *killer cell lectin-like subfamily F, member 1*) es una glicoproteína de membrana de tipo II que pertenece a la superfamilia de los receptores de lectina tipo C. Se codifica en el cromosoma 12 (12p13) dentro del complejo de genes de NK (NKC, del inglés *Natural killer gene complex*)¹⁰⁸

Inicialmente fue descrito como un receptor coactivador que contiene un motivo de activación basado en tirosina atípico en su cola citoplasmática¹⁰⁹, pero debido a que los genes que codifican para el receptor NKp80 y para su ligando AICL (receptor activador inducido por lectina) son adyacentes, se ha asociado este acoplamiento genético a un papel inmunomodulador de la proliferación y activación de células hematopoyéticas^{110,111}. Concretamente en las células NK el receptor AICL se encuentra almacenado en depósitos intracelulares y tras el contacto con la IL-12 y la IL18 se promueve la expresión de AICL en la superficie, haciéndola susceptible a la lisis mediada por NKp80. El eje NKp80-AICL ha sido propuesto como un circuito de autorregulación de células NK¹¹². Por otro lado la unión de NKp80 en las células NK a su ligando AICL en células diana también induce la degranulación de las células NK y la lisis de la célula diana¹¹³.

Las interacciones entre los monocitos y las células NK a través de los receptores NKp80-AICL provoca liberación de citoquinas por ambas células y promueve un microambiente típico inflamatorio¹¹⁴.

Las células T que coexpresan NKp80 junto con otros marcadores característicos de las células NK representan un subconjunto de linfocitos de memoria muy efectivos con alta capacidad citotóxica, gran secreción de citoquinas y alta expresión de moléculas de adhesión que participan en su migración hacia sitios de inflamación¹¹⁵.

III.5 NKG2D

NKG2D, es un receptor de lectina tipo C que contiene en la cola citoplasmática un motivo de señalización basado en tirosina (YINM) que se fosforila por quinasas de la familia Src después de acoplarse a adaptadores a nivel intracelular ¹¹⁶

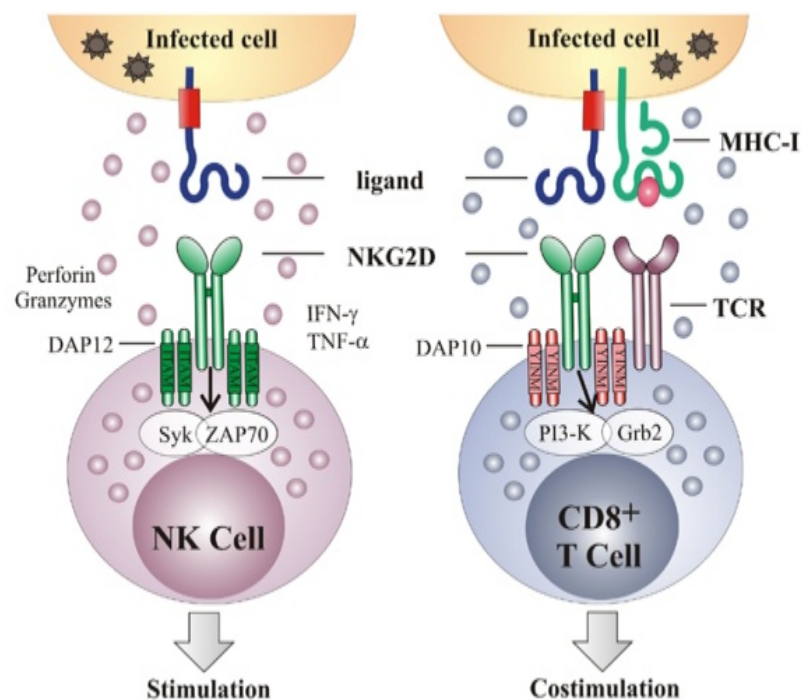


Figura 10: Señalización intracelular de NKG2D. En las células NK, la asociación con DAP12 induce la fosforilación del ITAM y la activación de la cascada de señalización que implica Syk y/o Zap70. En las células T, NKG2D actúa como un receptor coestimulador del TCR. Se asocia al adaptador DAP10, fosforila un motivo atípico de tirosina YINM, recluta Grb2 y activa PI3K. Fuente: Slavuljica et al. 2011.

Los ligandos de NKG2D son MICA y MICB (MICA/B, moléculas que contienen tres dominios α similares a los del MHC de clase I) y ULBP-1-6. Estos ligandos se expresan en niveles muy bajos o nulos en condiciones sanas y se sobreexpresan en respuesta al estrés oxidativo y choque térmico por regulación epigenética con influencia del microambiente celular ¹¹⁷⁻¹²⁰.

Uno de los mecanismos de las células tumorales para escapar de la respuesta citotóxica desencadenada por el receptor NKG2D es la liberación de ligandos solubles por escisión dependiente de las metaloproteasas ADAM 10 y ADAM 17 ¹²¹ o de la fosfolipasa C en el caso de las moléculas ancladas con glucosilfosfatidilinositol (ULBP1,2,3,6) con los cuales consiguen bloquear el sitio de unión a NKG2D sin desencadenar actividad ¹²².

Las células infectadas por citomegalovirus (HCMV) consiguen retener en el citoplasma las moléculas de MICA/B gracias al microARN codificado por citomegalovirus HCMV-miR-UL112 ¹²³. La expresión de CEACAM-1 en células tumorales también logra retener MICA/B en el interior celular ¹²⁴.

La expresión de NKG2D se regula por la interacción con sus ligandos y por citoquinas. Las citoquinas IL-2, IL-15, IL-12 e IFN- α ejercen una regulación positiva de la expresión de NKG2D en la superficie celular. Las vías de señalización de la IL-15 y NKG2D están acopladas, lo que ha hecho pensar en un papel conjunto durante el desarrollo temprano de las células NK. En ausencia de NKG2D, se ha observado una mayor proliferación de células NK inmaduras y una maduración más rápida ^{125,126}. De manera opuesta el IFN- γ y el TGF- β regulan negativamente la expresión de NKG2D, de hecho, altas concentraciones de IFN- γ han conseguido inhibir la lisis de células tumorales que expresaban las moléculas MICA/B en la superficie ^{59,127,128}.

Se le ha adjudicado a NKG2D un papel modulador de la tolerancia inmunitaria al observar que las células CD4+ aumentan notablemente la expresión de este receptor en enfermedades autoinmunes mientras que en condiciones normales tienen una expresión muy baja o nula de NKG2D ¹²⁹.

III.6 CD6

La molécula CD6 pertenece a la superfamilia de las glicoproteínas tipo receptor depurador con dominios ricos en cisteína (SRCR, del inglés Scavenger Receptors Cistein Rich). Es una molécula coestimuladora capaz de mejorar señales de activación, proliferación y diferenciación celular ¹³⁰. Una regulación negativa de la expresión de CD6 en la superficie y un aumento de CD6 soluble empeora la capacidad de proliferación y aumenta la susceptibilidad a la apoptosis en los linfocitos ¹³¹.

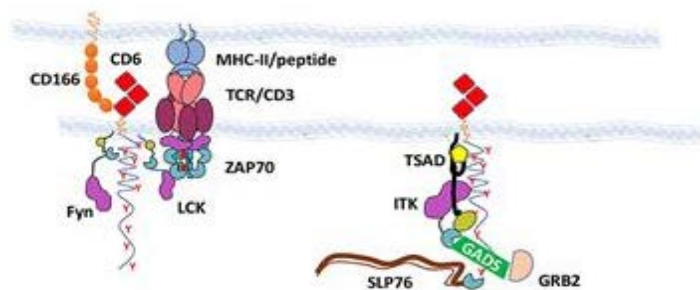


Figura 11: Señalización intracelular de CD6. La molécula CD6 es una proteína transmembrana que puede acoplarse a adaptadores como SLP76, GRB2 y quinasas como LCK, FYN, ZAP70. Fuente: Gonçalves et al. 2018.

CD166 también llamado ALCAM (molécula de adhesión de células leucocitarias activadas) es el ligando de CD6 aunque también puede interactuar de manera homotípica ALCAM-ALCAM ¹³². Se expresa en células presentadoras de antígeno, con una elevada expresión en células dendríticas derivadas de monocitos. Las interacciones CD6 y CD166 son indispensables tanto para establecer el contacto inicial DC-células T como en la segunda fase para promover proliferación de células T en reposo inducida por DC maduras ¹³³.

CD166 es considerado un marcador de células madre hematopoyéticas y progenitores mieloides con elevada capacidad repobladora ¹³⁴.

La unión de CD6 a CD166 induce una respuesta inflamatoria mediante la secreción de IFN- γ , IL-6 y TNF- α en microambientes con elevada concentración de IL-2 ¹³⁵.

III.7 CD244

El receptor CD244 (también denominado 2B4) pertenece a la familia de las moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM). Es una proteína transmembrana que contiene dos dominios tipo inmunoglobulina en la región extracelular y cuatro motivos ITSM en su región citoplasmática (Fig.11) capaz de mediar señales intracelulares tanto de activación como de inhibición ¹³⁶.

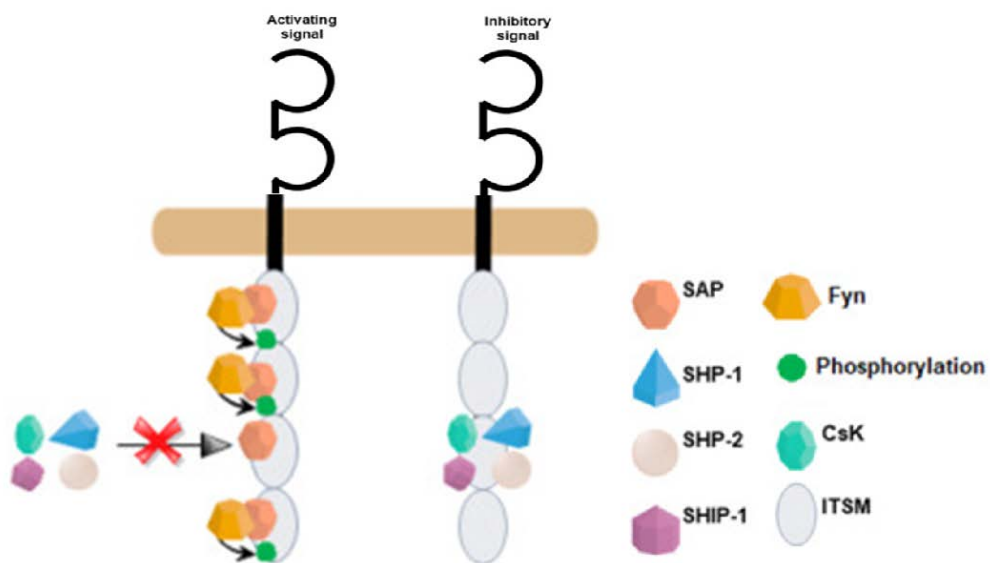


Figura 12. Señalización intracelular a través de CD244. Se representa la estructura del receptor con dos dominios tipo Ig en la porción extracelular y los cuatro dominios ITSM intracelulares. La unión de SAP a los dominios 1^o, 2^o y 4^o inicia las señales de activación celular. La unión de SAP al 3er dominio ITSM previene la acción inhibitoria de SHP1-2, SHIP-1 y CsK. En ausencia de SAP, SHP1-2, SHIP-1 y CsK se unen al dominio ITSM iniciando las señales de inhibición. Fuente: Modificado de Pahima et al. 2019.

Se expresa en las células NK, células $T\gamma\delta$, células $T\alpha\beta$, células dendríticas, monocitos, y células supresoras mieloides (MDSC) ^{137,138}. Participa en funciones de citotoxicidad, proliferación y supervivencia ¹³⁹⁻¹⁴¹. La expresión de CD244 en las células NK y los linfocitos T se ha asociado con fenotipos exhaustos en infecciones crónicas y cáncer, incluidos los cánceres hematológicos como la LMA ¹⁴²⁻¹⁴⁵. CD244 también se expresa en células madre hematopoyéticas y células leucémicas ¹⁴⁶. CD244 tiene gran afinidad por su ligando CD48 expresado en células hematopoyéticas con el que puede interactuar en trans y en cis en la misma célula ^{147,148}.

III.8 Receptores de Moléculas de MHC-I

El MHC en el ser humano se denomina sistema del antígeno leucocitario humano (HLA, del inglés *Human Leukocyte Antigen*). Las moléculas de HLA-I presentan péptidos derivados de proteínas endógenas a los linfocitos T CD8+. Estas moléculas además son ligandos de varios receptores inhibidores y activadores presentes en diferentes poblaciones leucocitarias entre los que se encuentran los receptores tipo inmunoglobulina: KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) y LILR (*Leukocyte Immunoglobulin-Like Receptors*) y los receptores tipo lectina C: CD94/NKG2

149.

III.8.a KIR

Los receptores KIR son glicoproteínas de membrana que poseen una región extracelular con dominios de inmunoglobulina, una región transmembrana y una región citoplasmática. Según el tamaño de la cola citoplasmática se clasifican en S (corta) o L (larga). La cola corta al asociarse al adaptador DAP12 transmite señales activadoras mientras que los KIR inhibidores presentan una cola intracitoplasmática larga con dos motivos inhibidores ITIM de secuencia característica (I/VxYxxL/V)¹⁵⁰. Cuando los residuos de tirosina de los motivos ITIM se fosforilan (por una tirosina quinasa de la familia Src) se recluta SHP-1 y se bloquean las señales mediadas por receptores activadores⁷⁶

Las moléculas de HLA-I juegan un importante papel durante el proceso de maduración de las células NK. El repertorio de KIR tiene una amplia variabilidad entre los individuos y su expresión depende de factores genéticos y epigenéticos y el resultado final de expresión depende de un proceso educativo en el que participa el MHC I del individuo lo que genera diferencias de casi el 100% entre los diferentes individuos^{151,152}.

Hay varios modelos propuestos sobre el proceso de educación celular que intentan explicar cómo las células NK son capaces de mantener un equilibrio óptimo que evite el daño de los tejidos y a la vez una defensa efectiva. El primer modelo conocido como “*missing self*” o “perdida de lo propio” establece que cuando las células expresan niveles bajos de HLA-I son eliminadas por las células NK y que la expresión normal de HLA-I en células sanas, las protege de la lisis mediada por las células NK al unirse a los receptores inhibidores presentes en estas ¹⁵³. Actualmente los modelos apoyan la necesidad de un equilibrio de señales activadoras e inhibidoras para desencadenar citotoxicidad mediada por las células NK. Establecen que la autotolerancia necesita de receptores activadores y que la vigilancia inmunitaria necesita de receptores inhibidores ya que en células NK con un fenotipo de receptores activadores aparentemente normal, la ausencia de receptores inhibidores las vuelve hiporreactivas ^{154,155}.

En las células NK, las formas inhibidoras de los receptores KIR evitan el ataque de las células sanas que expresan HLA-I al tiempo que permiten la eliminación de las células transformadas e infectadas que han perdido la expresión de las moléculas de HLA ¹⁵⁶.

Los receptores KIR reprimen la activación dependiente de TCR en los linfocitos TCD8+ y alta expresión de receptores KIR en la membrana de estos linfocitos se asocia con una fuerte inhibición de la secreción, desgranulación, proliferación y producción de citoquinas por las células T CD8+ ¹⁵⁷. Mientras que en ausencia de ligandos unidos al receptor TCR los receptores KIR regulan la tolerancia inmunitaria ¹⁵⁸.

La coexpresión de los receptores KIR y NKG2A en las células NKT-like CD8+ representan un subconjunto de células altamente citotóxicas capaces de producir rápidamente IFN- γ en respuesta a la estimulación de tipo innato por IL-12 e IL-18 ¹⁵⁹.

III.8.b CD85j

En 1997 se identifica una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas codificada también como los KIR en el cromosoma 19, a la que se denominó transcrito 2 tipo inmunoglobulina (ILT2), también denominado CD85j, LIR1, MIR7 o LILRB1 ^{160,161}. CD85j tiene 4 dominios extracelulares de Ig, y en la región intracelular 4 motivos inhibidores de tirosina ITIM que cuando se fosforilan reclutan la fosfatasa SHP-1 implicada en la señalización negativa ¹⁶¹.

CD85j se expresa mayoritariamente en líneas mieloides (monocitos, células dendríticas y macrófagos) aunque también se expresa en células B, células NK y células T ¹⁶². Reconoce moléculas de HLA-I, principalmente HLA-G, cuya expresión en tejidos sanos es baja y sin embargo aumenta su expresión en ciertos tipos de células tumorales probablemente debido a cambios en el microambiente celular ¹⁶³.

Es considerado un receptor inhibidor sin embargo el bloqueo de CD85j no ha demostrado ser capaz de inhibir por si solo a las células NK ¹⁶⁴ y en un estudio llevado a cabo por Gustafson et al. ¹⁶⁵ encontraron que CD85j restringía la proliferación y la expansión clonal en células T regulando su homeostasis pero no inhibía su capacidad citotóxica ni la producción de citoquinas.

La unión de CD85j a una proteína codificada por el genoma del HCMV (UL18) es capaz de inducir lisis de las células diana y la producción de IFN- γ en las células T CD8+ ¹⁶⁶.

III.8.c NKG2C/A

NKG2C y NKG2A son glicoproteínas transmembrana que pertenecen a la superfamilia de las lectinas tipo C. Reconocen en su dominio extracelular las moléculas de HLA de clase I no clásicas, HLA-E, que se expresan en casi la totalidad de las células mononucleares de sangre periférica ¹⁶⁷.

La unión de HLA-E a NKG2C resulta en señales activadoras mientras que la interacción con NKG2A lleva al reclutamiento de SHP-1 e inhibición de la lisis de la célula diana. Los pacientes de LMA pueden sobreexpresar HLA-E por exposición a IFN- γ ^{168,169}.

La expresión de NKG2A/C en células NK y linfocitos T citotóxicos juega un importante papel tanto en la regulación de la función efectora como en la supervivencia celular durante la respuesta inmunitaria innata y adaptativa frente al patógeno ¹⁷⁰ en el reconocimiento de células transformadas y en el trasplante de células madre hematopoyéticas alogénicas ¹⁷¹.

La expresión de NKG2A aumenta en las células NK en microambientes tumorales. Se ha descrito una mayor expresión en células NK de sangre periférica de pacientes con LMA en comparación con células NK de controles sanos de la misma edad. Bajos niveles de NKG2A se correlacionan con mayor actividad ADCC y mayor capacidad de eliminación de las células tumorales ¹⁷².

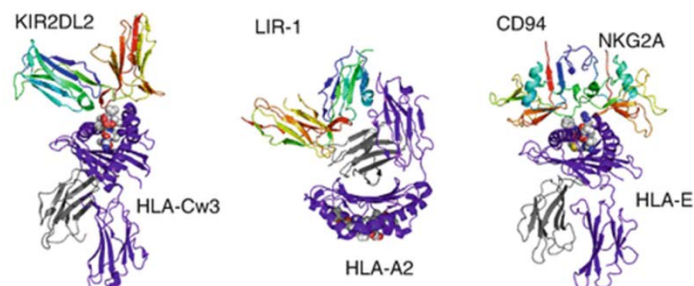


Figura 13: Interacción entre receptores inhibidores específicos de las moléculas de HLA-I con sus ligandos. Se muestra la interacción de los receptores KIR2DL2, LIR-1 y el heterodímero CD94/NKG2A con sus respectivos ligandos. Fuente Bin Xu et al. 2018.

III.9 Receptores de Nectinas

Las nectinas y las moléculas similares a las nectinas (Necls) son una familia de moléculas de adhesión celular que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas que están expresadas en diferentes tipos de células y desempeñan una función inmunorreguladora al interactuar con sus receptores expresados en la superficie de algunas células inmunitarias. Dos de estas moléculas, Necl-5 (generalmente denominado CD155 o PVR) y Nectin-2 (CD112), se encuentran sobreexpresadas en diferentes tipos de células tumorales y están involucradas en funciones de migración y metástasis tumoral. Estas moléculas son reconocidas por una familia de receptores que incluyen el receptor DNAM-1 (CD226), TIGIT, TACTILE (CD96) y el receptor recientemente descrito PVRIG. El receptor activador o coestimulador DNAM-1 y el receptor inhibidor TIGIT interactúan con los mismos ligandos, CD155 y CD112, cuyo reconocimiento ejerce funciones opuestas en las células efectoras. TACTILE también comparte el ligando CD155 con DNAM-1 y TIGIT. CD113 y CD111 son ligandos de TIGIT y TACTILE respectivamente que pasan a formar parte de este complicado entramado de señalización ¹⁷³.

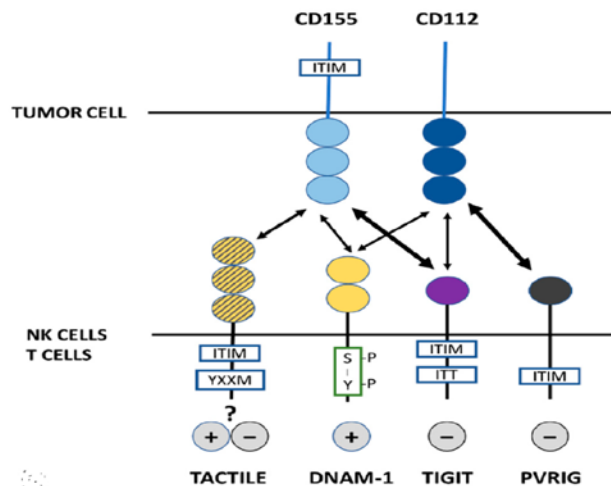


Figura 14: Los receptores DNAM-1/TIGIT/PVRIG/TACTILE y sus ligandos CD155 y CD112. Los receptores DNAM-1, TIGIT, TACTILE and PVRIG expresados en las células NK y T interactúan con sus ligandos expresados en las células tumorales mediante señales de activación e inhibición de la citotoxicidad celular. La afinidad de estos receptores con sus ligandos difiere entre los mismos. Fuente: Sanchez-Correa et al. 2019.

III.9.a DNAM-1

En 1985 se describía por primera vez un receptor presente en linfocitos T humanos activados al que denominaron TLiSA1. Casi una década más tarde en 1996 el mismo receptor fue descrito como una molécula de adhesión intercelular, la molécula-1 accesoria de DNAX¹⁷⁴. DNAM-1 o CD226 es un receptor clave en inmunidad antitumoral que participa en mecanismos de adhesión celular y en la sinapsis inmunitaria^{175,176}. Se expresa en las células NK y células T, monocitos, plaquetas y un subconjunto de células B. Es una molécula esencial en el reconocimiento directo de células infectadas por virus y células malignas así como en la presentación de antígenos por células dendríticas a las células T¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

DNAM-1 contiene dos dominios tipo inmunoglobulina en la porción extracelular y un dominio ITT en el citoplasma. La unión de DNAM-1 a su ligando promueve una cascada de fosforilación que media la actividad citotóxica, producción de citoquinas y señales de proliferación, diferenciación y supervivencia celular¹⁸¹.

III.9.b TIGIT

TIGIT (WUCAM, VSIG9, VSTM3) es una molécula que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Se expresa en células NK, NKT-like, linfocitos T activados y células Treg¹⁸².

La proteína transmembrana TIGIT contiene en la cola citoplasmática un motivo inhibidor ITIM y un motivo ITT. La unión de TIGIT a sus ligandos es capaz de inhibir directamente la función citotóxica, la polarización de gránulos, la secreción de citoquinas y la proliferación celular¹⁸³.

III.9.c TACTILE

El receptor TACTILE también conocido como CD96 fue clonado por primera vez en 1992, y su principal función es la de adhesión y migración celular. TACTILE pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y posee tres dominios tipo inmunoglobulina ampliamente O-glicosilados en el extremo N-terminal extracelular y tiene ciertas similitudes con la molécula de adhesión de células neuronales (NCAM, CD56) ¹⁸⁴.

La función de este receptor al unirse a su ligando presenta ciertas controversias ya que en la cola citoplasmática no solo presenta un dominio inhibidor ITIM sino que también posee un dominio YXXM rico en sustratos de quinasas presente en algunos receptores activadores ^{185,186}.

La adhesión entre TACTILE y CD155 favorece la transferencia de CD155 a las células NK lo que las hace susceptibles al fratricidio mediado por otras células NK ¹⁸⁷.

TACTILE ha sido sugerido como un biomarcador de células madre leucémicas ^{188,189} y la alta expresión de TACTILE en los pacientes de LMA se ha asociado con mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia ¹⁹⁰.

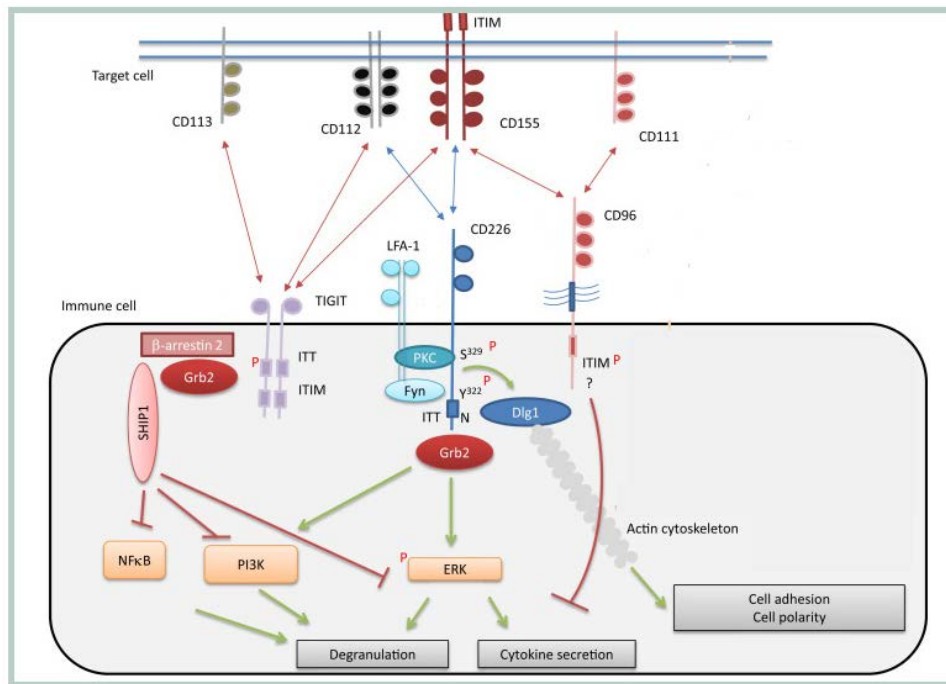


Figura 15: Señales intracelulares de activación e inhibición. Mientras que la activación a través de DNAM-1 después del reconocimiento de CD155 o CD112 mejora la citotoxicidad contra una amplia gama de células tumorales, el reconocimiento por TIGIT de estos ligandos ejerce un efecto inhibitorio. La unión de DNAM-1 a su ligando induce el reclutamiento del adaptador Grb2 que activa moléculas como Vav-1, fosfatidilinositol 3 'quinasa (PI3K) y fosfolipasa C- γ 1 que a su vez activan las quinasas Erk y Akt, mientras TIGIT recluta fosfatasas SHP-1, SHP-2 o SHIP-1 que al desfosforilar diferentes moléculas, inhiben la activación. Fuente: Modificado de Martinet & Smyth. 2016.

III.9.d PVRIG

En 2016 se descubrió un nuevo receptor de nectinas al que se ha denominado PVRIG (del inglés, *PVR related immunoglobulin domain*) o receptor de CD112 (CD112R). PVRIG compite por el mismo sitio de unión a CD112 que DNAM-1 y la afinidad de PVRIG a CD112 es mucho mayor que la de TIGIT y DNAM-1. La señalización a través de este receptor inhibe la actividad citotóxica y la secreción de citoquinas. PVRIG se ha encontrado sobreexpresado en las células linfocitarias en diferentes tipos de cáncer lo que ha añadido aún más complejidad al entramado de señales de esta red molecular de receptores de moléculas de la familia de las nectinas ^{191,192}.

III.10 PD-1

El gen que codifica para la proteína de muerte programada 1 (PD-1) se encuentra en el cromosoma 2 y fue descubierto en 1992 ¹⁹³. La proteína PD-1 pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF). Se expresa en los linfocitos, células mieloides (monocitos y células dendríticas) y en un subconjunto de células B ¹⁹⁴. PD-1 presenta en la cola citoplasmática un dominio de inhibición ITIM y un dominio regulador ITSM. La unión de PD-1 a sus ligandos inhibe la activación y la sinapsis inmunitaria. El primer ligando que se asoció a PD-1 (PD-L1) fue B7-H1 también llamado CD274 y el segundo (PD-L2) fue B7-DC también conocido como CD273, ambos se expresan en células presentadoras de antígenos ^{195,196}.

CD274 no solo es capaz de unirse a PD-1 sino que además compite con CD28 por la unión a CD80. CD28 es un receptor coestimulador cuyos ligandos son las moléculas coestimuladoras de la familia B7, CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2). La unión de PD-1 a CD80 inhibe también la activación del linfocito T por bloqueo del sitio de unión del receptor coestimulador CD28 con su ligando ⁷¹.

La señalización intracelular de PD-1 es dependiente de las quinasas de la familia Src (Fyn, Lck). Tras la interacción con sus ligandos, se fosforilan los motivos de tirosina del dominio intracelular ITSM y posteriormente se reclutan las fosfatasas SHP-1 (PTPN6) SHP-2 (PTPN11) y SHIP-1 ^{197,198}.

III.11 TIM3

A principios de los años 2000 se identificó por primera vez una familia de genes tipo mucina (TIM) que codifica una proteína transmembrana con funciones inmunológicas en humanos ¹⁹⁹. TIM3 también conocido como HAVCR2 es uno de los 3 miembros de la familia TIM y tiene un importante papel tanto en enfermedades autoinmunes como en cáncer ²⁰⁰.

La molécula TIM3 presenta un dominio variable tipo inmunoglobulina (IGV) con diferentes sitios de unión a sus ligandos, un dominio de mucina, una región transmembrana y una cola citoplasmática con residuos de tirosina ^{201,202}. En su porción citoplasmática TIM3 se encuentra normalmente unido a la molécula de transcripción 3 asociada al antígeno (Bat3). Bat3 es la encargada de reclutar la quinasa Lck de la familia Src, que mantiene inactivo al receptor TIM3. La unión de TIM3 a sus ligandos y la consiguiente fosforilación de los residuos de tirosina libera Bat3 lo que promueve la inhibición de las células efectoras mediada por TIM3. La molécula Bat3 está disminuida en trastornos autoinmunes, infecciones crónicas y cánceres ^{203,204}. Por otro lado la quinasa Fyn compete con Bat3 por el sitio de unión a TIM3, Fyn fosforila Lck, y potencia las vías de PI3K/Akt/mTOR, PLC- γ 1 y ERK y contribuye directamente al agotamiento del sistema inmunitario ^{205,206}.

TIM3 promueve la fagocitosis en monocitos, macrófagos y células dendríticas cuando se une a la fosfatidilserina de células apoptóticas ²⁰⁷.

Ha habido ciertas controversias en cuanto a la participación de TIM3 en la citotoxicidad, degranulación, secreción de Perforina y Granzima B y su contribución a estados inflamatorios ²⁰⁸⁻²¹⁰.

La coexpresión de TIM3 y PD-1 en los linfocitos se asocia a fenotipos exhaustos y el bloqueo de ambos receptores inhibidores ejerce sinergia a la hora de revertir las funciones antivirales y antitumorales en los linfocitos ²¹¹⁻²¹⁴

215

TIM3 en las células T CD4+ es capaz de inducir apoptosis mediante un mecanismo dependiente de la B-galactosidasa, calcio y de la caspasa-1. TIM3 atenúa la respuesta Th1 para evitar estados inflamatorios, promueve la tolerancia inmunitaria y previene del desarrollo de autoinmunidad ^{216,217}.

CEACAM-1 es uno de los ligandos conocidos de TIM3 y se sobreexpresa en diferentes tipos de cáncer, incluidos los hematológicos. El bloqueo de CEACAM-1 previene el agotamiento celular en linfocitos citotóxicos. CEACAM-1 y TIM3 pueden coexpresarse en diferentes tipos de células y unirse por sus partes homologas en los dominios de IgV. CEACAM-1 participa en la maduración y expresión de TIM3 en la superficie, la ausencia de CEACAM-1 en el interior celular resulta en una baja expresión de TIM3 en la superficie y un fenotipo inflamatorio ^{218,219}. La molécula de CEACAM-1 también puede ser secretada al plasma y el bloqueo de CEACAM-1 soluble retrasa la apoptosis inducida por el ligando Fas en un proceso dependiente de la fosforilación de tirosina en los dominios ITIM, de la asociación con SHP-1 y de la activación de Erk1 ²²⁰.

HMGB1 (proteína de alta movilidad del grupo 1) también denominada anfoterina, es otro de los ligandos descritos de TIM3 y también se expresa en células cancerosas. La unión de HMGB1 a TIM3 puede contribuir al escape del cáncer al suprimir la respuesta antitumoral ^{221,222}.

La glectina 9 (Gal-9), es una lectina de unión a B-galactosidasa involucrada en funciones de adhesión, proliferación y muerte celular ²²³. Gal9 puede unirse a TIM3 tanto a nivel extracelular como intracelular y ha sido propuesto un mecanismo de autorregulación, en el que el IFN- γ estimula la producción de Gal9 y Gal9 reduce la producción de IFN- γ ^{224,225}.

III.12 LAG3

El gen 3 de activación de linfocitos (LAG3) mantiene un gran parecido con CD4 en cuanto a la organización de exones e intrones en el cromosoma 12 y su secuencia peptídica. Ambos se unen a moléculas del MHC II de las células presentadoras de antígenos aunque la afinidad de LAG3 es mucho mayor que la de CD4 ²²⁶.

LAG3 es una proteína transmembrana que contiene 4 dominios tipo inmunoglobulina extracelulares. En la cola citoplasmática presenta dos regiones altamente conservadas “EP” y “KEELE” y una región de fosforilación con dos residuos de serina ²²⁷.

LAG3 se almacena en lisosomas, donde se degrada si no hay estimulación y su translocación a la superficie es dependiente de la señalización de la proteína quinasa C en el citosol ²²⁸. Las metaloproteasas ADAM10 y ADAM17 son necesarias para la regulación de la proliferación y la función efectora. Ambas regulan la expresión de LAG3 en la superficie, escinden la molécula entre el dominio D4 y el dominio transmembrana en dos fragmentos, uno de 54 KDa, LAG3 soluble, que contiene los cuatro dominios extracelulares que se oligomeriza y otro de 16 KDa que contiene el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático ^{229,230}.

LAG3 se expresa en la superficie de linfocitos activados, células dendríticas, células B y Tregs ^{231,232}.

LAG3 desempeña un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis, regula negativamente la expansión celular de las células T activadas y las células T de memoria así como la respuesta inmunitaria específica en las células T ²³³. En células dendríticas induce su maduración y regula la producción de IL-12 y TNF- α ²³⁴. En células Tregs la expresión de LAG3 potencia su actividad regulando negativamente la respuesta antitumoral y frente a los patógenos ²³⁵.

Dos moléculas de la familia de las lectinas son ligandos de LAG3:

- Galectina 3 (Gal3), es una proteína de la familia de las lectinas de unión a β -galactosidasa, posee un extremo terminal que favorece su oligomerización. Está involucrada en funciones de adhesión, crecimiento, maduración, proliferación e inflamación ²³⁶. Gal3 se expresa en monocitos, macrófagos, basófilos, neutrófilos y eosinófilos en condiciones normales y en células transformadas y cancerosas incluidos los blastos de leucemia. La molécula soluble de Gal3, se utiliza comúnmente como biomarcador de pronóstico en diversos tipos de cáncer (carcinoma hepatocelular, cáncer de páncreas y de tiroides) ²³⁷⁻²⁴⁰.

- L-SECTIN, la proteína de lectina tipo C se expresa en células endoteliales del hígado y nódulos linfáticos, y su unión a LAG3 inhibe en las células T la producción de IFN- γ . También se expresa en células mieloides (macrófagos, monocitos y células dendríticas) como receptor de reconocimiento de patógenos ²⁴¹.

La proteína 1 similar a fibrinógeno (FGL1) acaba de ser recientemente identificada como ligando de LAG3, y altas concentraciones de esta proteína en el suero de los pacientes con determinados tipos de cáncer se ha correlacionado con mal pronóstico ²⁴².

IV. INMUNOTERAPIA

A pesar de las numerosas investigaciones, el desarrollo de resistencia a la quimioterapia sigue siendo un gran problema en los pacientes de LMA. Las mutaciones genéticas y epigenéticas en las células leucémicas, así como la expresión de moléculas en la superficie celular o la secreción de estas al microambiente facilitan el escape y la progresión del cáncer. El sistema inmunitario de estos pacientes se encuentra inhibido e incapacitado para eliminar las células transformadas. El diseño de nuevas terapias biológicas amplía las posibilidades de tratamiento para los pacientes de LMA pudiéndose beneficiar también pacientes de edad avanzada que son particularmente susceptibles a la toxicidad de los tratamientos de quimioterapia convencionales ²⁴³.

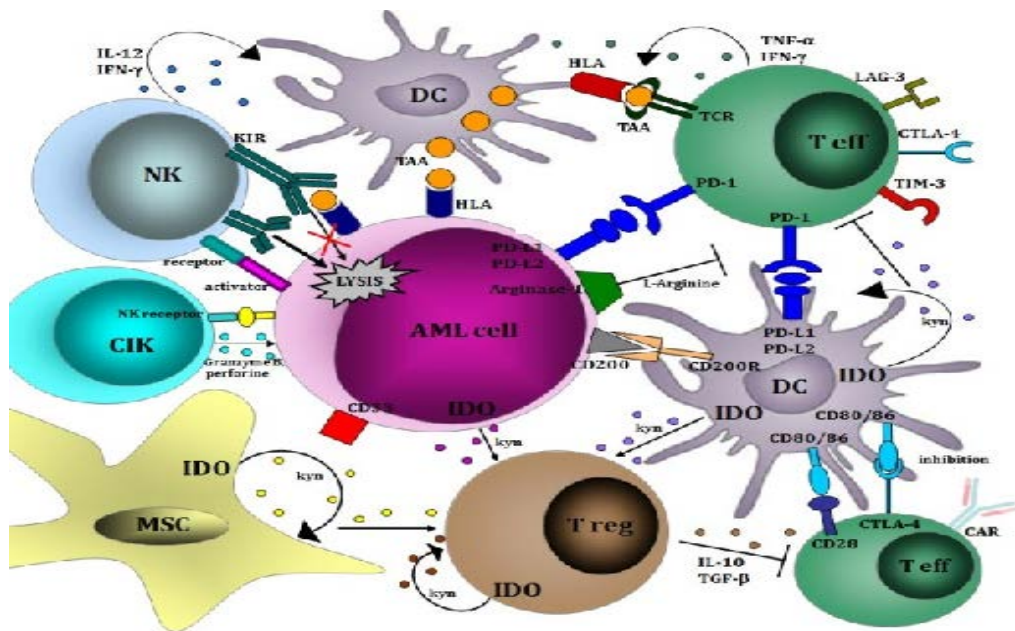


Figura 16: Interacción de los Blastos de LMA con el Sistema Inmunitario. En la leucemia mieloide aguda se crea un microambiente, en el que las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas están profundamente desreguladas. Los blastos de AML interactúan con diferentes células dentro del microambiente (células efectoras T, las células Treg, CD, células NK y las células estromales mesenquimales). El objetivo principal de las nuevas terapias es aprovechar el sistema inmunológico contra la LMA mediante la implementación de las vías efectoras citotóxicas (CTL, células NK y CIK) y/o la inhibición de los mecanismos de tolerancia (Treg y MSC). Fuente: Modificado de Isidori et al. 2017.

IV.1 Anticuerpos Terapéuticos en LMA

a) Anticuerpos Conjugados con toxinas

En el año 2000, la FDA aprobó el primer anticuerpo para tratar a los pacientes de LMA. Es imprescindible encontrar dianas terapéuticas que no se expresen en células sanas para poder utilizar anticuerpos conjugados con toxinas o con radioisótopos dirigidos frente a las células tumorales sin dañar el resto de los tejidos ²⁴⁴⁻²⁴⁶. Dos marcadores ampliamente usados como dianas terapéuticas en los pacientes de LMA son CD33 y CD123.

CD33 es una proteína transmembrana glicosilada dependiente del ácido siálico que juega un importante papel en la adhesión e interacción celular en los blastos de LMA. Se expresa en blastos leucémicos y células madre leucémicas, pero no se expresa en células madre hematopoyéticas sanas. El primer anticuerpo humanizado aprobado para el tratamiento de la LMA fue Gentuzumab Ozogamizi, diseñado para dirigir un antibiótico (caliqueamicina) a los blastos que expresan CD33 y provocar daños en el ADN ²⁴⁷. CD33 también puede ir marcado con un radioisótopo ²⁴⁸.

CD123: Es la cadena alfa del receptor de la IL-3 que se expresa en blastos leucémicos y su expresión en otras células es casi nula, ha sido usado al igual que CD33 para dirigir el tratamiento a los blastos de LMA ²⁴⁹.

Actualmente hay más de 10 ensayos clínicos en marcha en pacientes de LMA usando CD33 y CD123 como dianas terapéuticas ²⁵⁰.

La lectina CLL1, (CLEC12a), es otra de las dianas usadas para dirigir los fármacos a los blastos de LMA. La gran ventaja de esta molécula es que solo se expresa en células transformadas y se evita el daño en los tejidos sanos ²⁵¹.

b) Anticuerpos Biespecíficos (BITE)

Los anticuerpos biespecíficos tratan de dirigir la actividad antitumoral, aproximando las células inmunes a las células tumorales.

Las dianas CD33 y CD123 anteriormente descritas se usan también en la construcción de anticuerpos biespecíficos para dirigir bien las células T CD3+ o las células CD16+ contra los blastos de LMA. Otras dianas usadas en los blastos de LMA para redirigir las células T CD3+ son el péptido WT1 o la molécula CD135, un receptor asociado a actividad quinasa (FLT-3) muy importante para el desarrollo de los progenitores mieloides ^{252,253}. El anticuerpo biespecífico CD15xCD64 se encuentra en ensayo clínico con el fin de redirigir la citotoxicidad de monocitos contra blastos de LMA ²⁵⁴.

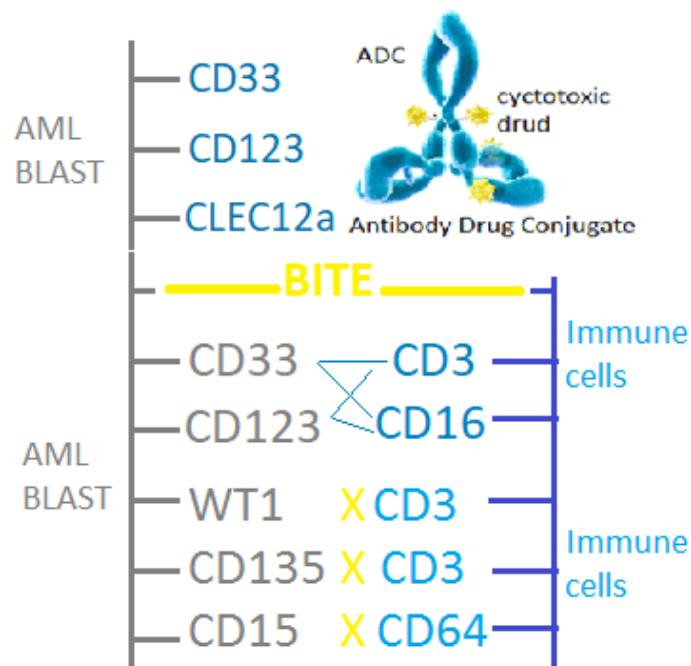


Figura 17: Anticuerpos conjugados con toxinas y BITE (anticuerpos biespecíficos) dirigidos a los blastos de LMA. Los anticuerpos conjugados con toxinas dirigen la droga de la manera más específica posible a proteínas expresadas en los blastos y los anticuerpos biespecíficos de la imagen aproximan los blastos de LMA a las moléculas CD3, CD16 o CD64 expresadas en determinadas células del sistema inmunitario.

c) Anticuerpos dirigidos a proteínas sobreexpresadas en blastos de LMA

CD38: Es una glicoproteína que aparece sobreexpresada en la superficie de los blastos de los pacientes de LMA. El anticuerpo monoclonal humanizado contra CD38 ocasiona muerte celular por activación de complemento, activación de fagocitosis y ADCC y ha mostrado idoneidad para los pacientes de LMA ²⁵⁵.

CD47: El anticuerpo monoclonal CD47 ha sido diseñado para interferir con el reconocimiento de CD47 por el receptor SIRP α en los macrófagos, desbloquea un inhibidor del punto de control de macrófagos que utilizan las células cancerosas para evitar ser fagocitadas ²⁵⁶. Magrolimab (anti-CD47) esta designado como Medicamento Huérfano para el tratamiento del síndrome mielodisplásico (SMD) y la LMA por parte de la FDA y por la Agencia Europea de Medicamentos solo para la LMA.

CD137: Los anticuerpos monoclonales agonistas anti-CD137 actúan como ligandos artificiales de este receptor de la familia de receptores TNF que está expresado en la superficie de linfocitos T, células NK y células dendríticas. El anticuerpo anti-CD37 ha sido capaz de inducir potentes respuestas inmunitarias antitumorales en diferentes modelos de cáncer y actualmente se encuentra están en ensayo clínico ²⁵⁷.

Otras dianas aún se encuentran en investigación preclínica como la proteína CD157, glicofofatidinositol (GPI) que se expresa en los precursores mieloides y ha demostrado in vitro mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos de las células NK contra blastos de LMA ²⁵⁸.

La proteasa de membrana CD13 que se sobreexpresa en blastos, pero también en células hematopoyéticas normales es importante para la maduración y proliferación celular y se encuentra también en estudio ²⁵⁹.

d) Anticuerpos dirigidos a puntos de control inhibitorio

Los *checkpoints* son receptores inhibidores considerados como puntos de control del sistema inmunitario, el descubrimiento de estos receptores y de su papel crucial en la regulación negativa de la actividad antitumoral ha permitido el desarrollo de estrategias eficaces para la reactivación del sistema inmunitario basadas en el bloqueo de estos receptores ²⁶⁰.

El primer *checkpoint* aprobado por la FDA se dirigía a bloquear CTLA-4, un receptor de membrana que compite por sus ligandos CD80 y CD86 con el receptor coestimulador CD28. El bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos ha conseguido reactivar el sistema inmunitario contra los blastos de LMA ²⁶¹. Otros *checkpoints* aprobados posteriormente también han sido utilizados en inmunoterapia para pacientes de LMA.

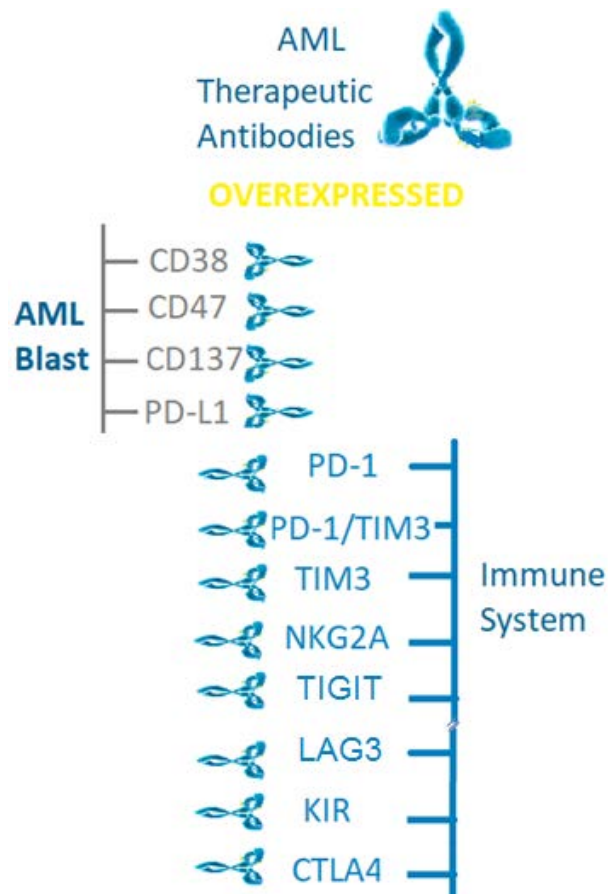


Figura 18: Anticuerpos dirigidos a bloquear proteínas de superficie. Los blastos pueden expresar en la superficie moléculas que favorezcan la progresión de la enfermedad mejorando la adhesión y proliferación. Igualmente pueden expresar ligandos capaces de controlar la actividad anti-leucémica del sistema inmunitario. Las terapias pueden ir dirigidas al bloqueo de moléculas en la membrana de los blastos o al bloqueo de puntos de control inhibitorios expresados en células del sistema inmunitario.

PD-1: Anticuerpos dirigidos tanto al bloqueo de PD-1 como de los ligandos de PD-1 (en monoterapia y en terapia combinada) están siendo utilizados para reactivar el sistema inmunitario de los pacientes de LMA. La expresión de los ligandos de PD-1 en los blastos de LMA se ha visto aumentada en presencia de agentes hipometilantes. La forma soluble de ligandos de PD-1 también induce inhibición y aumenta la producción de IDO (indoleamina-pirrol 2,3-dioxigenasa) e IL-10. Determinadas citoquinas como IL-2, IL-7 e IL-15 pueden restaurar las respuestas proliferativas inhibidas tras la señalización a través de PD-1 en las células T ^{262,263}.

TIM3: Recientemente se han descrito ciertos mutantes resistentes al bloqueo de PD-1 y un aumento de la coexpresión de los receptores TIM3 y PD1 durante la progresión de la LMA ²¹⁵. Tal como se indica en la Tabla IV el bloqueo de TIM3 en monoterapia, así como el bloqueo simultáneo de TIM3, con PD-1, ligandos de PD-1 o la proteína P53 están en ensayo clínico para tratar LMA, síndromes mielodisplásicos y metástasis.

LAG3: BMS-986016 fue el primer anticuerpo dirigido a bloquear LAG3 y el único que se encuentra en fase III para el tratamiento de cánceres hematológicos. El tratamiento con anticuerpos frente a LAG3 en monoterapia no ha mostrado grandes beneficios y hay ensayos clínicos que combinan la terapia anti-LAG3 con anti-PD-1 o con anticuerpos dirigidos a los ligandos de PD-1 en neoplasias hematológicas ²⁶⁴.

NKG2A: Es uno de los principales puntos de control inhibitorio identificados en las células NK. El anticuerpo monoclonal humanizado Monalizumab ha demostrado reactivar la citotoxicidad en las células NK y células T citotóxicas ^{172,265}.

KIR: Los blastos de LMA a diferencia de la mayoría de las células tumorales suelen conservar en gran parte la expresión de HLA-I y de esta manera evitan desencadenar la respuesta citotóxica en las células NK al interaccionar las moléculas de HLA-I con los receptores KIR inhibidores. En monoterapia, el anticuerpo dirigido al bloqueo de los KIR para favorecer la citotoxicidad mediada por las células NK en pacientes de LMA no ha dado buenos resultados y se está probando su uso en combinación con anti-PD-1 ²⁶⁶.

TIGIT: El bloqueo del punto de control inhibitorio TIGIT, expresado en las células NK y linfocitos T, consiguió prevenir el agotamiento e inducir actividad antitumoral ²⁶⁷. Se encuentra en ensayo clínico para el tratamiento de cáncer avanzado en monoterapia y en terapia combinada.

TACTILE: es considerado también como un punto de control inhibitorio aunque se encuentra aún en fase preclínica ²⁶⁸.

La Tabla IV muestra los ensayos clínicos en marcha basados en el bloqueo de *checkpoints* en los pacientes de LMA y otras enfermedades hematológicas a fecha de julio 2020 en <https://clinicaltrials.gov/>

e) Anticuerpos dirigidos al microambiente celular

Otro de los mecanismos de evasión observados en los blastos de LMA es la generación de un microambiente patológico que facilita la evasión de la respuesta inmunitaria. La secreción de ligandos de receptores activadores constituye un mecanismo de escape, al unirse al receptor, induce la pérdida de expresión de éste o impide la unión a su ligando expresado en la superficie de las células diana. La forma soluble de MICA/B y ULBP ha demostrado capacidad para unirse a su receptor NKG2D y bloquear el sitio de unión a sus ligandos sin desencadenar citotoxicidad y a la vez altas concentraciones de estos ligandos se han relacionado con una menor expresión de NKG2D en la superficie de las células NK y menor citotoxicidad de las células NK contra los blastos de LMA. También se ha detectado en plasma la forma soluble de B7H6 y se ha asociado con una menor expresión de su receptor NKp30. La expresión de NKp30 ha sido correlacionada con una mayor supervivencia total y supervivencia libre de recaída en los pacientes de LMA ^{269,270}.

Los blastos de LMA pueden expresar Gal9 que al interactuar con TIM3 en las células NK induce la producción de IFN- γ que a su vez provoca la expresión en los blastos de IDO, una molécula supresora de la respuesta inmunitaria que induce tolerancia en LMA ²⁷¹ o pueden liberar NOS (óxido nítrico sintetasa) y ROS (especies reactivas de oxígeno) que inhiben la actividad de los receptores activadores NKp46 y NKG2D en las células NK.

Los blastos de LMA inducen la liberación de estas moléculas supresoras y citoquinas inflamatorias que favorece el desarrollo de un microambiente tumoral, el bloqueo de estas moléculas supresoras está siendo estudiado para mejorar la supervivencia de los pacientes ²⁷².

Tablas IV: Ensayos Clínicos basados en el bloqueo de *Checkpoints* en LMA

Target	Drug	Conditions	NCT Number	Phase
PD-1	• Pembrolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0428478	2
PD-1	• Pembrolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0421424	2
PD-1	• Pembrolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0396944	1
PD-1	• Pembrolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0376191	2
PD-1	• Pembrolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0277119	2
PD-1	• Pembrolizumab	• Bladder Cancer	NCT0266206	2
PD-1	• Pembrolizumab	• Advanced Myeloproliferative	NCT0306540	2
PD-1	• Nivolumab	• Leukemia, Myeloid, Acute	NCT0436105	1
PD-1	• Nivolumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0427744	1
PD-1	• Nivolumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0253223	2
PD-1	• BMS-986016BMS-936558	• Hematologic Neoplasms	NCT0206176	2
PD-1	• Camrelizumab(SHR-1210)	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0435347	2
PD-1+ IL6	• Nivolumab + Tocilizumab	• Acute Leukemia	NCT0358893	1
PD-1+CTLA-4	• Nivolumab + Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0360015	1
PD-1+CTLA-4	• Nivolumab + Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0284637	1
PD-1+CTLA-4	• Nivolumab + Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0239772	2
PD-1+CTLA-4	• Nivolumab + Ipilimumab	• Leukemia	NCT0253046	2
PD-1+CTLA-4	• Nivolumab + Ipilimumab	Acute Leukemia	NCT0287969	1
CTLA-4	• Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0289032	1
CTLA-4	• Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0006037	1
CTLA-4	• Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0175763	1
CTLA-4	• Ipilimumab	• Leukemia	NCT0191961	2
CTLA-4	• Ipilimumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0391206	1
PD-L1	• Atezolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0289231	1
PD-L1	• Atezolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0293536	2
PD-L1	• Atezolizumab	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0392247	1
PD-L1	• BMS-936559	• Multiple Myeloma, Leukemia	NCT0145233	1
PD-L1 + PD-L2	• IO103 + IO120	• Leukemia	NCT0393923	2
TIM3	• MBG453	• Myelodysplastic Syndromes	NCT0426630	3
TIM3 + PD-L1/PD-L2	• MBG453 + PDR001	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0306664	1
TIM3 / PD-1	• RO7121661	• Metastatic	NCT0370832	1
TIM3 + P53	• MBG453 + HDM201	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0394035	1
LAG3 / PD-1	• MGD013	• Hematologic Malignancies	NCT0321926	1
LAG3	• REGN3767	• Malignancies	NCT0300578	1
LAG3 + PDL1/PDL2	• LAG525+ PDR001	• Hematologic Malignancies	NCT0336579	2
TIGIT + LAG3	• BMS-986207+BMS-986016	• Multiple Myeloma	NCT0415096	2
TIGIT	• IB1939	• Advanced Malignancies	NCT0435383	1
TIGIT	• COM902	• Advanced Cancer, Plasma	NCT0435424	1
PVRIG	• COM701	• Advanced Cancer, Plasma	NCT0366771	1
NKG2A	• Monalizumab(IPH2201)	• Hematologic Malignancies	NCT0292168	1
NKG2A	• Monalizumab(IPH2201)	• Hematologic Malignancies	NCT0255751	2
KIR	• Lirilumab (IPH2102)	• Acute Myeloid Leukemia	NCT0168738	2
KIR+PD-1	• Lirilumab + Nivolumab	• Bladder Cancer	NCT0353245	2

IV.2 Vacunas de péptidos

Otra manera de estimular al sistema inmunitario para potenciar la citotoxicidad contra las células tumorales es mediante la vacunación. El tratamiento con vacunas Wilms' Tumor 1 (WT1), un factor de transcripción que aparece sobreexpresado o mutado con frecuencia en los pacientes de LMA, ha demostrado capacidad de estimulación de linfocitos y fue aprobado como tratamiento huérfano para los pacientes de LMA ²⁷³.

IV.3 Terapia Celular Adoptiva

La terapia celular adoptiva (ACT) es un tipo de inmunoterapia que implica la transferencia intravenosa de células inmunitarias con capacidad antitumoral, una vez que el paciente es tratado con un régimen de acondicionamiento que agota las células linfoides. Las células transferidas pueden ser autólogas (aunque la calidad de la célula de algunos pacientes podría estar demasiado deteriorada debido a tratamientos previos o a la propia enfermedad) o células alogénicas de un donante (en este caso, el principal riesgo sería el posible rechazo del paciente a las células del donante ²⁷⁴.

La efectividad de la ACT de células NK en los pacientes de LMA queda de manifiesto en trasplantes de células madre hematopoyéticas de donantes haploidénticos consiguiendo no solo restaurar las células NK después de tratamientos intensivos de quimioterapia sino que además son capaces de acabar con la enfermedad mínima residual ²⁷⁵. Además de su demostrada capacidad alorreactiva frente a los blastos de LMA, las células NK tienen un bajo perfil secretor de citoquinas proinflamatorias y bajo riesgo de EICH ²⁷⁶. Los trasplantes de células NK alorreactivas de donantes haploidénticos han conseguido controlar las recaídas sin provocar EICH ²⁷⁷. En pacientes de LMA resistentes a radioterapia, la terapia adoptiva de células NK mostró un mejor control de la leucemia y se asoció con una mayor densidad de células NK en la médula ósea ²⁷⁸.

Las células NK pueden obtenerse de diferentes fuentes (células mononucleares de sangre periférica (PBMC), sangre del cordón umbilical (UCB), médula ósea (MO), células madre hematopoyéticas, células madre pluripotentes inducidas (IPS) y líneas celulares ²⁷⁶. La Tabla V recoge ensayos clínicos con transferencia adoptiva de células NK en pacientes de LMA.

Las características de las células infundidas son críticas para la eliminación de la enfermedad mínima residual y la eficacia de las terapias adoptivas puede ser mejorada mediante estimulación y expansión con interleuquinas (IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21) in vitro o in vivo. Las células LAK, son células asesinas naturales activadas por linfoquinas con mayor capacidad citotóxica ²⁷⁹. Las células NK de pacientes de LMA cultivadas con IL-1beta, IL-3, IL-6, SCF, EPO and GM-CSF han demostrado ser eficaces en la eliminación de los blastos de LMA in vitro ²⁸⁰. Las células NK preactivadas con IL-12/IL-15/IL-18 producen elevadas cantidades de IFN-γ y presentan un fenotipo asociado a células memoria ²⁸¹.

Las células NKT-like (CD3+ CD56+) también pueden mejorar su capacidad citotóxica in vitro. Schmidt-Wolf et al. lograron expandir células con una potente actividad antitumoral in vitro a partir de células mononucleares cultivadas con anti CD3, IL-2 e IFN-γ. Esta población celular se denominó células asesinas inducidas por citoquinas (CIK, del inglés, *cytokine induced killer*) ²⁸². Las células CIK son linfocitos grandes y granulares que comparten un fenotipo similar a las células NK y a las células T, expresan NKG2D, NKp30 y DNAM-1 y tienen capacidad citotóxica, contienen principalmente gránulos de Granzima y Perforina y secretan citoquinas. A las dos semanas de cultivo se observa alta expresión de LAG3, TIM3, y baja expresión de PD-1, TIGIT y CTLA-4 ²⁸³. Estas células inducidas por citoquinas presentan fuerte actividad anti-leucémica ²⁸⁴.

Resultados recientes que evaluaron en 85 pacientes, la eficacia de la inmunoterapia basada en la infusión de células NK y células DC-CIK (una vez cada 3 meses durante 2 a 4 ciclos) mostraron tasas de supervivencia general a 5 años y supervivencia sin recaída de 90,5 y 65,2%, respectivamente ²⁸⁵.

Tabla V: Ensayos Clínicos basados en terapia adoptiva de células NK

NCT Number	Interventions	Phase
NCT04347616	Biological: UCB-NK cells Drug: IL-2	2
NCT04327037	Expanded Haploidentical Natural Killer cells+ Drug: IL-2	1
NCT04310592	Biological: CYNK-001	1
NCT04221971	Drug: chemotherapy combined with NK cells infusion	1
NCT04209712	Biological: haploid allogeneic NK cell therapy	1
NCT04166929	Biological: Haplo BMT with NK cells Biological: Haplo BMT	2
NCT03955848	Biological: Alloreactive NK cell infusion	NA
NCT03300492	NK-DLI	2
NCT03081780	Biological: FATE-NK100	1
NCT03068819	Drug: CIML NK Cell Infusion	1
NCT02890758	Biological: Natural Killer (NK) Cells Biological: ALT803	1
NCT02809092	Biological: NK Cells	2
NCT02782546	Procedure: CIML NK cell infusion	2
NCT02763475	NK cell infusion IL-2	2
NCT02477787	Biological: allogeneic, donor-derived NK cells	2
NCT02395822	Biological: IL-15	2
NCT02316964	natural killer cell therapy	1
NCT02229266	Biological: NK cells	2
NCT01947322	Drug: Allogenic NK cells infusion	2
NCT01898793	Cytokine-induced killer cells IL-2	2
NCT01795378	Biological: donor natural killer cell infusion	2
NCT01787474	Interleukin-21-Expanded Haploidentical Natural Killer Cells	2
NCT01385423	Preparative Regimen IL-15 (rhIL-15)	1
NCT01370213	NK Cells Drug: Interleukin-2	2
NCT00789776	Natural Killer Cell Therapy	2
NCT00303667	Natural killer cells	2
NCT00187096	Natural Killer Cell Infusion	NA
NCT00145626	Allogeneic stem cell and NK cell transplantation	2

IV.4 Células modificadas con receptores quiméricos (CAR)

Los receptores de antígenos quiméricos (CAR, del inglés *chimeric antigen receptor*) son receptores capaces de reprogramar la señalización intracelular de las células inmunitarias con fines terapéuticos. Los resultados no han sido muy prometedores en el tratamiento de la LMA debido principalmente a que los antígenos presentes en la LMA se expresan en múltiples ocasiones en células mieloides normales y células madre hematopoyéticas por lo que podría causar una toxicidad mieloablativa grave²⁸⁶.

Por otro lado, están los riesgos de toxicidad fuera del objetivo o síndrome de liberación de citoquinas que pueden aparecer en la terapia adoptiva de células CAR-T, de ahí parte del creciente interés por las células CAR-NK en el tratamiento de la LMA. La línea NK-92 aprobada por la FDA se expande de manera homogénea e ilimitada *ex vivo*, no causa toxicidades graves y es poco inmunogénica. El primer ensayo clínico en humanos basado en terapia adoptiva de células NK-92 modificadas genéticamente (CD33 CAR-NK-92) fue en pacientes de LMA recidivante y refractaria²⁸⁷.

A principios de 2019 se consiguió mediante ingeniería genética modificar la línea celular NK92 para que codifique los cuatro componentes humanos del complejo de señalización CD3 (CD3ζ, CD3ε, CD3δ, CD3γ) y un TCR funcional (Figura 21). Esta línea TCR-NK-92 proporcionaba especificidad y eficacia en la lisis de células diana similar a las células T tanto *in vitro* como *in vivo* consiguiendo una fuerte fosforilación de moléculas de señalización, incluidas CD3ζ, Zap70 y SLP76, mientras mantenía las funciones inherentes innatas de las células NK²⁸⁸.

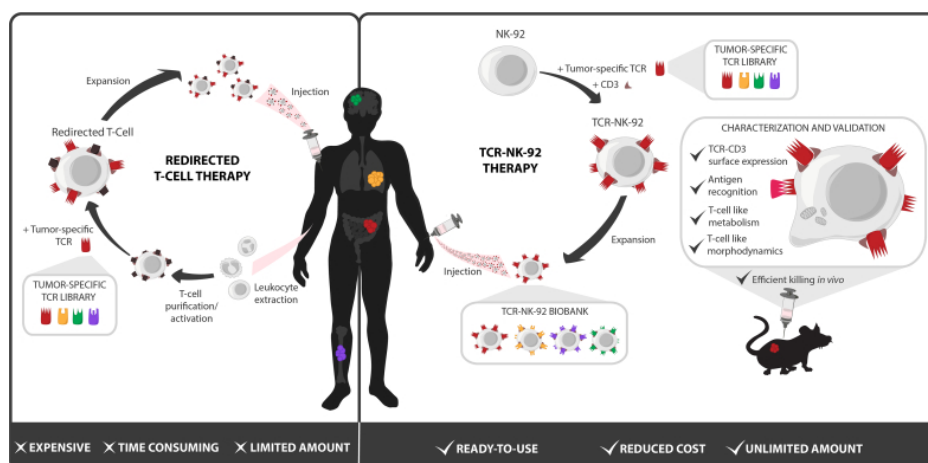


Figura 19: Ventajas de la inmunoterapia basada en la terapia adoptiva de células TCR-NK. El uso de células NK “universales” diseñadas para expresar TCR terapéuticos ofrecen la ventaja de ser una población celular homogénea y bien definida y con capacidad indefinida de expansión que estaría disponible en biobancos para pacientes con antígenos tumorales y HLA que coincida con los TCR existentes en el formato TCR-NK-92. Fuente: Mensali et al. (2019).

Las células CIK también han sido manipuladas con vectores retrovirales que codifican para CD33 y han demostrado in vitro citotoxicidad frente a los blastos de LMA ²⁸⁹.

CD33, CD123, CD38, CD7, CD44v6, FR β , Lewis Y y FLT3 son algunos de los antígenos que se encuentran en investigación como candidatos potencialmente adecuados para la terapia con CAR en la LMA, que busca lograr eficacia y baja toxicidad ²⁹⁰.

Las células CAR-T han sido igualmente manipuladas genéticamente para expresar una amplia gama de citoquinas de manera constitutiva y modular así la maduración, activación y proliferación celular. La expresión transgénica de IL-15 logro inducir fenotipos de memoria, una mayor expansión dependiente de antígenos y una tasa de muerte celular reducida y efectos antitumorales mejorados in vivo. La IL-12 logra fuerte efecto antitumoral al inducir diferenciación de las células T hacia el fenotipo Th1, al tiempo que inhibe el desarrollo de Th2. La IL-18 mejora la secreción de IFN- γ y otras citoquinas como IL-2, GM-CSF, TNF- α ²⁹¹.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis y objetivos

La Hipótesis general planteada en este estudio fue:

“Las células NK, NKT-like y T sufren cambios fenotípicos en los pacientes de LMA que alteran la respuesta anti-leucémica y contribuyen a una menor supervivencia de los pacientes”.

Para responder a esta hipótesis el objetivo general planteado fue:

El análisis de la expresión de *checkpoints*, receptores activadores y proteínas citotóxicas intracelulares en las células NK, NKT-like y T, así como la expresión de diferentes ligandos expresados en la superficie de las células leucémicas (blastos de LMA).

Objetivos concretos:

- 1) Analizar la expresión de múltiples receptores en la superficie de las células NK, NKT-like y T en pacientes de LMA y controles sanos.
- 2) Identificar aquellos receptores cuya expresión alterada se correlacione con la supervivencia del paciente.
- 3) Realizar un análisis comparativo de receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK, NKT-like y T de la médula ósea y sangre periférica de los pacientes de LMA.
- 4) Estudiar la expresión de distintos ligandos en la superficie de los blastos de LMA y su correlación con la expresión de los receptores analizados en la superficie de las células NK, NKT-like y T.
- 5) Analizar el contenido intracelular de Perforina, Granulinsina y Granzima B y su relación con receptores de superficie en las células NK, NKT-like y T en pacientes de LMA y controles sanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Donantes sanos y pacientes

Las muestras del estudio fueron facilitadas por el Hospital San Pedro de Alcántara de Cáceres y el Hospital Reina Sofía de Córdoba. El presente estudio recoge un total de 36 muestras de sangre periférica de pacientes recién diagnosticados de Leucemia Mieloide Aguda y 20 individuos controles sanos. Igualmente, se recogieron muestras de médula ósea de los pacientes cuando se realizó la punción lumbar en el momento del diagnóstico.

El diagnóstico de la LMA fue establecido atendiendo a criterios citomorfológicos y citoquímicos basados en la clasificación Franco-Americana-Británica (FAB) y caracterización inmuno-fenotípica de células leucémicas.

El estudio fue aprobado por los Comités de Ética de la Universidad de Extremadura, del Hospital San Pedro de Alcántara y del Hospital Reina Sofía. Todos los procedimientos se llevaron a cabo siguiendo los principios de la declaración de Helsinki. Todos los participantes fueron informados del estudio y se obtuvo el consentimiento informado de acuerdo con la normativa recogida en la Ley 14/2007 de Investigación biomédica (Título V, capítulo III, Utilización de muestras biológicas humanas con fines de investigación biomédica).

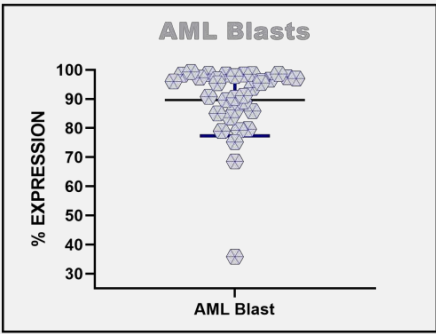
Características clínicas de los pacientes de LMA

Los sujetos incluidos en el presente estudio fueron un total de 56 individuos, 36 pacientes diagnosticados de leucemia mieloide aguda durante el periodo comprendido entre el 19 de mayo de 2017 y el 1 de marzo del 2020. No se incluyeron en el estudio 6 pacientes de LMA de los que solo se obtuvo muestra de médula ósea en el momento del diagnóstico. El grupo control estuvo formado por 20 sujetos sanos.

Tal como se refleja en la tabla VI, que recoge las características clínicas de los pacientes, la edad media fue de 69,5 años (rango 25-90) para los pacientes de LMA y de 59,85 años (rango 18-91) para el grupo control.

Tabla VI: Características clínicas de los pacientes de LMA

Clinical characteristics of patients with acute myeloid leukemia		
	Characteristic	Value
No. Patients		36
Age	Median (Range)	74,5 (25-90)
	Mean (SD)	69,5± 16,5
Sex no. (%)	Male	26 (72,22%)
	Female	10 (27,7%)
FAB classification no. (%)	M0	0%
	M1	6 (16,66%)
	M2	3 (8,33%)
	M3	1 (2,7%)
	M4	5 (13,88%)
	M5	9 (25%)
	M6	1 (2,7%)
	M7	1 (2,7%)
Secondary AML no. (%)		6 (16,66%)
AML classification not available (N/A)		4 (11,11%)
Cytogenetic risk no. (%)	Favorable	4
	Intermediate	17
	Adverse	8
	N/A	7
AML Blasts in peripheral blood		89,67±12,34%



Los pacientes de LMA siguieron una distribución del 72,22% de hombres frente a un 27,78% de mujeres y en los controles sanos un 75% fueron hombres frente a un 25% de mujeres.

El subtipo FAB de LMA diagnosticada con más frecuencia fue la M5 en un 25% de los casos, seguida con un porcentaje próximo al 17% por la M1 (Tabla VI).

El porcentaje de blastos calculado a partir del número de eventos y considerando la suma de blastos y linfocitos como el 100% de la muestra analizada fue de $89,67 \pm 12,34$ y el porcentaje de linfocitos de $10,32 \pm 12,34$.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de médula ósea y sangre periférica fueron sometidas a una centrifugación diferencial para la separación de células por gradiente de densidad y aislamiento de la fracción de células mononucleares.

Para ello se diluyeron las muestras 1:1 con PBS y posteriormente se depositaron a un ritmo lento y constante sobre el medio de separación Lymphoprep (STEMCELL Technologies, VAN, Canadá) previamente depositado en un tubo en una proporción 1/3 respecto al volumen final.

Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 20 min y tras la centrifugación se recogió el halo blanquecino que contiene las células mononucleares. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y médula ósea se lavaron dos veces con PBS mediante centrifugación durante 5 min a 1500 rpm con freno.

Las PBMC células obtenidas se resuspendieron en PBS y se realizó el recuento celular y análisis de la viabilidad utilizando la cámara de Neubauer y azul tripán. Para el cálculo del número de células por ml se aplicó la fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ células/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de células en el cuadrado central} \times \text{dilución} \times 10^4.$$

Criopreservación de las muestras

El método de congelación es crítico para el mantenimiento de la viabilidad y funcionalidad de la célula tras la descongelación.

Se usó como medio de congelación DMSO al 10% en suero fetal bovino (FBS), el DMSO es una solución permeable hidrosoluble, de bajo peso molecular que previene la formación de cristales de hielo.

Para que el descenso de la temperatura fuera gradual y así preservar la viabilidad de la muestra los criotubos con las células resuspendidas en el medio de congelación se introdujeron en el recipiente de congelación Mr. Frosty (Thermo Scientific™) diseñado para conseguir una velocidad de refrigeración próxima a 1° C/min.

Citometría de flujo

Para determinar las diferentes poblaciones celulares y la expresión simultánea de los receptores se realizó citometría multiparamétrica de 8 colores utilizando anticuerpos monoclonales marcados con diferentes fluorocromos. La combinación de fluorocromos se seleccionó cuidadosamente para impedir el solapamiento de fluorescencias y las uniones inespecíficas. En la Tabla VII se indica el listado de anticuerpos utilizados y la casa comercial.

Como método de control del panel multicolor usamos el control de fluorescencia menos uno (FMO). Para evaluar la posible interferencia de cada molécula con su conjugado, se marcaron las células con todos los anticuerpos menos el que se está evaluando y se comprobó que no se detectaba fluorescencia en ese canal. Además, como controles negativos se utilizaron anticuerpos controles isotópicos marcados con los correspondientes fluorocromos indicados en la Tabla VIII.

Tabla VII: Listado de anticuerpos por casas comerciales

<u>Miltenyi</u>	
CD56-PE-Vio770, human (clone: REA196);	
CD16-VioBlue, human (clone: REA423);	
CD57-APC-Vio770, human (clone: REA769)	
CD4-VioBlue, human (clone: VIT4)	
DNAM-1-FITC Mouse Anti-Human (Clone DX11)	
TACTILE-APC, human (clone: REA195)	
NKp44VioBright FITC, human (done: 2.29)	
NKp30(CD337)-APC, human (clone: REA823)	
Anti-KIR2D-PE, human (clone: NKVFS1)	
CD94-PerCP human (clone: REA113)	
<u>BD Phamingen</u>	
CD45-APC (Clone: 2D1)	
CD3-VioGreen, human (clone: REA613)	
NKp46-BV650 Mouse Anti-Human (Clone : 9E2/NKp46)	
CD279 -APC Mouse anti-Human (Clone: MIH4) (RUO)	
CD85j- FITC Mouse Anti-Human (Clone: GHI/75)	
<u>eBiosciences</u>	
CD4 PE (Clone: SK3BD)	
CD8 PerCP (Clone: SK1BD)	
TIGIT-PE (Clone: MBSA43)	
LAG-3-BV421 Mouse Anti-Human (Clone: T47-530BD)	
TIM-3-BB515 Mouse Anti-Human(Clone: 7D3BD)	
<u>R&D</u>	
NKG2D-BV786 Mouse Anti-Human CD314 (Clone:1D11)	
NKG2C-PE Antibody Human (Clone: CD159c)	
NKG2A-PerCP Antibody Human Clone:(CD159a)	

Tabla VIII: Controles isotípicos

<u>Miltenyi Biotec</u>	<u>BD Biosciences</u>
Vioblue: Clone IS5-21F5	PerCp: Clone R35-95
VioGreen: Clone RE A293	FITC: Clone G155-178
PE: Clone IS5-21F5	
APC: Clone IS5-21F5	
APC-Cy7: Clone Rea293	

Estudio de marcadores de superficie en linfocitos

Se diseñó un panel de 6 tubos, en el que se marcaban las células con 8 anticuerpos unidos a 8 fluorocromos distintos, tal como se indica en la siguiente tabla IX (cada color de la tabla corresponde a un tubo de análisis). Las células marcadas se incubaron durante 25 min a 4°C con los anticuerpos. Pasado ese tiempo las células se lavaron para eliminar el exceso de anticuerpo y el precipitado se resuspendió en 200 µl de PBS.

Tabla IX: Panel de análisis de marcadores de superficie de linfocitos

VioBlue	CD4	LAG3	CD16
VioGreen	CD3	CD3	CD3
FITC	DNAM	TIM3	NKp44
PE	TIGIT	CD4	NKp46
PerCp 5.5	CD8	CD8	CD8
PE Vio770	CD56	CD56	CD56
APC	TACTILE	PD1	NKp30
APC Vio 770	CD45	CD45	CD45
VioBlue	CD16	CD16	CD4
VioGreen	CD3	CD3	CD3
FITC	CD85j	NKG2C	CD6
PE	PanKIR2D	NKG2A	CD244
PerCp 5.5	CD8	CD94	CD8
PE Vio770	CD56	CD56	CD56
APC	NKG2D	CD57	NKp80
APC Vio 770	CD45	CD45	CD45

Estudio de marcadores de superficie en blastos de LMA

Un segundo panel de anticuerpos fue diseñado para identificar la expresión de determinados ligandos en la superficie de los blastos de los pacientes de LMA. En el panel de blastos como se señala en la tabla X, se marcaron los anticuerpos en 4 tubos (cada color corresponde a un tubo).

Tabla X: Panel de análisis de marcadores de superficie de blastos de LMA

VB421			CD80	
FITC	CD33	HLA-DR	CD86	CD48
PE	MICA	HLA-I	CD166	CD112
PerCp 5.5	CD273	CD34	CD34	CD34
PE Vio770	CD274	CD33	CD33	CD33
APC	B7H6	L-SECTIN	CEACAM-1	CD155
APC Vio 770	CD45	CD45	CD45	CD45

Estudio de proteínas citotóxicas intracelulares

La tinción de proteínas intracelulares (Granzima B, Perforina y Granulisina) se realizó utilizando el kit de Fijación/Permeabilización (Immunostep) siguiendo el protocolo del fabricante.

Para el fenotipado simultáneo de los antígenos de superficie y los intracelulares (Tabla XI), se procedió en primer lugar al marcaje con los anticuerpos de superficie durante 15 minutos en la oscuridad, posteriormente las células se fijaron (100ul de reactivo IntraCell A), seguido de un lavado y centrifugación. El pellet en suspensión se permeabiliza (100ul de reactivo IntraCell B) y se añadieron los anticuerpos para el marcaje de las proteínas intracelulares. Finalmente, se realiza el lavado y centrifugación.

Tabla XI: Panel de análisis de proteínas citotóxicas intracelulares

VioBlue	Perforina
VioGreen	CD3
FITC	Granulisina
PE	CD4
PerCp 5.5	CD8
PE Vio770	CD56
APC	GZM B
APC Vio 770	CD45

Estrategia de análisis de resultados

La citometría de flujo es una técnica altamente sensible que se utiliza para definir tanto el fenotipo de células leucémicas como de células normales.

La adquisición de muestras se llevó a cabo en un MASCQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) tras su calibración y ajuste de la compensación de los diferentes fluorocromos y para el análisis de las muestras se utilizó el programa FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone, Victoria, Australia).

El antígeno pan leucocitario CD45 es una proteína expresada de manera constitutiva en todas las células hematopoyéticas. La expresión de CD45 aumenta con los estados de maduración durante el proceso de hematopoyesis y permanece de manera estable en las células maduras, por lo que permite diferenciar entre los blastos de LMA (células inmaduras) y las células maduras, así como definir el linaje celular.

En la estrategia de selección de las diferentes poblaciones analizadas se utilizó la expresión de CD45 y los parámetros FSC (tamaño) y/o SSC (complejidad o granularidad). Mientras que los blastos presentan baja expresión de CD45, la región de los linfocitos se corresponde a células pequeñas, poco granulares y con alta expresión de CD45.

Una vez seleccionada la población de linfocitos, se analizó la distribución de estos en función de la expresión de CD3 y/o CD56 (Figura 20). Las tres poblaciones que se analizaron correspondieron a las células NK definidas como CD3-CD56+, los linfocitos T convencionales que expresan CD3 y no expresan CD56 y las células NKT-like caracterizadas por ser CD3+CD56+. También analizamos las subpoblaciones de linfocitos T definidas por la expresión de CD8 y CD4 (Figura 21). Posteriormente analizamos cada uno de los marcadores mencionados anteriormente en cada una de las poblaciones descritas.

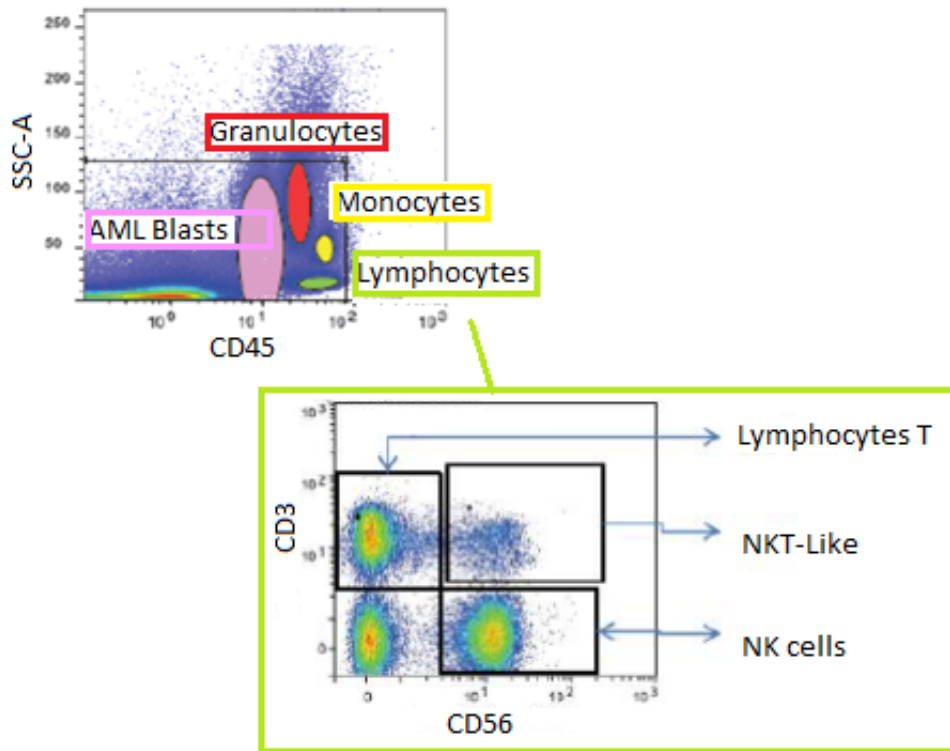


Figura 20. Selección de poblaciones Las células mononucleares (PBMCs) de los pacientes de LMA y de los controles sanos (en inglés, *healthy donors*, HD) se analizaron por citometría de flujo. La población linfocitaria fue seleccionada en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC) y utilizando el marcador CD45 (siendo considerados linfocitos las células identificadas como CD45^{high} y los bastos, las células identificadas con CD45^{low}). Una vez seleccionada la población de linfocitos, procedimos a analizar el porcentaje total de linfocitos y de la población de células NK (CD3–CD56+), células NKT-like (CD3+CD56+) y células T convencionales (CD3+CD56–).

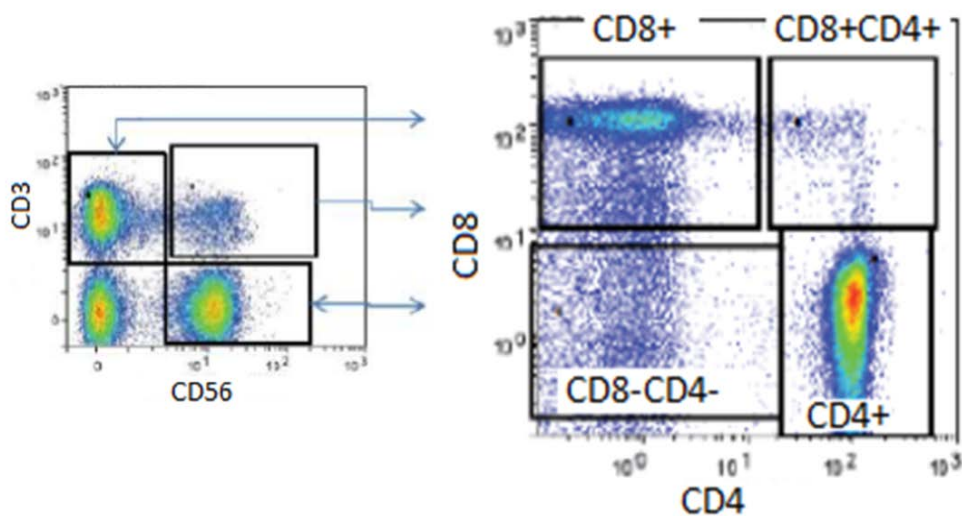


Figura 21. Analizamos la expresión de diferentes receptores activadores e inhibidores en las células NK (CD3–CD56+), células NKT-like (CD3+CD56+) y células T convencionales (CD3+CD56–) y en las subpoblaciones CD4+, CD8+, CD4+CD8+, CD4–CD8–.

Estadística

Para el procesamiento y análisis de la información se utilizó el programa estadístico SPSS versión 11.5 para Windows.

Las variables analizadas fueron edad, sexo, subtipo de LMA y la expresión y coexpresión de los diferentes receptores analizados y sus ligandos. Estas variables fueron expresadas como frecuencias absolutas y relativas.

El análisis de las diferencias se calculó mediante la prueba de Mann-Whitney. Para establecer la intensidad de la asociación entre las variables analizadas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. En todos los casos se utilizó como nivel de significación $p < 0.05$.

Los gráficos se generaron con el programa GraphPad Software Inc, San Diego, CA.

Utilizamos como método estadístico para comparar la supervivencia de los diferentes grupos la prueba log-rank test asumiendo que la censura no está relacionada con el pronóstico, que la probabilidad de supervivencia es igual en pacientes reclutados temprano o tarde en el estudio, y que los eventos ocurrieron en los tiempos especificados. El análisis está basado en el tiempo de los eventos (muerte) de cada grupo que se comparan con el número esperado de eventos si no hubiera diferencias entre los grupos y tiene como hipótesis nula que no hay diferencias entre las poblaciones para la ocurrencia de un evento (supervivencia) en ningún momento del seguimiento. El valor de p fijado fue de 0,05.

La reducción del riesgo de muerte fue calculada a partir del cociente de riesgo o Hazard ratio, de la siguiente manera: $1-(HR) \times 100 = \%$ de reducción del riesgo. El HR mide el espacio entre las curvas Kaplan-Meier de los grupos analizados para determinar el efecto a lo largo del tiempo. Es el riesgo relativo de que ocurra un evento (muerte) en un grupo en comparación al otro, durante toda la duración del estudio.

RESULTADOS

V.1 Análisis de poblaciones linfocitarias

En primer lugar, procedimos a analizar el porcentaje total de linfocitos y de la población de células NK (CD3-CD56+), células NKT-like (CD3+CD56+) y células T convencionales (CD3+CD56-) en los pacientes de LMA y en los controles sanos.

a) Linfocitos

Los resultados mostraron un descenso significativo ($p=0,000$) de linfocitos en los pacientes de LMA respecto al grupo control (Fig. 22). El porcentaje de linfocitos en los pacientes de LMA fue de $4,64\pm 4,91\%$ y en los controles sanos de $15,76\pm 15,51\%$.

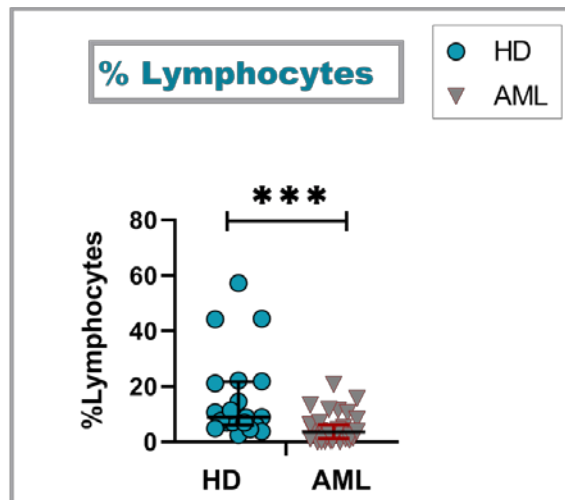


Figura 22: Análisis del porcentaje de linfocitos en sangre periférica. Las células mononucleares (PBMCs) de los pacientes de LMA (en inglés, *acute myeloid leukemia*, AML) y de los controles sanos (en inglés, *healthy donors*, HD) se analizaron por citometría de flujo. La población linfocitaria fue seleccionada utilizando el marcador CD45 (siendo considerados linfocitos las células identificadas como CD45^{high}) y en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El porcentaje de linfocitos de cada uno de los 36 pacientes de LMA aparece representado en la figura por triángulos y el de los controles sanos (n=20) por círculos. *** $p\leq 0,001$.

b) Células NK

Los resultados mostraron un descenso significativo ($p=0,001$) en el porcentaje de células NK ($CD3-56+$) en los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos (Fig. 23a). El porcentaje de células NK en los pacientes de LMA fue $13,65\pm 14,67\%$ y en los controles sanos $25,05\pm 12,91\%$. Los resultados del análisis de las subpoblaciones de las células NK, NK $CD56^{bright}$ y NK $CD56^{dim}$ también mostraron un descenso estadísticamente significativo ($p=0,000$) en los pacientes de LMA al compararlos con los controles sanos. El porcentaje de células NK $CD56^{dim}$ en los pacientes de LMA fue $13,34\pm 14,48\%$ y en los controles sanos $24,15\pm 12,84\%$ (Fig. 23b) y el de células NK $CD56^{bright}$ en los pacientes de LMA fue $0,31\pm 0,65\%$ y en los controles sanos $0,90\pm 0,68\%$ (Fig. 23c).

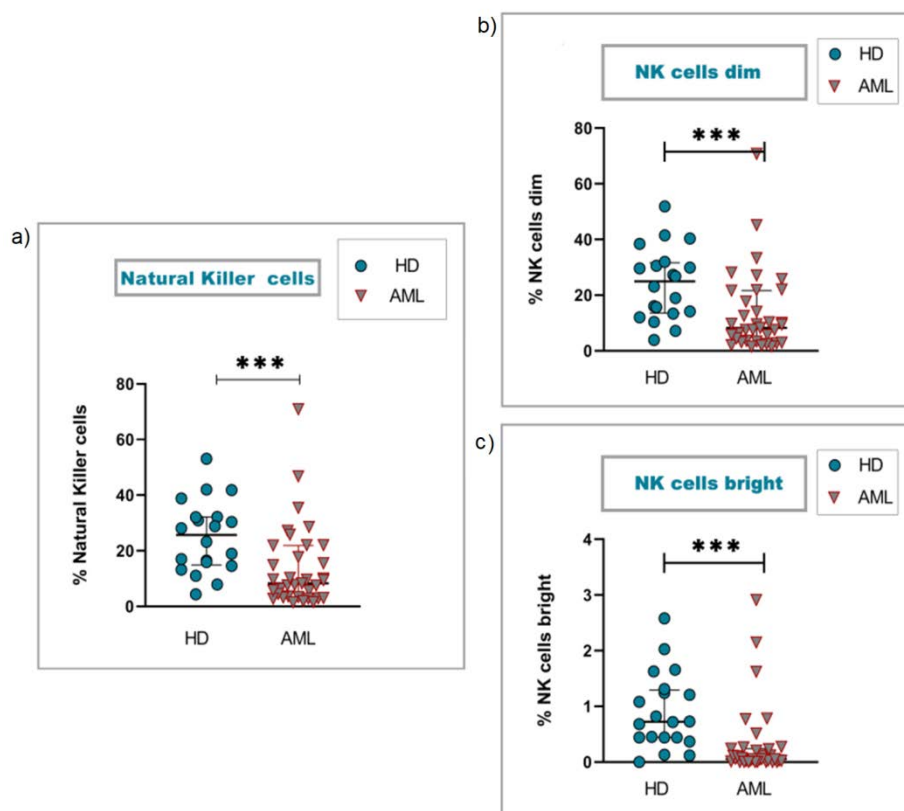


Figura 23: Análisis del porcentaje de células NK. El porcentaje total de células NK (a) y de las subpoblaciones de células NK $CD56^{dim}$ (b) y $CD56^{bright}$ (c) en los pacientes de LMA (AML) y en los controles sanos (HD) se analizó mediante citometría de flujo. Los porcentajes están referidos a la región de los linfocitos. El porcentaje de células NK de cada uno de los 36 pacientes de LMA aparece representado mediante triángulos y el de los controles sanos ($n=20$) en círculos. *** $p\leq 0,001$.

Tal como describíamos en la introducción, en las células NK también se pueden distinguir diferentes subpoblaciones en función de la expresión de los marcadores CD56 y CD16 (CD56+CD16-, CD56+CD16+ y CD56-CD16+). El porcentaje de células NK CD56+CD16+ en los pacientes de LMA fue de $32,02 \pm 23,51\%$ y en los controles sanos de $46,90 \pm 21,84\%$, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p=0,031$). No se encontraron diferencias en las otras poblaciones de células NK, siendo el porcentaje de células CD56+CD16- de $4,93 \pm 5,97\%$ en los pacientes de LMA y de $1,56 \pm 0,84\%$ en los controles sanos y el porcentaje de células NK CD56-CD16+ fue de $6,79 \pm 9,67\%$ en los pacientes de LMA y de $5,50 \pm 4,40\%$ en los donantes sanos (Fig. 24).

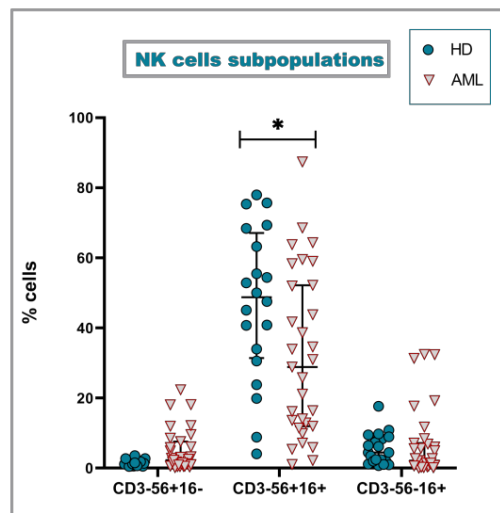


Figura 24: Análisis de las subpoblaciones de células NK: Estudio mediante citometría de las subpoblaciones de células NK definidas como linfocitos CD3- que expresan CD56 y/o CD16 (CD56+16-, CD56+16+ y CD56-16+) en los pacientes de LMA (triángulos, n=31) y en los controles sanos (círculos, n=20). * $p= 0.031$.

El análisis de la expresión de CD8 en las células NK mostró un descenso significativo ($p=0,045$) de la expresión de CD8 en las células NK de los pacientes de LMA ($30,59\pm 17,50\%$) al compararlos con los controles sanos ($39,09\pm 14,24\%$) (Fig. 25).

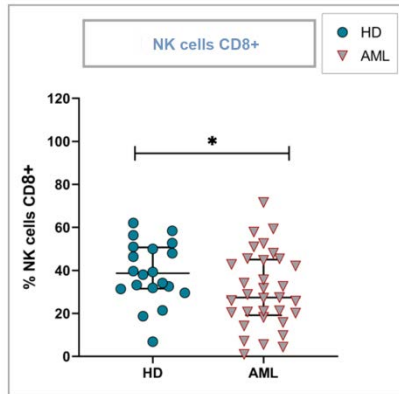


Figura 25: Análisis de la expresión de CD8 en las células NK. El porcentaje de células NK (CD3-CD56+) con expresión de CD8 se analizó mediante citometría de flujo en los pacientes de LMA (triángulos, $n=33$) y en los controles sanos (círculos, $n=20$). * $p= 0,045$.

c) Células NKT-like y células T

En la población de linfocitos seleccionada se analizó el porcentaje de células NKT-like (CD3+CD56+) y células T (CD3+CD56-). El análisis del porcentaje de ambas poblaciones se muestra en la figura 26. El porcentaje de células NKT-like (Fig. 26a) en los pacientes de LMA fue de $10,10\pm 8,40\%$ y en los donantes sanos $15,51\pm 11,82\%$, no observándose diferencias significativas. El porcentaje de células T (Fig. 26b) en los pacientes de LMA $49\pm 21,09\%$ y en los controles sanos $34,39\pm 20,67\%$, siendo las diferencias significativas ($p=0,025$).

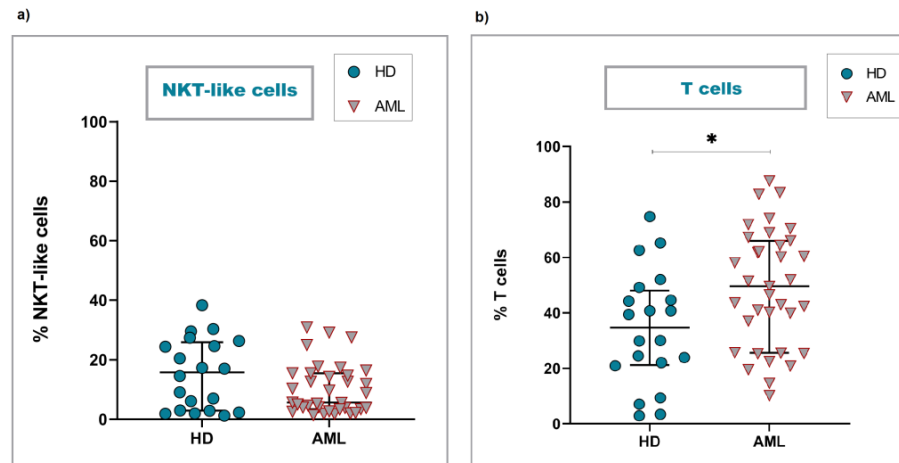


Figura 26: Análisis del porcentaje de células NKT-like y células T. Los porcentajes de células NKT-like CD3+CD56+ (a) y linfocitos T convencionales CD3+CD56- (b) referidos a la región de los linfocitos se analizaron mediante citometría de flujo. El porcentaje de células de cada uno de los 36 pacientes de LMA (AML) aparece representado mediante triángulos y el de los controles sanos (HD) (n=20) en círculos. *p= 0,025.

Los correceptores CD8 y CD4 definen las principales poblaciones de linfocitos T. El porcentaje de las cuatro subpoblaciones (CD4+, CD8+, CD4-CD8-, CD4+CD8+) de células NKT-like y células T de los pacientes de LMA y controles sanos del presente estudio se detalla en la Tabla XII. Los resultados mostraron un descenso significativo del porcentaje de células NKT-like CD4+ en los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos (p=0,025), no observándose cambios significativos en las otras poblaciones estudiadas.

Tabla XII: Subpoblaciones de células NKT-like y células T

Percentage of T cell subsets in healthy donors (HD) and AML patients		
	HD	AML
% NKT-like cells (CD3+CD56+)		
CD4+ NKT-Like	15.6 ± 14.5	8.3 ± 12.4
CD8+ NKT-like	59.9 ± 17.8	62.1 ± 20.6
DN NKT like	17.0 ± 11.0	22.3 ± 15.6
DP NKT-like	1.0 ± 1.1	0.8 ± 1.3
% T cells (CD3+CD56-)		
CD4+ T cells	53.4 ± 16.9	54.1 ± 15.4
CD8+ T cells	35.9 ± 13.5	35.4 ± 13.3
DN T cells	7.1 ± 4.4	7.7 ± 4.4
DP T cells	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.4

DP: CD4+CD8+ double positive; DN: CD4-CD8- double negative

d) Análisis de supervivencia: Poblaciones de linfocitos

En el análisis de la supervivencia de los pacientes de LMA en función del porcentaje de las diferentes poblaciones linfocitarias analizadas, los resultados no mostraron diferencias significativas en función de la población linfocitaria total ($p=0,7953$) (Fig. 27), ni en los porcentajes de células NK ($p=0,2733$) (Fig. 28a), células NKT-like ($p=0,5933$) (Fig. 28b), y células T ($p=0,1537$) (Fig. 28c).

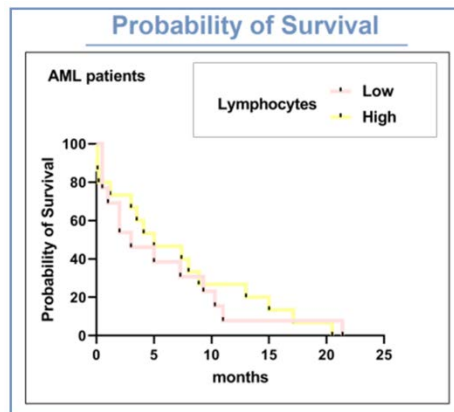


Figura 27: Curvas de Supervivencia de los pacientes de LMA según el porcentaje total de linfocitos. La curva de supervivencia de los pacientes con bajo porcentaje de linfocitos aparece representada en rosa y la de los pacientes con alto porcentaje de linfocitos es representada en amarillo ($n=30$; $p=0,7953$).

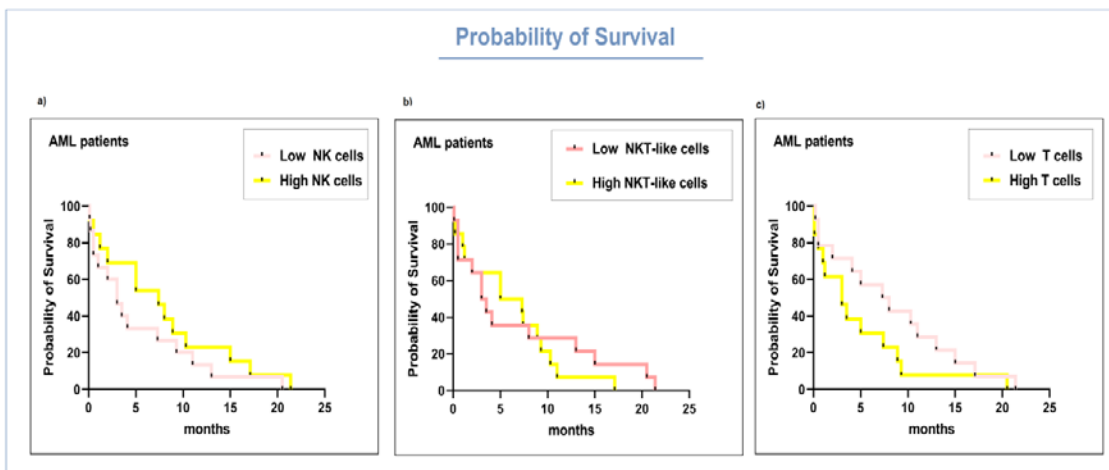


Figura 28: Curvas de Supervivencia de los pacientes de LMA según el porcentaje de las poblaciones de linfocitos. En la figura se representan las curvas de supervivencia según el porcentaje de (a) células NK, $p=0,2733$; (b) células NKT-like, $p=0,5933$ y (c) células T, $p=0,1537$. La curva de supervivencia de los pacientes con bajo porcentaje de linfocitos aparece representada en rosa y la de los pacientes con alto porcentaje de linfocitos está representada en amarillo ($n=30$).

e) Análisis de poblaciones positivas para el marcador CD57

La molécula CD57 es considerado un marcador de poblaciones maduras. Analizamos la expresión de CD57 (Fig. 29) y los resultados mostraron en los pacientes de LMA un porcentaje de células NK CD57+ de $46,25 \pm 22,41\%$ y en los controles sanos de $48,80 \pm 22,60\%$. El $40,70 \pm 22,18\%$ de las células NKT-like de los pacientes de LMA expresaron CD57 frente al $47,24 \pm 20,20\%$ de los donantes sanos. Las células T expresaron CD57 en un menor porcentaje que las células NK y NKT-like. La expresión de CD57 en las células T de los pacientes de LMA fue de $17,19 \pm 10,97\%$ y en los donantes sanos $11,55 \pm 13,54\%$. Las diferencias observadas en la expresión de CD57 entre los pacientes de LMA y los donantes sanos no fueron significativas.

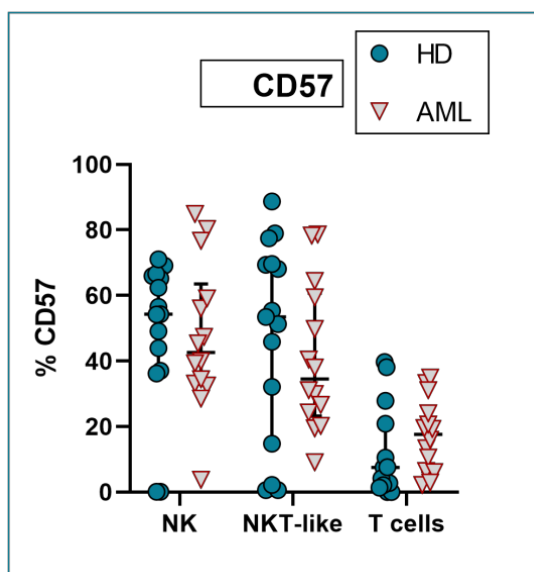


Figura 29: Análisis de la expresión de CD57. Representación de la expresión de CD57 en las células NK, NKT-like y T en los pacientes de LMA (n=15) (triángulos rojos) y en los controles sanos (n=15) (círculos verdes).

V.2 Análisis de receptores de superficie

ANÁLISIS DE *CHECKPOINTS* Y RECEPTORES ACTIVADORES en células NK, NKT-like y T de sangre periférica de pacientes de LMA vs controles sanos

a) Análisis de CD16

Analizamos la expresión de CD16 (Fig. 30) en la superficie de las células NK, NKT-like y T en los pacientes de LMA y controles sanos.

Los resultados mostraron un descenso en el porcentaje de células NK que expresaban CD16 en los pacientes de LMA ($81,81 \pm 13,29\%$) en comparación con los controles sanos ($94,36 \pm 3,11\%$) siendo las diferencias significativas ($p=0,000$). En las células NKT-like de los pacientes de LMA se observó expresión de CD16 en el $21,97 \pm 25,42\%$ de las células frente al $38,52 \pm 39,04\%$ en los controles sanos, estas diferencias no fueron significativas. En los linfocitos T de los pacientes de LMA se observó una expresión de CD16 de $2,62 \pm 6,16\%$ frente a $3,95 \pm 4,75\%$ en controles sanos, siendo las diferencias significativas ($p=0,019$).

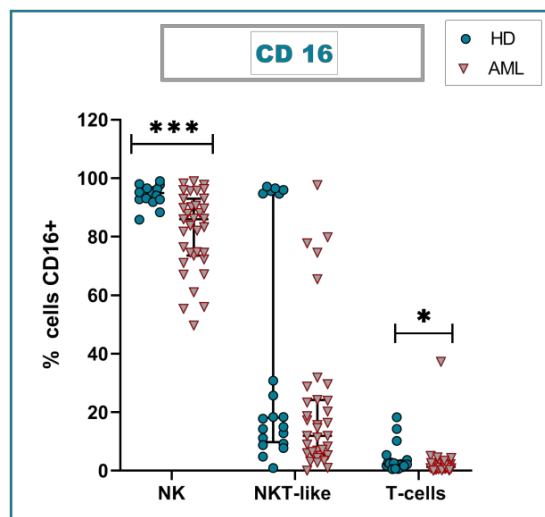


Figura 30: Análisis de la expresión de CD16. Análisis de la expresión de CD16 en las células NK (izquierda), NKT-like (centro) y células T (derecha) en los pacientes de LMA (triángulos, n=35) y los controles sanos (círculos, n=20). * $p=0,019$; *** $p=0,000$.

- Análisis de supervivencia: CD16

El análisis de supervivencia, en función de la expresión de CD16 en la superficie de las células NK (Fig. 31a) mostró una tendencia a una mayor supervivencia en los pacientes con mayor porcentaje de expresión de CD16 en las células NK ($p=0,0595$). Los pacientes con mayor porcentaje de CD16 en la superficie de las células NK reducían el riesgo de muerte en un 49% con respecto a aquellos pacientes que presentaban menor porcentaje de CD16.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia (Fig. 31b) de los pacientes de LMA según expresión de CD16 en la superficie de las células NKT-like ($p=0,1146$).

El análisis comparativo de las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor expresión de CD16 en la superficie de las células T (Fig. 31c) no mostró diferencias significativas ($p=0,5070$).

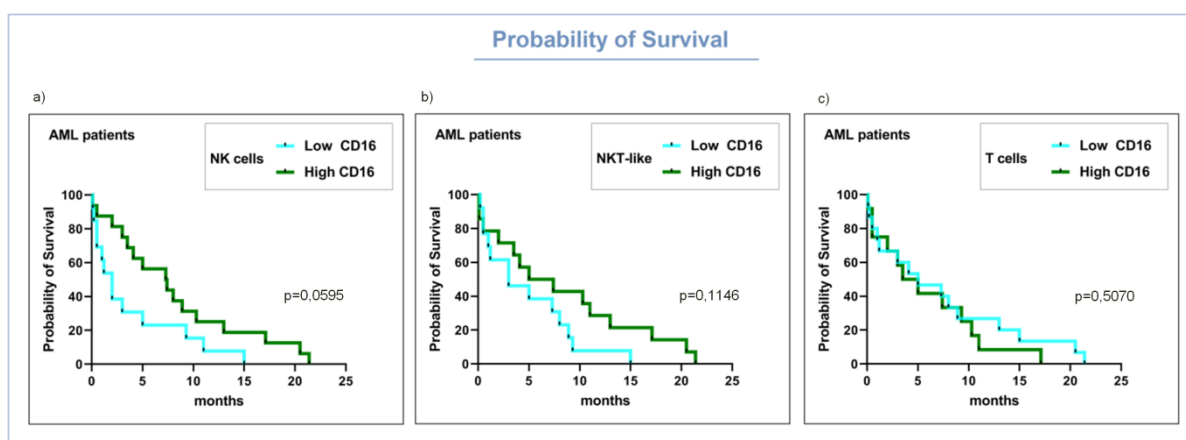


Figura 31: Curvas de Supervivencia de los pacientes de LMA según la expresión de CD16 en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 30$) se estratificaron según la expresión de CD16. a) Células NK ($p=0,0595$), b) células NKT-like ($p=0,1146$) y c) células T ($p=0,5070$). Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas para ese receptor.

b) Análisis de los NCRs

Analizamos la expresión de los NCR (receptores de citotoxicidad natural) en la superficie de las células NK, NKT-like y T en los pacientes de LMA y en los controles sanos.

Los resultados no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de NKp46, NKp30 ni NKp44 en los pacientes de LMA en ninguna de las tres poblaciones de linfocitos analizadas (NK, NKT-like y células T) al compararla con los controles sanos (Fig. 32).

El porcentaje de células NK con expresión de NKp46 en los pacientes de LMA fue inferior a la de los controles sanos ($77,01 \pm 25,60\%$ frente a $89,20 \pm 9,62\%$) aunque, como se ha indicado anteriormente, las diferencias no fueron significativas. En las células NKT-like de pacientes de LMA se observó una expresión de NKp46 en el $31,49 \pm 18,15\%$ de las células frente al $24,42 \pm 12,98\%$ en el grupo control. En las células T de los pacientes de LMA se observó una expresión de NKp46 en el $13,57 \pm 8,25\%$ de las células frente a $11,7 \pm 8,17\%$ en los controles sanos.

La expresión de NKp30 en las células NK de los pacientes de LMA fue de $29,43 \pm 25\%$ frente al $33,30 \pm 20,70\%$ en los controles sanos. En las células NKT-like de pacientes de LMA se observó una expresión de NKp30 en el $13,65 \pm 20,64\%$ frente al $9,60 \pm 18,69\%$ en los controles sanos. En las células T de los pacientes de LMA se observó una expresión de NKp30 en el $5,57 \pm 10,03\%$ de las células frente al $2,81 \pm 5,87\%$ observado en los controles sanos.

La expresión de NKp44 en las células NK de los pacientes de LMA fue de $29,24 \pm 23,79\%$ frente al $21,76 \pm 9,09\%$ en los controles sanos. En las células NKT-like de pacientes de LMA se observó una expresión de NKp44 de $20,66 \pm 20,08\%$ frente al $15,98 \pm 11,19\%$ en los controles sanos. En las células T de los pacientes de LMA se observó una expresión de NKp44 de $19,17 \pm 19,03\%$ frente al $14,97 \pm 10,52\%$ observado en los controles sanos.

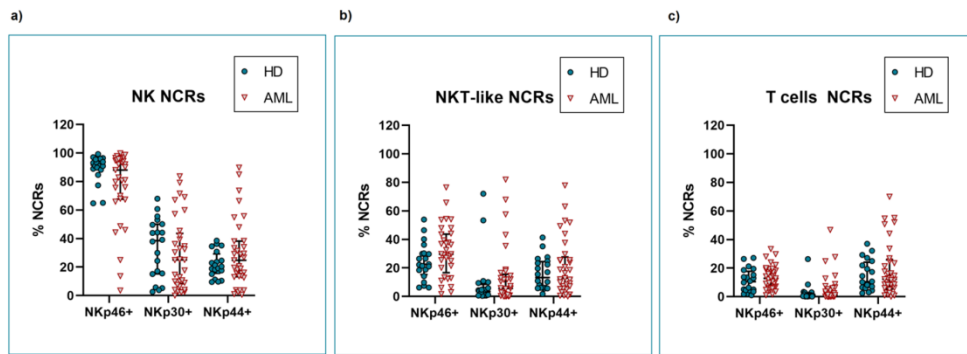


Figura 32: Expresión de NKp46, NKp30 y NKp44. Expresión de los receptores NCRs en las células NK (a), en las células NKT-like (b) y en las células T (c) en los pacientes de LMA (triángulos rojos, n=33) y los controles sanos (círculos verdes, n=20).

- Análisis de coexpresión: NCRs

El estudio de la coexpresión de NKp46, NKp30 y NKp44 en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA y controles sanos mostró un descenso significativo del porcentaje de células NK (Fig. 33) con coexpresión de NKp46 y NKp30 ($p= 0,038$) en los pacientes de LMA ($16,98\% \pm 18,38\%$) al compararlos con los controles sanos ($24,49\% \pm 15,20\%$). No se encontraron diferencias significativas en la coexpresión de los receptores NCR en las poblaciones de células NKT-like ni en las células T de los pacientes de LMA frente a los controles sanos.

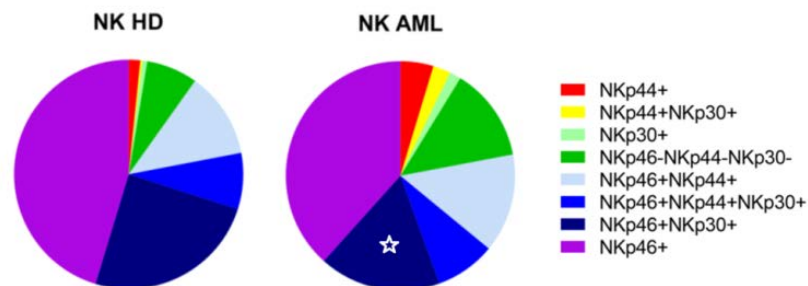


Figura 33: Análisis de coexpresión de los NCRs en células NK. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores. Las ocho posibles combinaciones de los tres receptores se indican en la parte derecha de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes de AML (n=33) y donantes sanos (n=20) para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

Se procedió al análisis de la coexpresión de estos receptores en diferentes subpoblaciones de células NK definidas por los marcadores CD56 y CD16. Los resultados mostraron que en las células NK CD56+CD16- (Fig. 34) la coexpresión de NKp46 y NKp30 disminuyó de manera significativa ($p=0,010$) en los pacientes de LMA ($14,79\pm 13,01\%$) en comparación con los controles sanos ($28,84\pm 14,67\%$) y también la coexpresión de los tres receptores NKp46+NKp30+NKp44+ fue inferior ($p=0,010$) en los pacientes de LMA ($8,10\pm 9,84\%$) frente a los valores obtenidos en los controles sanos ($11,16\pm 6,17\%$).

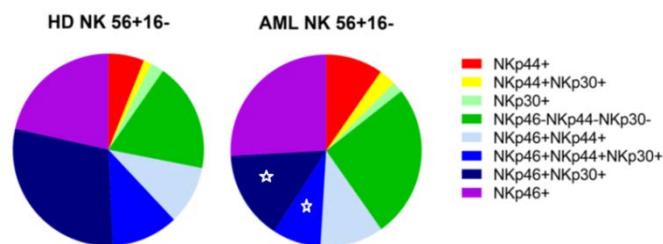


Figura 34: Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56+CD16-. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores. Las ocho posibles combinaciones de los tres receptores se indican en la parte derecha de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AML ($n=31$) y donantes sanos ($n=20$) para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

En las células NK CD56+CD16+ (Fig. 35) la coexpresión de NKp46 y NKp30 fue inferior en los pacientes de LMA ($17,85\pm 20\%$) en comparación con los controles sanos ($24,85\pm 15,92\%$), siendo las diferencias significativas ($p=0,049$).

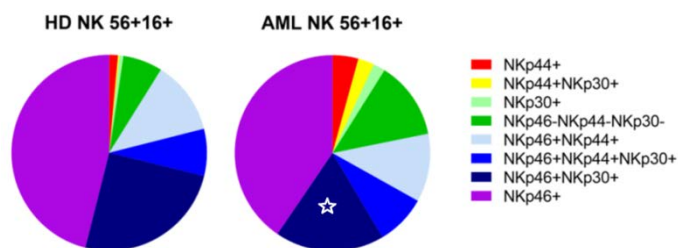


Figura 35: Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56+CD16+. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores. Las ocho posibles combinaciones de los tres receptores se indican en la parte derecha de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes de AML ($n=31$) y donantes sanos ($n=20$) para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

En las células NK CD56-CD16+ de los pacientes de LMA se observó, en comparación con los controles sanos (Fig. 36), un menor porcentaje de células con coexpresión de NKp46 y NKp30 ($p=0,000$) (HD: $20,96\pm 13,94\%$; AML: $5,13\pm 6,63\%$) y con coexpresión de los tres receptores NKp46+NKp30+NKp44+ ($p=0,01$) (HD: $6,25\pm 4,57\%$; AML $2,83\pm 5,23\%$) y aumentaban de manera significativa ($p=0,014$) en los pacientes de LMA las células NK CD56-CD16+ que no expresaban ninguno de los tres receptores (NKp46-NKp30-NKp44-) (HD: $22,14\pm 16,14\%$; AML: $34,37\pm 19,29\%$).

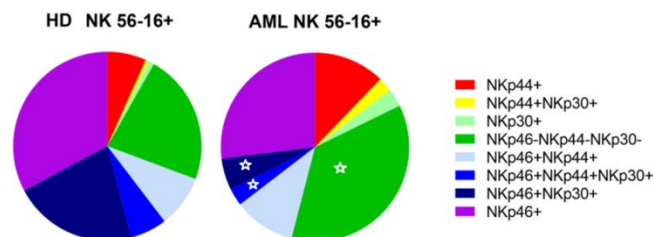


Figura 36: Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56-CD16+. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores. Las ocho posibles combinaciones de los tres receptores se indican en la parte derecha de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes de AML ($n=31$) y donantes sanos ($n=20$) para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

- Caracterización fenotípica de blastos de LMA: B7H6

Analizamos la expresión del ligando de NKp30, B7H6, en los blastos de LMA. Nuestros resultados mostraron una expresión de B7H6 en los blastos de LMA inferior al 1%.

- Análisis de supervivencia: NKp46, NKp30 y NKp44

El análisis de supervivencia (Fig. 37a) no mostró diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según el porcentaje de células NK ($p=0,6068$) con expresión de NKp46 ni en el porcentaje de expresión de NKp46 en las células T ($p=0,1447$).

Las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor porcentaje de NKp46 en las células NKT-like se diferenciaban de manera significativa ($p=0,020$). Los pacientes con mayor porcentaje de NKp46 en la superficie de las células NKT-like reducían el riesgo de muerte en un 57% con respecto a aquellos pacientes que presentaban menor porcentaje de NKp46. En el análisis de supervivencia, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA según el porcentaje de expresión de NKp30 (Fig. 37b) en las células NK ($p=0,4733$), NKT-like ($p=0,6253$) y células T ($p=0,3888$). En el análisis de supervivencia, según la expresión de NKp44 (Fig. 37c) tampoco mostró diferencias significativas en las células NK ($p=0,6035$), NKT-like ($p=0,9397$) y células T ($p=0,4602$).

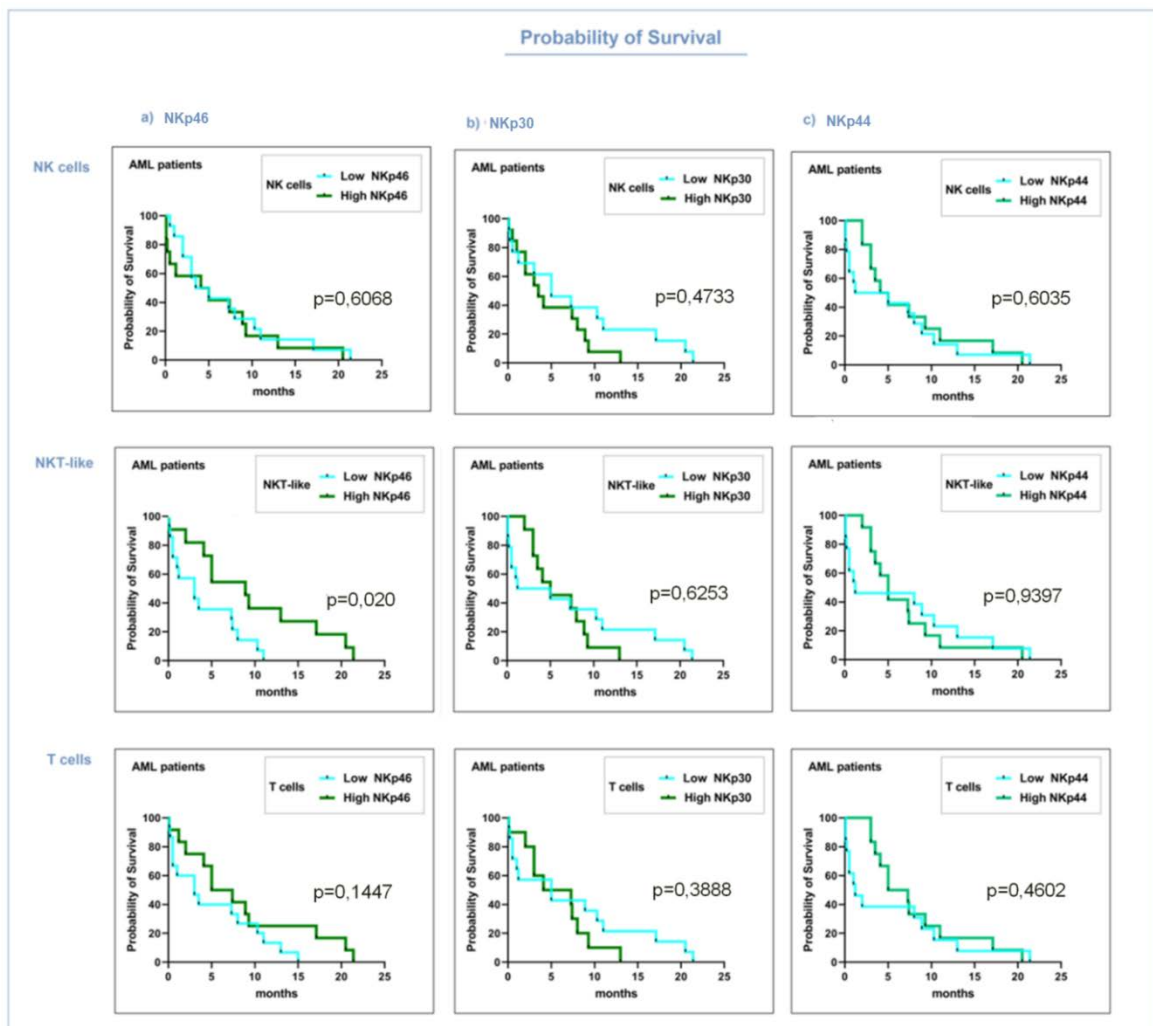


Figura 37: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de NKp46, NKp30 y NKp44 en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 29$) se estratificaron según la expresión de NKp46 (a), NKp30 (b) y NKp44 (c) en las células NK, NKT-like y T. La curva de supervivencia de los pacientes con bajo porcentaje de cada NCRs aparece representada en azul y la de los pacientes con alto porcentaje de NCRs está representa en verde.

Analizamos las curvas de supervivencia en función de la coexpresión de NKp46, NKp30 y NKp44 en las células NK de los pacientes de LMA y los resultados (Fig. 38) no mostraron diferencias significativas entre las curvas de los pacientes estratificados con alto y bajo porcentaje de coexpresión.

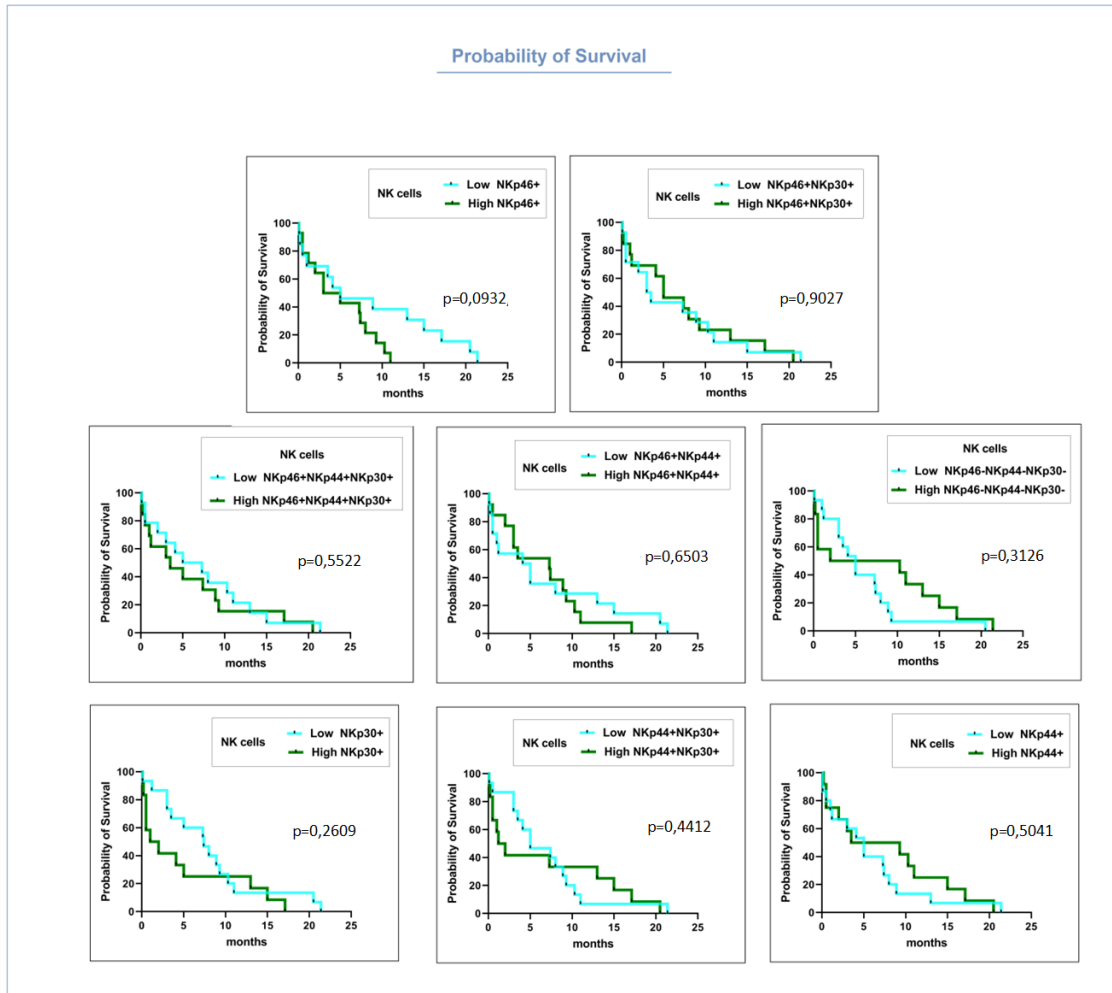


Figura 38: Análisis de Supervivencia en función de la coexpresión de NKp46, NKp30 y NKp44 en células NK de los pacientes de LMA. La curva de supervivencia de los pacientes con bajo porcentaje de NCRs aparece representado en azul y la de los pacientes con alto porcentaje de NCRs está representada en verde (n=29). Se distinguen 8 posibilidades en la coexpresión de los receptores, células que solo expresan uno de los receptores (NKp46+; NKp30+ o NKp44+), que coexpresan dos (NKp46+NKp30+; NKp46+NKp44+; NKp30+NKp44+) o los tres (NKp46+NKp30+NKp44+) y células que no expresan ninguno de los tres receptores (NKp46-NKp30-NKp44-).

c) Análisis de NKp80

Analizamos la expresión del receptor NKp80 en la superficie de las células NK, NKT-like y T (Fig. 39). La media de expresión de NKp80 en las células NK de los pacientes de LMA fue de $66,35 \pm 30,37\%$ y en los controles sanos de $89,93 \pm 8,38\%$, siendo las diferencias significativas ($p=0,007$). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de expresión de NKp80 en las células NKT-like y células T. La media de expresión de NKp80 en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $29,87 \pm 24,83\%$ y en los controles sanos $36,70 \pm 23,41\%$. La media de expresión de NKp80 en las células T de los pacientes de LMA fue de $8,48 \pm 13,15\%$ y en los controles sanos de $11,95 \pm 10,86\%$.

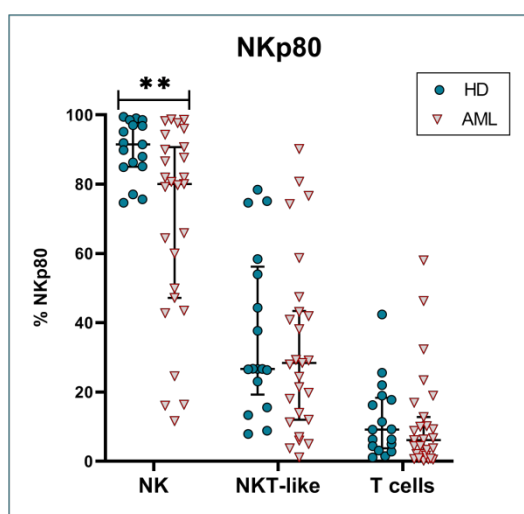


Figura 39: Análisis de la expresión de NKp80. Análisis de la expresión de NKp80 en las células NK, NKT-like y T en los pacientes de LMA (triángulos, n=28) y controles sanos (círculos, n=17) (**p=0,007).

Analizamos la expresión de NKp80 en las células NKT-like y T, CD8 positivas en los pacientes de LMA y los resultados no mostraron diferencias significativas al compararlos con los controles sanos, sin embargo, al analizar las subpoblaciones CD4 positivas (Fig. 40), los resultados mostraron en los pacientes de LMA una disminución de la expresión de NKp80 en las células NKT-like CD4+ ($p=0,001$) (HD= $51,88 \pm 28,7\%$; AML= $19,71 \pm 29,86$) y en las células T CD4+ ($p=0,006$) (HD= $12,64 \pm 23,42\%$; AML= $1,82 \pm 2,90\%$).

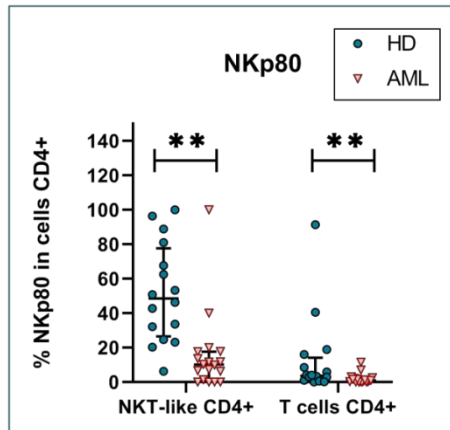


Figura 40: Análisis de la expresión de NKp80 en las células NKT-like CD4+ y T CD4+. Análisis de la expresión de NKp80 en las células NKT-like y células T en los pacientes de LMA (triángulos rojos) y los controles sanos (círculos verdes). ** $p \geq 0,001$.

- Análisis de supervivencia: NKp80

En el análisis de supervivencia (Fig. 41), los resultados no mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según la expresión de NKp80 en la superficie de las células NK ($p=0,5509$), NKT-like ($p=0,2775$) o células T ($p=0,2332$).

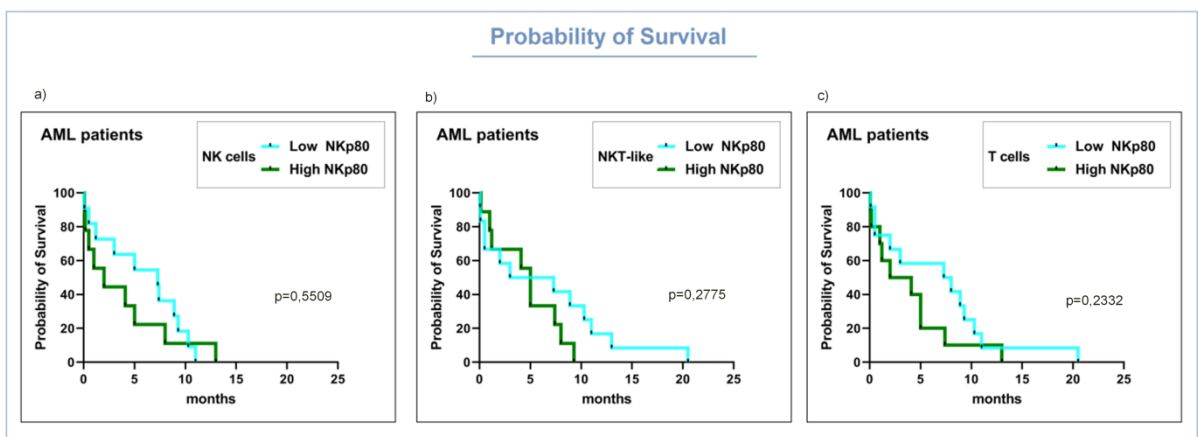


Figura 41: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de NKp80 en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 22$) se estratificaron según la expresión de NKp80. Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. a) Células NK, b) NKT-like y c) células T.

d) Análisis de NKG2D

Analizamos la expresión del receptor NKG2D en la superficie de las células NK, NKT-like y células T y los resultados no mostraron diferencias significativas en los pacientes de LMA al compararlos con los controles sanos (Fig. 42). La expresión de NKG2D en las células NK de los pacientes de LMA fue $41,19 \pm 32,69\%$ y $30,43 \pm 30,18\%$ en los controles sanos. La expresión de NKG2D en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue $35,07 \pm 29,70\%$ y $24,74 \pm 28,39\%$ en los controles sanos. La expresión de NKG2D en las células T de los pacientes de LMA fue de un $14,20 \pm 16,69\%$ y en los controles sanos $9,24 \pm 10,04\%$.

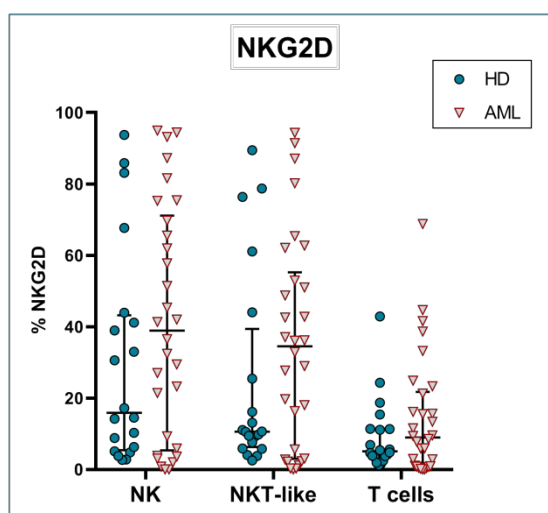


Figura 42: Análisis de la expresión de NKG2D. Análisis de la expresión de NKG2D en las células NK, NKT-like y células T en pacientes de LMA (triángulos rojos, n=30) y los controles sanos (círculos verdes, n=20).

- Caracterización fenotípica de blastos de LMA: MICA/B

Se analizó la expresión del ligando de NKG2D, MICA/B en la superficie de los blastos de LMA y los resultados mostraron una expresión de este ligando en casi el 100% de las LMA analizadas y una media de expresión de MICA/B en blastos de leucemia de un $34,42 \pm 22,36\%$ (Fig. 43).

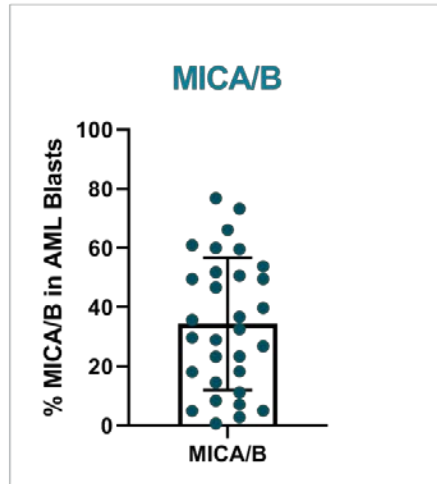


Figura 43: Análisis de la expresión de MICA en los blastos de LMA. La expresión de MICA está representada en la figura de manera individual mediante círculos. La línea superior de la caja indica la media de expresión de MICA y los bigotes la desviación estándar (n=25).

La expresión de MICA en la superficie de los blastos de LMA no se relacionó de manera significativa con la expresión de su receptor en la superficie de las células NK ($p=0,614$; $r=-0,100$), células NKT-like ($p=0,658$; $r=-0,088$), ni células T ($p=0,588$; $r=-0,105$). La expresión de MICA/B en la superficie de los blastos (Fig. 44) mostró una fuerte relación positiva ($p=0,000$) con el porcentaje de blastos ($r=0,96$).

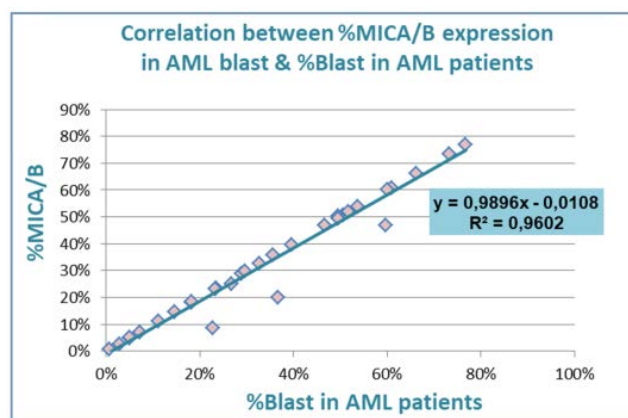


Figura 44: Correlación entre el porcentaje de expresión de MICA/B en los blastos de LMA y el porcentaje de blastos. Se han analizado 31 pacientes de LMA (** $p=0,000$).

- Análisis de supervivencia: NKG2D

En el análisis de supervivencia (Fig. 45), los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA según el porcentaje de expresión de NKG2D en la superficie de las células NK ($p=0,8841$), NKT-like ($p=0,7423$) y células T ($p=0,7297$).

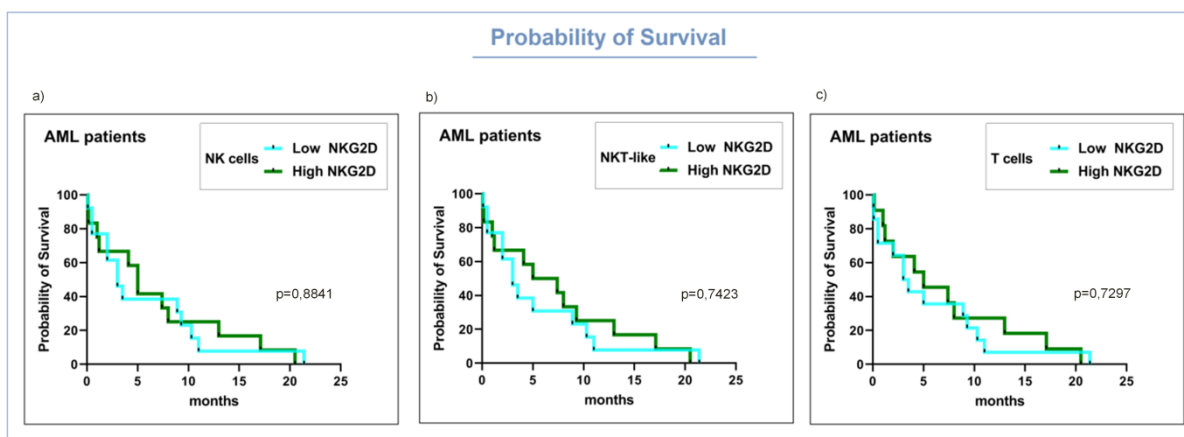


Figura 45: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de NKG2D en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 27$) se estratificaron según la expresión de NKG2D. Se utilizaron las medianas para los valores de corte. Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. a) Células NK, b) NKT-like y c) Células T.

e) Análisis de CD6

La expresión de CD6 en los pacientes de LMA disminuyó de manera significativa al compararlo con los controles sanos (Fig. 46) en las células NK, NKT-like y en las células T. La media de expresión de CD6 en las células NK fue $44,05 \pm 23,04\%$ en los pacientes de LMA y $60,96 \pm 13,88\%$ en los controles sanos ($p=0,025$). El porcentaje de células NKT-like con expresión de CD6 fue del $70,17 \pm 22,02\%$ en los pacientes de LMA y del $85,98 \pm 11,17\%$ en los controles sanos ($p=0,044$). En las células T, el porcentaje de expresión de CD6 fue del $87,97 \pm 9,96\%$ en los pacientes de LMA y $96,17 \pm 1,91\%$ en los controles sanos ($p=0,000$).

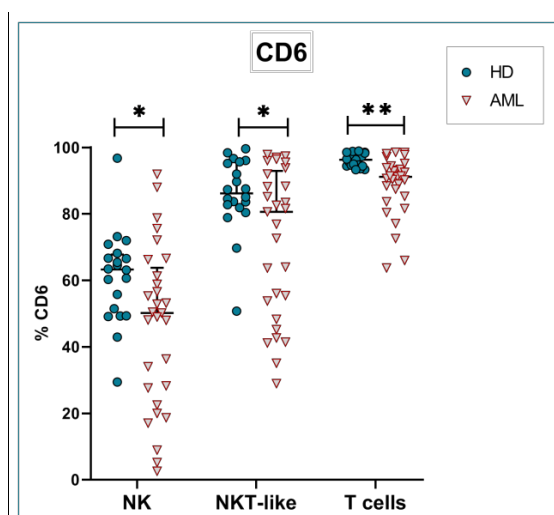


Figura 46: Análisis de la expresión de CD6. Análisis de la expresión de CD6 en las células NK, NKT-like y células T en los pacientes de LMA (triángulos rojos, n=29) y los controles sanos (círculos verdes, n=20).

- Caracterización fenotípica de blastos de LMA: CD166

Se analizó la expresión de CD166, ligando de CD6, en los blastos de los pacientes de LMA y los resultados mostraron una expresión muy baja de esta molécula ($3,03 \pm 10,34\%$). No se observó una relación significativa entre la expresión de CD166 en los blastos de LMA y la expresión de su receptor CD6 en la superficie de las células NK, NKT-like y células T.

- Análisis de supervivencia: CD6

En el análisis de supervivencia de los pacientes de LMA estratificados según tuvieran un alto o bajo porcentaje de expresión de CD6 (Fig. 47), los resultados no mostraron diferencias significativas entre las curvas en las células NK ($p=0,2413$), NKT-like ($p=0,6831$) ni en las células T ($p=0,5480$).

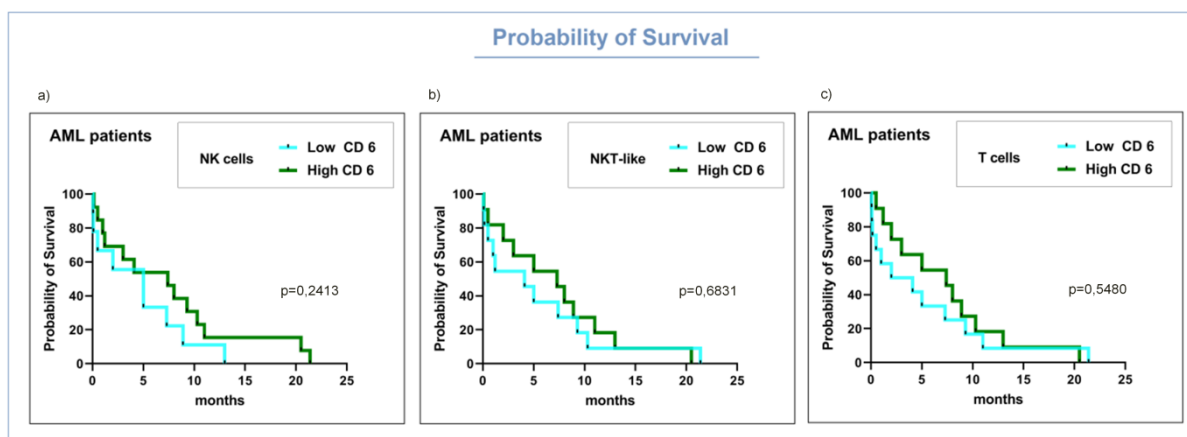


Figura 47: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de CD6 en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 24$) se estratificaron según la expresión de CD6. Se utilizaron las medianas para establecer los valores de corte. Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas a) Células NK, b) NKT-like y c) células T.

f) Análisis de CD244

La expresión de CD244 no mostró diferencias significativas en los pacientes de LMA frente a los controles sanos en ninguna de las poblaciones analizadas (Fig. 48). La media de expresión de CD244 en las células NK de los pacientes de LMA fue de $41,96 \pm 23,29\%$ y en los controles sanos de $38,66 \pm 30,66\%$. La expresión de CD244 en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $34,52 \pm 21,35\%$ y en los controles sanos $33,89 \pm 22,70\%$. En las células T la expresión de CD244 fue de $14,74 \pm 13,28\%$ en los pacientes de LMA y $27,02 \pm 27,36\%$ en los controles sanos.

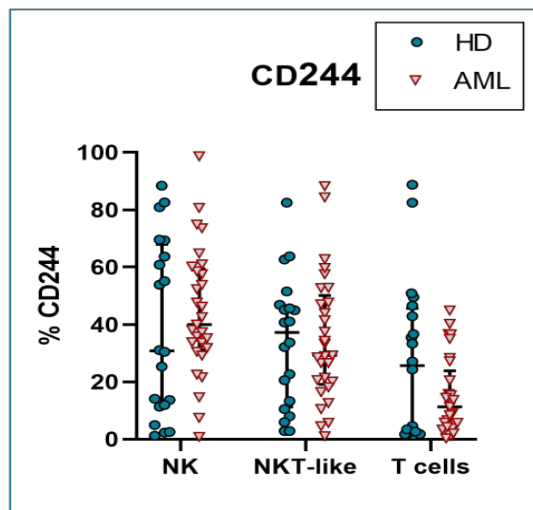


Figura 48: Análisis de la expresión de CD244. Análisis de la expresión de CD244 en las células NK, NKT-like y células T en los pacientes de LMA (triángulos rojos, n=29) y en los controles sanos (círculos verdes, n=20).

- Caracterización fenotípica de blastos de LMA: CD48

Analizamos la expresión de CD48, ligando de CD244, en los blastos de LMA y los resultados mostraron una expresión del $67,15 \pm 33,3\%$ (Fig. 49). La expresión del ligando CD48 en los blastos de LMA no mostró una correlación significativa con la expresión del receptor CD244 en la superficie de las células NK ($p=0,666$; $r=-0,100$), NKT-like ($p=0,273$; $r=0,244$) ni en las células T ($p=0,280$; $r=0,241$).

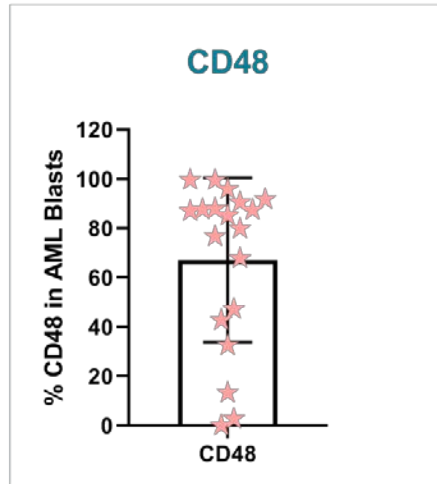


Figura 49: Análisis de la expresión de CD48 en los blastos de LMA. La expresión de CD48 en cada LMA analizada queda representada en la figura por las estrellas. La línea superior de la caja indica la media de expresión de CD48 y los bigotes muestran la desviación estándar.

- Análisis de supervivencia: CD244

En el análisis de supervivencia (Fig. 50), los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA según la expresión de CD244 en la superficie de las células NK ($p=0,6575$), NKT-like ($p=0,4168$) y células T ($p=0,1418$).

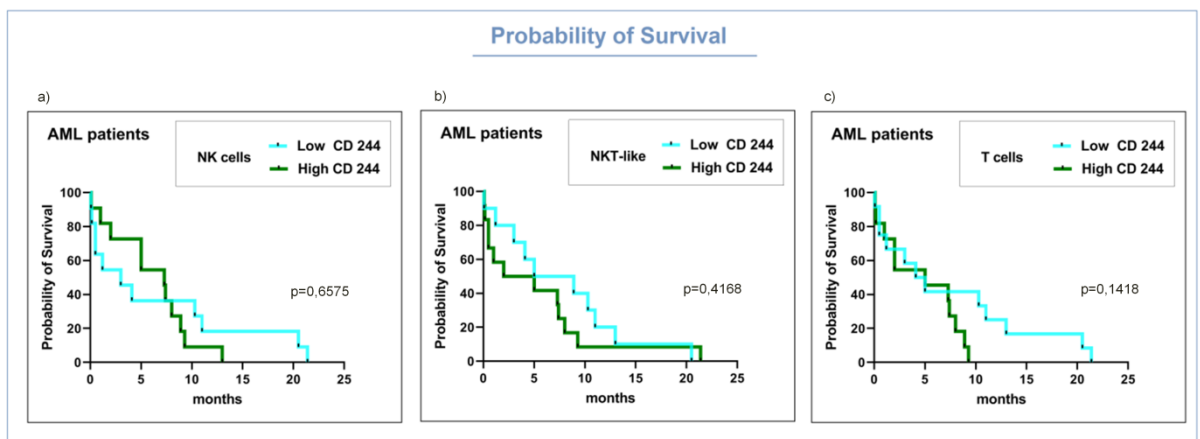


Figura 50: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de CD244 en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 24$) se estratificaron según la expresión de CD244. Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas.

g) Análisis de los receptores KIR

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre la expresión de los receptores KIR, identificados con un anticuerpo que reconoce los receptores KIR con dos dominios (KIR2D), en la superficie de las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA y los controles sanos (Fig. 51). La expresión de KIR en las células NK de los pacientes de LMA fue de $55,46 \pm 25,50\%$ y de $47,41 \pm 24,49\%$ en controles sanos. En las células NKT-like de pacientes de LMA se observó una expresión de KIR de $29,13 \pm 20,43\%$ frente a $22,65 \pm 20,45\%$ en controles sanos. En los linfocitos T de pacientes de LMA se observó una expresión de KIR de $5,84 \pm 7,70\%$ frente a $3,74 \pm 2,93\%$ en controles sanos.

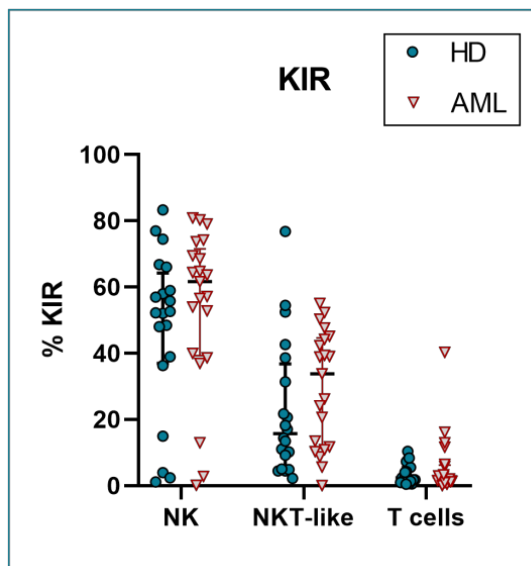


Figura 51: Análisis de la expresión de los receptores KIR. Análisis de la expresión de los receptores KIR en las células NK, NKT-like y células T en los 21 pacientes de LMA (triángulos rojos) y 20 controles sanos (círculos verdes).

Se analizó la expresión de los receptores KIR en las subpoblaciones CD8+, CD16+, CD8+CD16+, CD8-CD16- de las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA y los resultados no mostraron diferencias significativas al compararlas con la expresión de los receptores KIR en las mismas poblaciones de linfocitos de los controles sanos.

- Análisis de supervivencia: KIR

En el análisis de supervivencia, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA (Fig. 52) según la expresión de receptores KIR en la superficie de las células NK ($p=0,7723$), NKT-like ($p=0,9198$) y células T ($p=0,9579$).

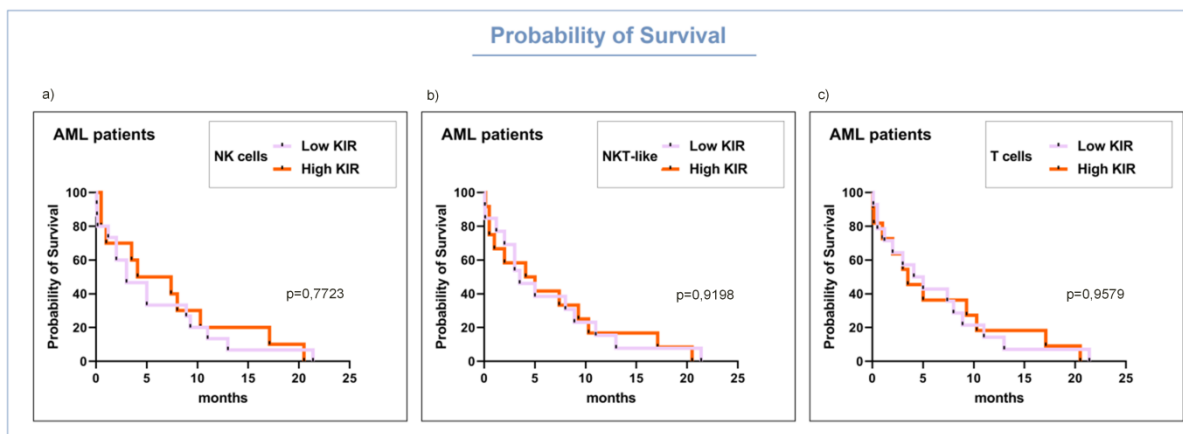


Figura 52: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de los receptores KIR en pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 27$) se estratificaron según la expresión de receptores KIR. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas malvas a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. En la figura se representan las curvas de supervivencia según el porcentaje de receptores KIR en a) células NK ($p=0,7723$), b) NKT-like ($p=0,9198$) y c) células T ($p=0,9579$).

h) Análisis de CD85j

La expresión del receptor CD85j en las células NK de los pacientes de LMA fue de $48,52 \pm 23,23\%$ y en los controles sanos de $47,32 \pm 18,72\%$ (Figura 53), no siendo las diferencias estadísticamente significativas. La expresión del receptor CD85j en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $39,43 \pm 25,59\%$ y en los controles sanos de $50,73 \pm 22,79\%$ (Fig. 53). Los resultados mostraron un descenso significativo ($p=0,024$) de la expresión de CD85j (Fig. 53) en la superficie de las células NKT-like de los pacientes de LMA. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del receptor CD85j en las células T de los pacientes de LMA ($21,95 \pm 18,84\%$) en comparación con los controles sanos ($24,15 \pm 16,07\%$).

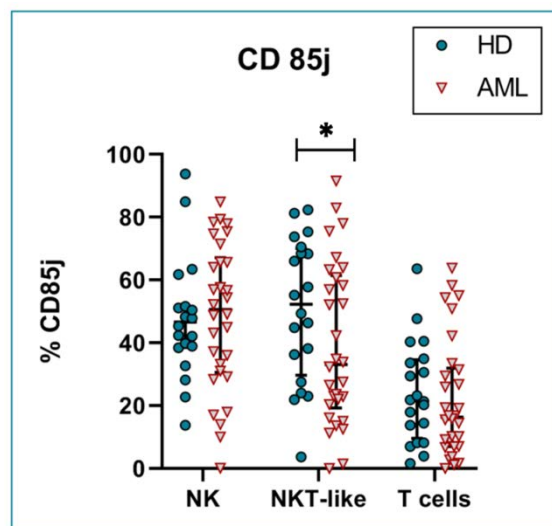


Figura 53: Análisis de la expresión de CD85j. Análisis de la expresión de CD85j en las células NK, NKT-like y células T en los pacientes de LMA (triángulos rojos, n=30) y controles sanos (círculos verdes, n=20).

En el análisis de CD85j en las subpoblaciones en función de la expresión de CD8 o CD4, los resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de CD85j en los linfocitos positivos para CD4, sin embargo, los resultados mostraron una disminución significativa de la expresión de CD85j en las células NKT-like CD8+ ($p=0,004$) y en las células T CD8+ ($p=0,045$) de los pacientes de LMA al compararlo con los controles sanos (Fig. 54).

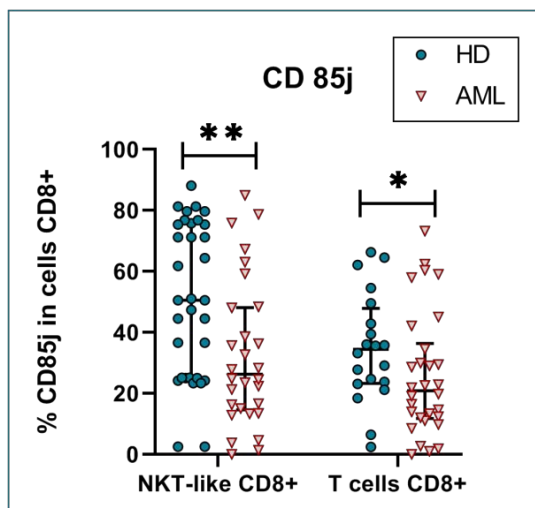


Figura 54: Análisis de la expresión de CD85j en células CD8+. Análisis de la expresión de CD85j en las células NKT-like CD8+ y células T CD8+ en los 30 pacientes de LMA (triángulos rojos) y 20 controles sanos (círculos verdes).

- Análisis de supervivencia: CD85j

En el análisis de supervivencia (Fig. 55), los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA según la expresión de CD85j en la superficie de las células NK ($p=0,8575$), NKT-like ($p=0,9478$) y células T ($p=0,8768$).

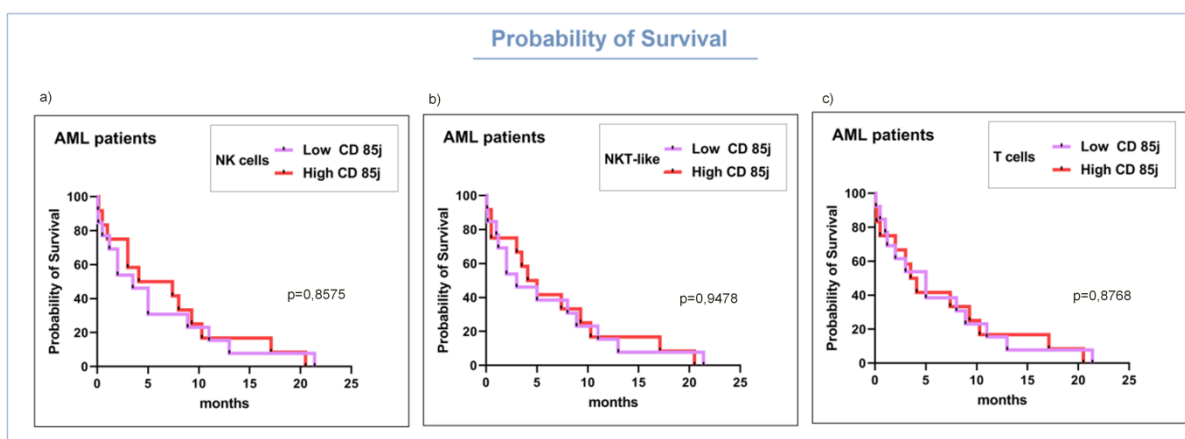


Figura 55: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de CD85j en pacientes de LMA. Los pacientes de AML ($n = 27$) se estratificaron según la expresión de CD85j. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas malvas a pacientes con bajo porcentaje de células positivas.

i) Análisis de la expresión de NKG2C y NKG2A

La expresión del receptor activador NKG2C no mostró diferencias significativas entre pacientes y controles (Fig. 56a). La expresión de NKG2C en las células NK de los pacientes de LMA fue de $36,46 \pm 21,38$ y en los controles sanos de $35,06 \pm 1,11$. La expresión de NKG2C en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $21,70 \pm 9,17\%$ y en los controles sanos de $22,42 \pm 18,68\%$. La expresión de NKG2C en las células T de los pacientes de LMA fue de $14,19 \pm 5,61\%$ y en los controles sanos de $15,26 \pm 9,21\%$.

Los resultados mostraron un aumento significativo ($p=0,040$) de la expresión del receptor inhibidor NKG2A en la superficie de las células NK de los pacientes de LMA (Fig. 56b). La expresión de NKG2A en las células NK de los pacientes de LMA fue de $46,68 \pm 23,37\%$ y en los controles sanos de $27,35 \pm 16,63\%$. La expresión de NKG2A en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $25,90 \pm 9,94\%$ y en los controles sanos de $23,38 \pm 13,86\%$. La expresión de NKG2A en las células T de los pacientes de LMA fue de $6,95 \pm 6,55\%$ y en los controles sanos de $5,30 \pm 5,35\%$.

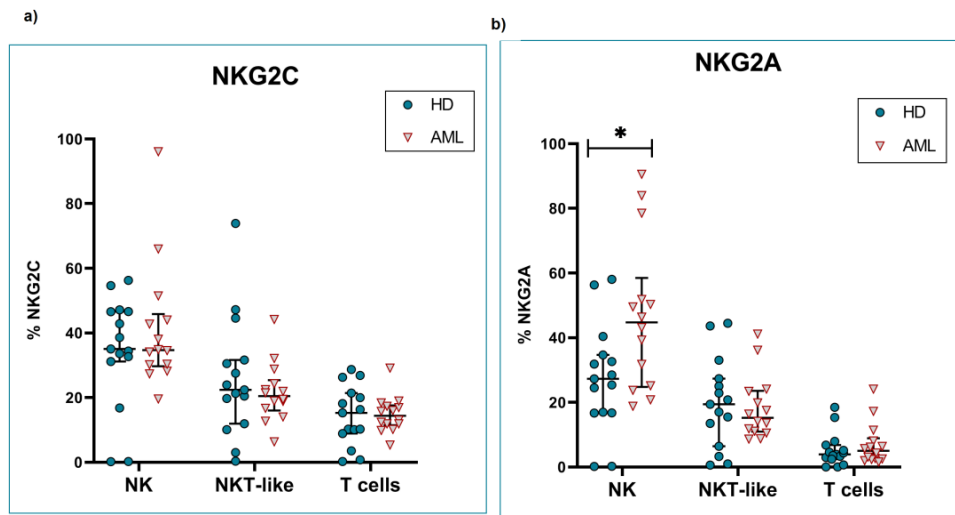


Figura 56: Análisis de la expresión de NKG2C y NKG2A. Análisis de la expresión de NKG2C (a) y NKG2A (b) en las células NK, NKT-like y células T en los pacientes de LMA (triángulos rojos, n=15) y controles sanos (círculos verdes, n=15).

- Análisis de supervivencia: NKG2C

En el análisis de supervivencia, los resultados no mostraron diferencias significativas entre los pacientes de LMA según la expresión de NKG2C (Fig. 57) en la superficie de las células NK ($p=0,0760$), NKT-like ($p=0,7514$) y células T ($p=0.0725$).

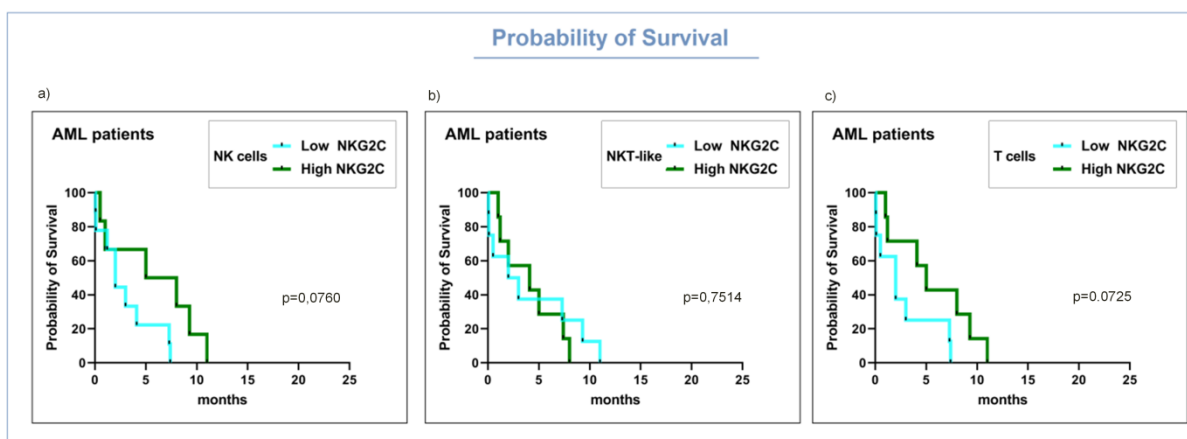


Figura 57: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de NKG2C en los pacientes de LMA. El estudio de la supervivencia global se ha realizado utilizando el método de Kaplan-Meier y el log-rank test. Los pacientes de AML ($n = 16$) se estratificaron según la expresión de NKG2C. Se utilizaron las medianas para los valores de corte. Las líneas verdes corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas azules a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. En la figura se representan las curvas de supervivencia según el porcentaje de a) células NK ($p=0,0760$), b) NKT-like ($p=0,7514$) y c) células T ($p=0.0725$).

- Análisis de supervivencia: NKG2A

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según expresión de NKG2A (Fig. 58) en la superficie de las células NK ($p=0,9190$), NKT-like ($p=0,2084$), y células T ($p=0,06372$).

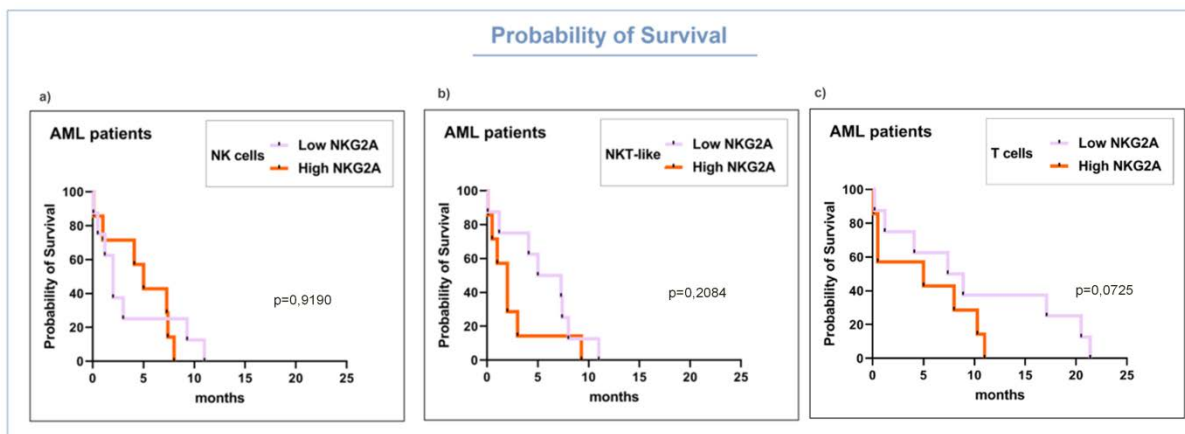


Figura 58: Análisis de Supervivencia en función de la expresión de NKG2A en los pacientes de LMA. Los pacientes de AML (n = 16) se estratificaron según la expresión de NKG2A. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas malvas a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. En la figura se representan las curvas de supervivencia según el porcentaje de NKG2A en las a) células NK (p=0,9190), b) NKT-like (p=0,2084), y c) células T (p=0,0725).

- Caracterización fenotípica de blastos de LMA: HLA-I

Analizamos la expresión de HLA-I en los blastos de LMA y los resultados mostraron una expresión del $79,39 \pm 23,71\%$ (Fig.59).

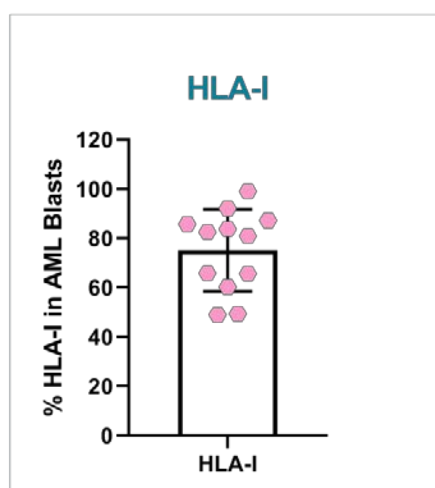


Figura 59: Análisis de HLA-I en los blastos de LMA. El porcentaje de expresión de HLA-I en los blastos de cada paciente de LMA se representa en la figura por las estrellas (n=24). La línea superior de la caja indica la media de expresión de HLA-I y los bigotes muestran la desviación estándar y los extremos los máximos y mínimos.

En el análisis de correlaciones, según se muestra en la tabla XIII los resultados no mostraron relación significativa entre la expresión de HLA-I en los blastos de LMA y la expresión de los receptores KIR, CD85j ni NKG2C en la superficie de las células NK, NKT-like ni células T. Sin embargo, los resultados mostraron, tal como se representa en la figura 60, una correlación inversa significativa entre la expresión de HLA-I en la superficie de los blastos de LMA y la expresión de NKG2A en las células NKT-like ($p=0,020$) y las células T ($p=0,045$).

Tabla XIII: Receptores de HLA-I; correlaciones con su ligando

HLA-I AML blasts		KIR	CD85j	NKG2C	NKG2A
NK cells	correlation coefficient	-,050	-,264	-,531	,105
	Sig. (bilateral)	,799	,174	,075	,746
NKT-like	correlation coefficient	,063	-,287	-,056	-,657
	Sig. (bilateral)	,748	,139	,863	,020
T cells	correlation coefficient	-,232	-,316	-,203	-,587
	Sig. (bilateral)	,236	,102	,527	,045

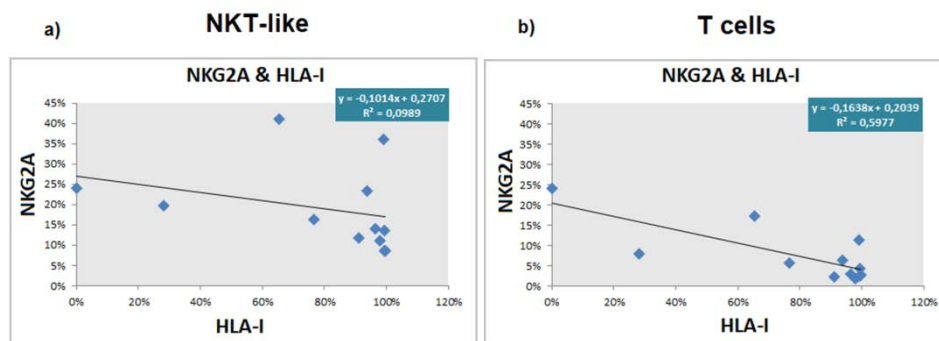


Figura 60: Análisis de Correlación entre la expresión de NKG2A en los linfocitos y la expresión de HLA-I en los blastos. a) correlación inversa entre la expresión de NKG2A en la superficie de las células NKT-like y la expresión de HLA-I en la superficie de los blastos de LMA. b) correlación inversa entre la expresión de NKG2A en la superficie de las células T y la expresión de HLA-I en la superficie de los blastos de LMA.

j) Receptores de Nectinas: DNAM-1, TIGIT y TACTILE

Analizamos la expresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en la superficie de las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA y controles sanos.

En las células NK de los pacientes de LMA (Fig. 61) la expresión de DNAM-1 fue de $77,16 \pm 20,20\%$ y en los donantes sanos de $93,87 \pm 5,75\%$. El descenso en el porcentaje de células NK DNAM-1+ observado en los pacientes de LMA fue estadísticamente significativo ($p=0,000$). Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la expresión de TIGIT y TACTILE en las células NK de los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos. La expresión de TIGIT en los pacientes de LMA fue $65,16 \pm 22,06\%$ y en los donantes sanos de $54,22 \pm 23,82\%$. La expresión de TACTILE en los pacientes de LMA fue de un $53,70 \pm 22,02\%$ y en los donantes sanos de $44,40 \pm 26,48\%$.

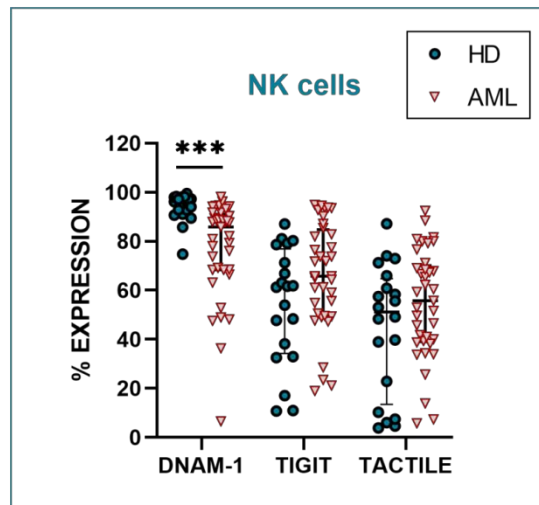


Figura 61. Expresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NK. Se analizó el porcentaje de células NK que expresaban los receptores DNAM-1, TIGIT, TACTILE en los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos) (n=36) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20)

En las células NKT-like (Fig. 62) la expresión de DNAM-1 en los pacientes de LMA fue inferior ($62,13 \pm 22,03\%$) a la observada en los donantes sanos ($79,13 \pm 13,13\%$), siendo la diferencia significativa ($p=0,020$).

La expresión de TIGIT en los pacientes de LMA fue $49,11 \pm 22,50\%$ y en los donantes sanos de $41,37 \pm 18,53$. La expresión de TACTILE en los pacientes de LMA fue de un $60,55 \pm 23,81\%$ y en los donantes sanos de $46,10 \pm 23,32\%$. No se encontraron diferencias en la expresión de TIGIT y TACTILE entre los pacientes de LMA y los donantes sanos.

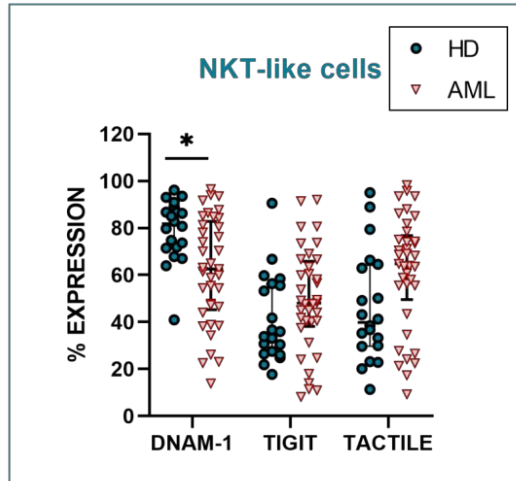


Figura 62: Análisis de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NKT-like. Se analizó el porcentaje de células NK que expresaban los receptores DNAM-1, TIGIT, TACTILE en los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos) (n=36) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20).

En las células T (Fig. 63) se observó un descenso significativo ($p=0,000$) en el porcentaje de expresión de DNAM-1 en los pacientes de LMA ($56,69 \pm 15,46\%$) en comparación con los donantes sanos ($71,30 \pm 10,09\%$). Los pacientes de LMA mostraron además un aumento significativo de la expresión de TIGIT en la superficie de las células T ($p=0,023$). La expresión de TIGIT en los pacientes de LMA fue $34,63 \pm 15,37\%$ y en los donantes sanos de $25,72 \pm 9,01\%$. La expresión de TACTILE en los pacientes de LMA fue de un $55,85 \pm 19,80\%$ y en los donantes sanos de $50,04 \pm 18,40\%$.

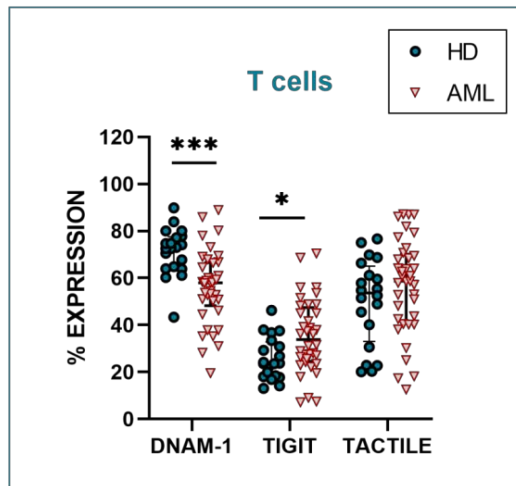


Figura 63: Análisis de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células T. Se analizó el porcentaje de células NK que expresaban los receptores DNAM-1, TIGIT, TACTILE en los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos) (n=36) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20).

- Análisis de correlación: DNAM-1, TIGIT y TACTILE

Se analizó la relación estadística entre la expresión del receptor DNAM-1 en las células NK, NKT-like y T y la expresión de los receptores TIGIT y TACTILE observando una correlación inversa entre la expresión de DNAM-1 en los pacientes de LMA con la expresión de TACTILE en las células NK; $p=0,012$ (Fig. 64a), y con la expresión de TIGIT en las células NKT-like; $p=0,002$ (Fig. 64b). Esta correlación no se observó en los controles sanos.

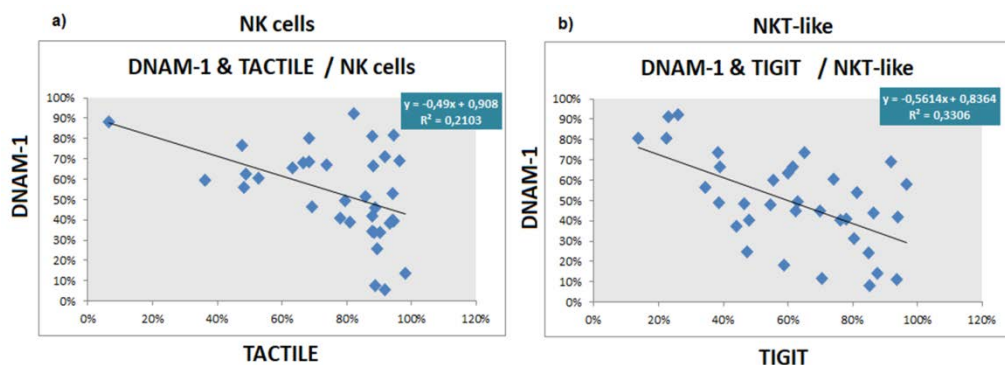


Figura 64: Análisis de correlación entre DNAM-1, TIGIT y TACTILE. a) Correlación inversa entre la expresión de DNAM-1 y TACTILE en las células NK de los pacientes de LMA ($p=0,012$). b) Correlación inversa entre la expresión de DNAM-1 y TIGIT en las células NKT-like de los pacientes de LMA ($p=0,002$) (n=36).

- Análisis de coexpresión: DNAM-1, TIGIT y TACTILE

Analizamos la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NK, NKT-like y células T de los pacientes de LMA y de los controles sanos (Fig. 65).

El análisis de células NK (Fig. 65a) no mostró diferencias estadísticamente significativas en el patrón de coexpresión de los receptores al comparar los pacientes de LMA con los controles sanos. Sin embargo, el perfil de coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células T de los pacientes de LMA fue significativamente diferente al perfil observado en donantes sanos ($p = 0,002$) (Fig. 65b) y no se observaron diferencias en el patrón de coexpresión de las células NKT-like (Fig. 65c) entre pacientes y controles sanos.

Al analizar cada combinación de forma independiente, las células NK (Fig. 64a) de los pacientes de LMA mostraron un porcentaje significativamente mayor de las subpoblaciones DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ ($p= 0.02$), DNAM-1-TIGIT+TACTILE- ($p= 0.001$), DNAM-1-TIGIT-TACTILE+ ($p= 0.003$) y DNAM-1-TIGIT-TACTILE- ($p= 0.001$) en comparación con los controles sanos.

El análisis de las subpoblaciones en las células T (Fig. 64b) de los pacientes de LMA mostró una disminución significativa en el porcentaje de células DNAM-1+TIGIT-TACTILE+ T ($p= 0.001$) y un aumento en el porcentaje de células DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ ($p= 0.004$), DNAM-1-TIGIT+TACTILE- ($p= 0.02$) y DNAM-1-TIGIT-TACTILE- ($p= 0.02$).

En las células NKT-like (Fig. 65c) la única diferencia significativa observada fue un aumento en el porcentaje de DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ en pacientes de AML ($p= 0.002$).

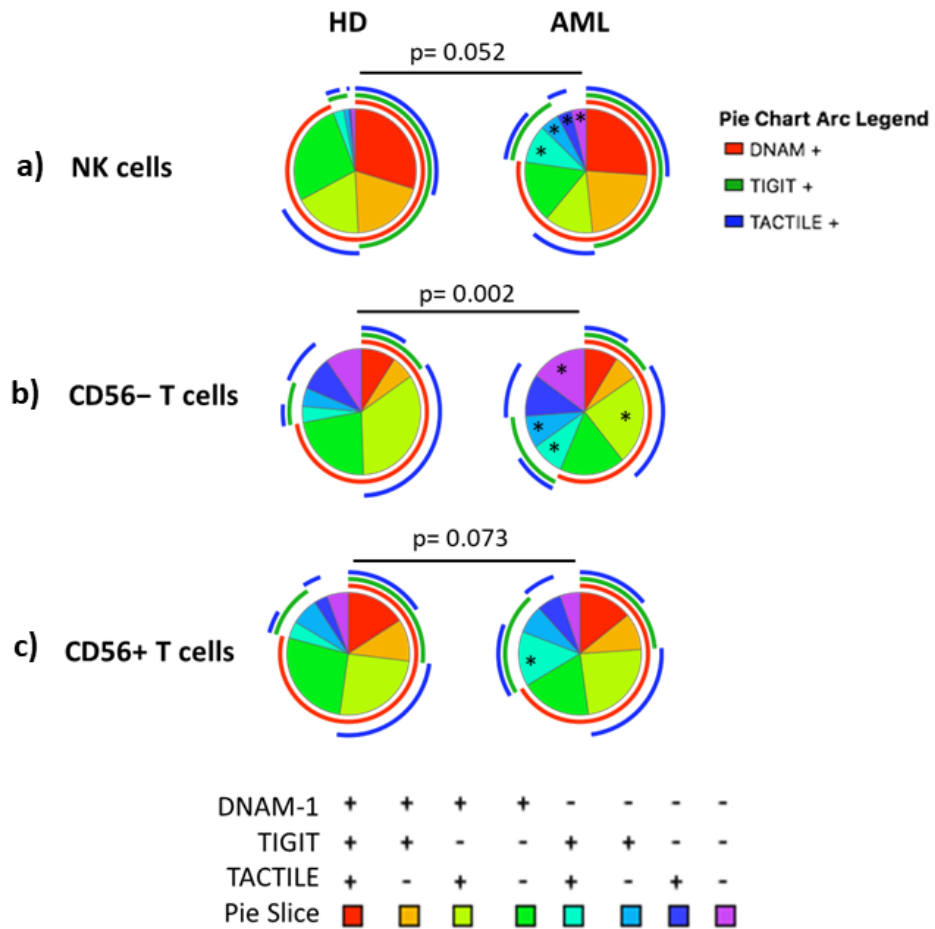


Figura 65: Análisis de la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en células NK, células T y células NKT-like. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores indicada en la parte inferior de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AML y donantes sanos para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$). HD: donantes sanos ($n=20$), AML: pacientes con leucemia mieloide aguda ($n=30$).

El estudio de la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las subpoblaciones de células NKT-like y células T CD4+CD8-, CD4-CD8+ y CD4-CD8-, no mostró diferencias significativas entre los pacientes de LMA y los controles sanos en las células NKT-like CD4+. Sin embargo, en las células T CD4+ de los pacientes de LMA se observó un mayor porcentaje de células DNAM-1-TIGIT+ TACTILE- ($p=0,002$), DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ ($p=0,036$) y DNAM-1-TIGIT-TACTILE- ($p=0,002$) que en las células T CD4+ de los controles sanos (Fig. 66).

En la subpoblación de células NKT-like CD8+, las células DNAM-1+TIGIT-TACTILE- se redujeron significativamente en pacientes con LMA en comparación con los donantes sanos ($p=0,047$), mientras que las células DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ ($p=0,01$) y las células DNAM-1-TIGIT-TACTILE+ ($p=0,003$) se incrementaron. En la subpoblación de células T CD8+, las células DNAM-1+TIGIT-TACTILE- se redujeron en los pacientes de LMA ($p=0,023$), mientras que el porcentaje de células DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ y DNAM-1-TIGIT+TACTILE- se incrementaron ($p=0,014$ y $p=0,01$, respectivamente).

Por último, analizamos la coexpresión en las células NKT-like y T CD4-CD8- (Fig.66). Los resultados mostraron un aumento significativo de la coexpresión de los tres receptores (DNAM-1+TIGIT+TACTILE+) en la superficie de las células NKT-like de los pacientes de LMA ($p=0,034$). En las células T CD4-CD8- se observó en pacientes de AML un aumento de las células DNAM-1+TIGIT+TACTILE+ ($p=0,031$) y DNAM-1-TIGIT+TACTILE- ($p=0,016$) y una disminución de células DNAM-1-TIGIT-TACTILE+ ($p=0,004$) en comparación con donantes sanos.

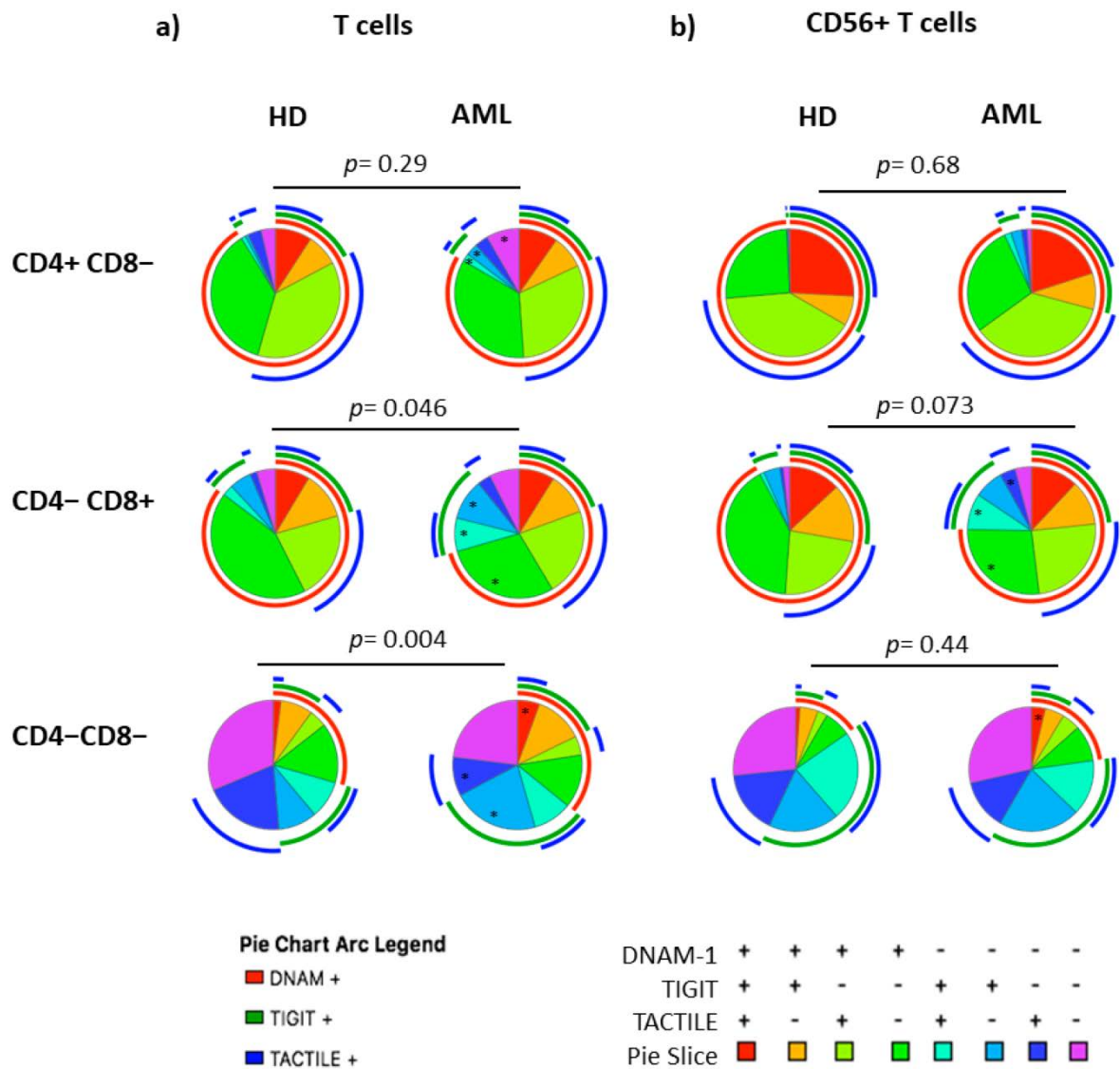


Figura 66: Coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las subpoblaciones de células T y NKT-like definidas en función de la expresión de CD4 y CD8. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de receptores indicada en la parte inferior de la figura. El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AML y donantes sanos para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$). HD: donantes sanos, AML: pacientes con leucemia mieloide aguda (n=23).

- Caracterización fenotípica de blastos: CD155 y CD112

Analizamos la coexpresión de dos de los ligandos compartidos por los receptores DNAM-1, TIGIT y TACTILE en la superficie de los blastos de LMA (Fig. 67). El porcentaje medio de blastos con expresión solo de CD155 fue de $10,09 \pm 11,14\%$, los blastos con coexpresión de CD155 y CD112 representaron el $8,74 \pm 14,21\%$ y la expresión solo de CD112+ fue de $22,90 \pm 19,58\%$. El porcentaje de blastos que no expresaron ninguno de estos ligandos fue de $58,27 \pm 28,26$

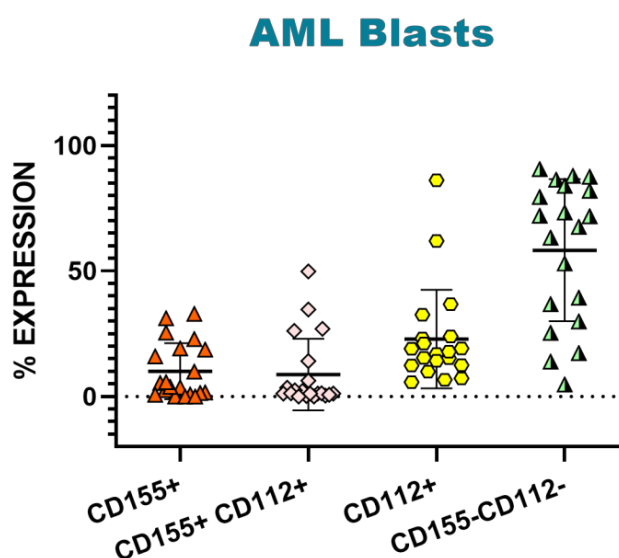


Figura 67: Análisis de coexpresión de CD155 y CD112 en los blastos de LMA. Se analizó el porcentaje de expresión en los blastos de CD155 y/o CD112 en los pacientes de LMA (n=20). Se muestran las cuatro combinaciones posibles. La línea central representa la media del porcentaje de blastos positivos para el ligando indicado y los bigotes la desviación estándar.

A continuación, se analizó la relación entre la expresión CD112 en los blastos de LMA y los receptores de nectina y los resultados no mostraron una correlación significativa en las células NK con la expresión de DNAM-1 ($p=0,965$; $r=-0,011$), TIGIT ($p=0,193$; $r=0,304$) y TACTILE ($p=0,156$; $r=0,329$), tampoco mostró una relación significativa con la expresión en la superficie de las células NKT-like de DNAM-1 ($p=0,346$; $r=-0,223$), TIGIT ($p=0,277$; $r=0,256$) y TACTILE ($p=0,082$; $r=0,398$) y por último tampoco mostró una relación significativa con la expresión en la superficie de las células T de DNAM-1 ($p=0,395$; $r=-0,207$), TIGIT ($p=0,235$; $r=0,286$) y TACTILE ($p=0,215$; $r=0,298$).

Tal como se observa en la figura 46 Los resultados mostraron que la expresión de CD155 en los blastos de LMA se relacionó de manera inversa con la expresión en las células NK de los pacientes de LMA de DNAM-1 ($p=0,009$) (Fig. 68a) y de manera positiva con la expresión de TIGIT ($p=0,039$) (Fig. 68b) y TACTILE ($p=0,049$) (Fig. 68c). También se relacionó de manera inversa con la expresión de DNAM-1 en las células NKT-like ($p=0,006$) (Fig. 68d) y en las células T ($p=0,019$) (Fig. 68e).

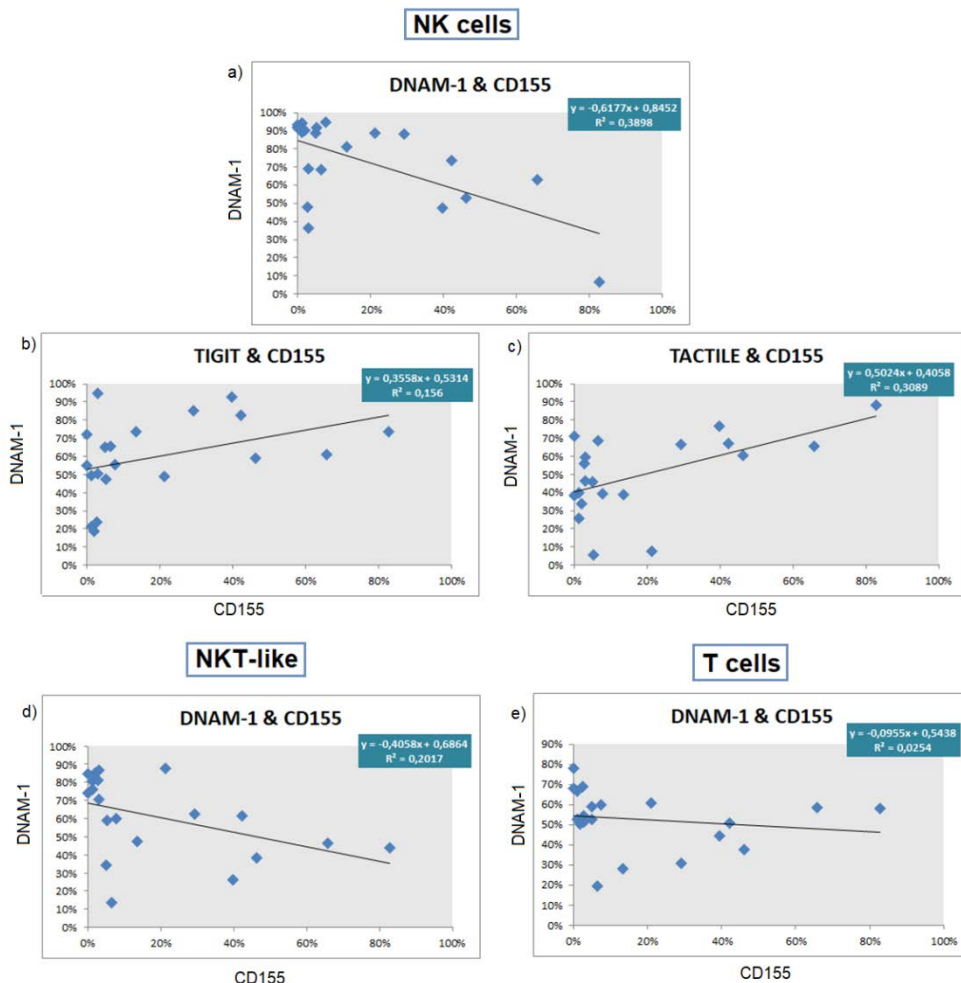


Figura 68: Análisis de correlación entre la expresión de CD155 en los blastos de LMA y sus receptores. Correlación entre la expresión de DNAM-1 (a), TIGIT (b) y TACTILE (c) en las células NK de los pacientes de LMA y la expresión de CD155 en los blastos de LMA. Correlación entre la expresión de DNAM-1 en las células NKT-like (d) y células T (e) y la expresión de CD155 en los blastos de LMA ($n=20$).

- Análisis de supervivencia: DNAM-1, TIGIT y TACTILE

Analizamos el efecto de la expresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE sobre la supervivencia de los pacientes con LMA (Fig. 69). No se observaron diferencias significativas cuando se analizó cada receptor por separado en células NK o células T.

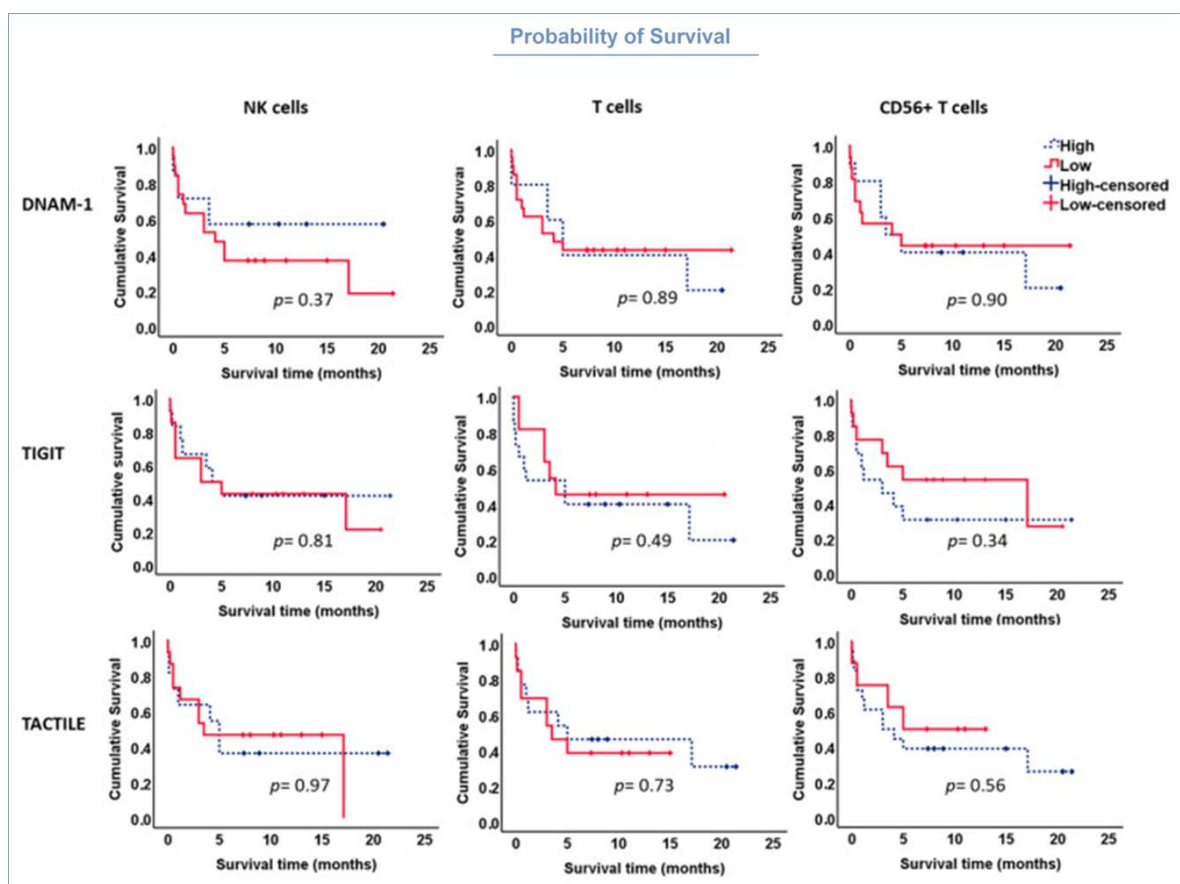


Figura 69: Análisis de supervivencia en función de la expresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA. Los pacientes con AML (n = 26) se estratificaron según la expresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en células NK, células T CD56- y células T CD56 +. Las líneas de puntos azules corresponden a pacientes con alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado y las líneas rojas a pacientes con bajo porcentaje de células positivas. Los pacientes censurados se indican con marcas de verificación.

En el análisis de la expresión combinada de estos marcadores mostró que los pacientes con porcentajes más bajos de células T DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ tenían una supervivencia significativamente mayor que los pacientes con porcentajes más altos de células T con este fenotipo ($p=0.031$, Fig. 70a). De manera similar, hubo una tendencia a una supervivencia más larga en aquellos pacientes con porcentajes más bajos de células NK que coexpresan TIGIT y TACTILE en ausencia de DNAM-1 ($p = 0.052$, Fig. 70b). No se observaron diferencias significativas cuando se analizaron las otras combinaciones de receptores.

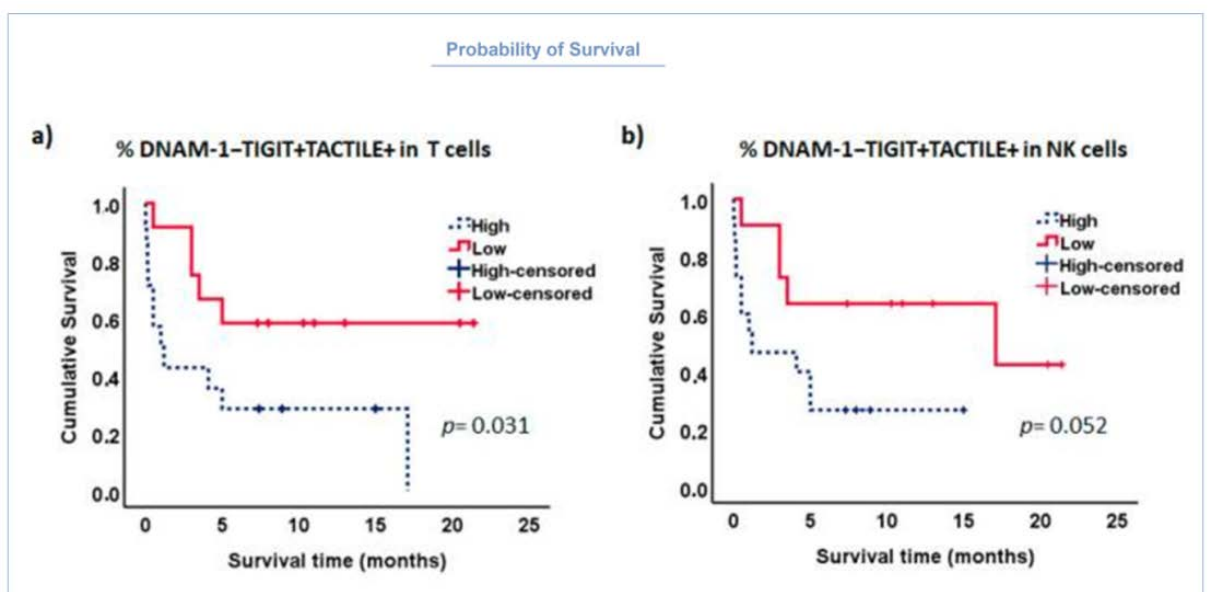


Figura 70. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier en pacientes de LMA. Los pacientes con LMA ($n = 26$) se estratificaron según la coexpresión de TIGIT y TACTILE en linfocitos T CD56– negativos para DNAM-1 (a) y linfocitos NK negativos para DNAM-1 (b). Las líneas de puntos azules corresponden a pacientes con alto porcentaje de células DNAM-1 – TIGIT + TACTILE + y las líneas rojas a pacientes con bajo porcentaje de células DNAM-1 – TIGIT + TACTILE +. Los pacientes censurados se indican con marcas de verificación.

K) Análisis de la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1

Analizamos la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NK, NKT-like y células T de los pacientes de LMA y de los controles sanos.

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre la expresión de estos receptores en las células NK de los pacientes de LMA y de controles sanos (Fig. 71). La expresión de LAG3 en las células NK de los pacientes de LMA fue de $53,07 \pm 20,78\%$ y en los controles sanos de $57,35 \pm 12,31\%$. La expresión de TIM3 en los pacientes de LMA fue $81,59 \pm 11,48\%$ y en los controles sanos de $87,33 \pm 7,29\%$. La expresión de PD-1 en los pacientes de LMA fue de un $12,83 \pm 19,41\%$ y en los controles sanos de $4,58 \pm 7,43$.

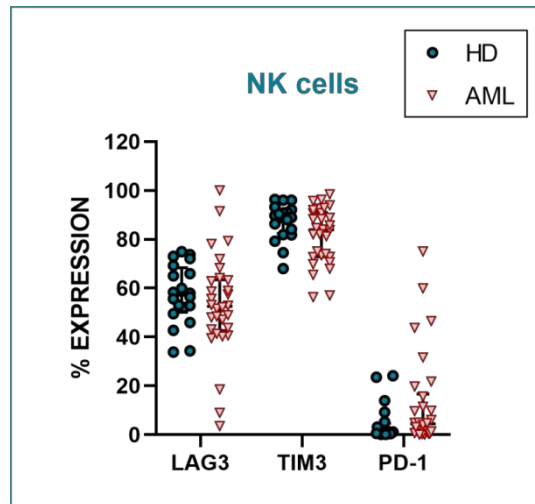


Figura 71: Análisis de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NK. Se analizó el porcentaje de células NK que expresaban los receptores LAG3, TIM3 y PD-1 en los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos) (n=30) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20).

Los resultados no mostraron diferencias significativas entre la expresión de estos receptores en las células NKT-like de los pacientes de LMA y de controles sanos (Fig. 72). La expresión de LAG3 en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue de $45,97 \pm 19,54\%$ y en los controles sanos de $54,90 \pm 15,18\%$. La expresión de TIM3 en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue $52,29 \pm 16,12\%$ y en los controles sanos $59,31 \pm 8,39\%$. La expresión de PD-1 en las células NKT-like de los pacientes de LMA fue del $13,8 \pm 19,48\%$ y en los controles sanos de $10,05 \pm 24,52\%$.

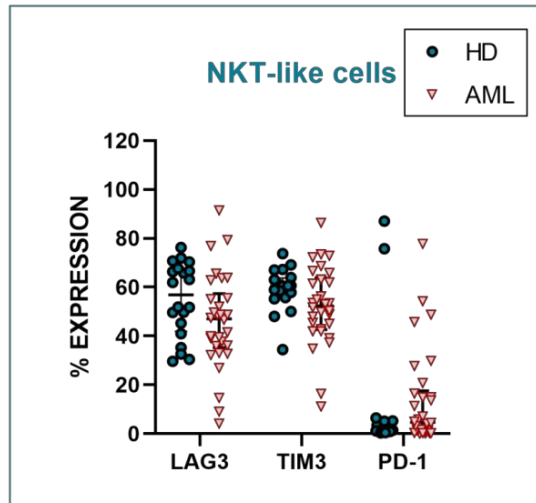


Figura 72: Análisis de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NKT-like de los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos) (n=30) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20).

El análisis de la expresión de estos receptores en las células T de los pacientes de LMA y de controles sanos se muestra en la Figura 73. La expresión de LAG3 en las células T de los pacientes de LMA fue $50,88 \pm 14,65\%$ y en los controles sanos de $56,57 \pm 7,30\%$, no siendo las diferencias estadísticamente significativas. Los resultados mostraron una disminución significativa ($p=0,047$) en la expresión de TIM3 en la superficie de las células T de los pacientes de LMA ($45,43 \pm 16,92\%$) en comparación con los controles sanos ($52,70 \pm 14,81\%$). No se observaron diferencias significativas en la expresión de PD-1 que se encontró expresado en el $8,9 \pm 12,27\%$ de las células T de los pacientes de LMA y en el $4,39 \pm 7\%$ en los donantes sanos.

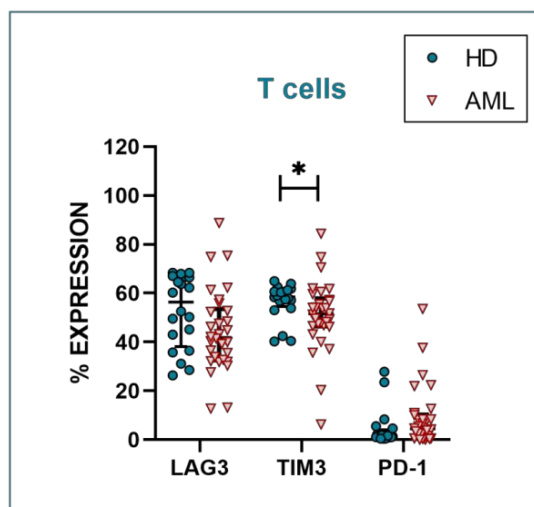


Figura 73: Análisis de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células T de los pacientes de LMA (AML: triángulos rojos; n=30) y controles sanos (HD: círculos verdes; n=20).

- Análisis de coexpresiones: PD-1/ TIM3/ LAG3

Analizamos la coexpresión de los receptores PD-1, TIM3 y LAG3 en las células NK, NKT-like y células T de los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos (Fig. 74). Los resultados mostraron en las células NK de los pacientes de LMA un aumento significativo ($p=0,041$) del porcentaje de células que coexpresaban PD-1 y TIM3. En las células NKT-like los resultados mostraron una disminución significativa del porcentaje de células que coexpresaban LAG3 y TIM3 ($p=0,036$). En las células T de los pacientes de LMA se observó un aumento de las células con expresión de PD-1 y ausencia de TIM3 y LAG3 ($p=0,031$) y de las células con coexpresión de PD-1 y TIM3 ($p=0,031$) y un descenso de células LAG3+TIM3-PD-1- ($p=0,046$) y de las células T con coexpresión de LAG3 y TIM3 ($p=0,027$).

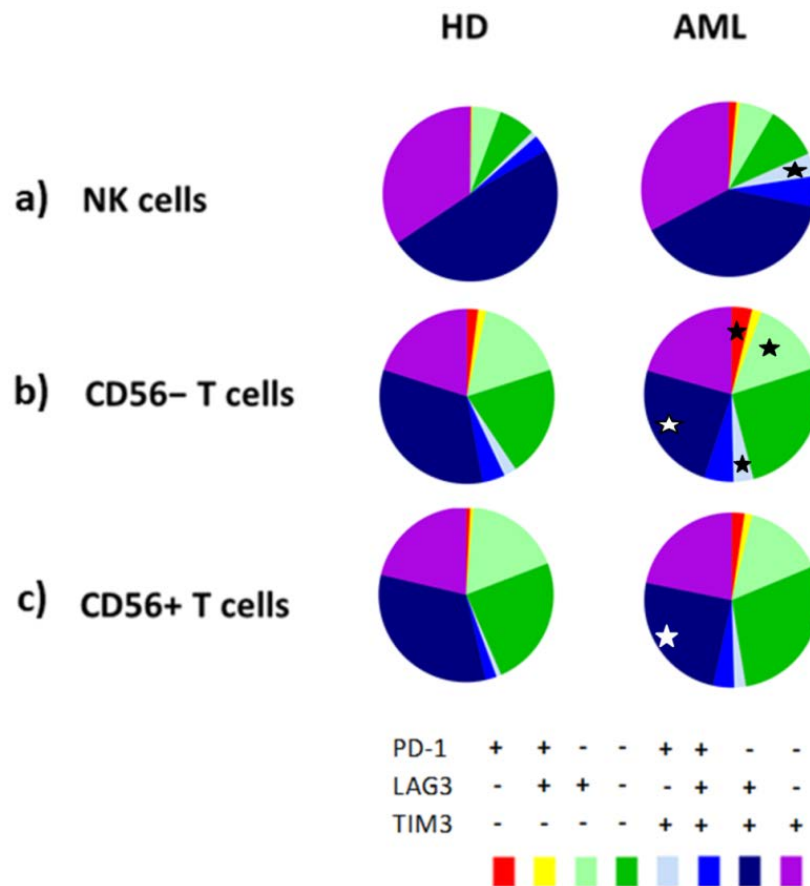


Figura 74: Análisis de la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3. Cada color en el gráfico circular corresponde a una combinación determinada de los tres receptores como se indica en la parte inferior de la figura. HD: donantes sanos (n=20); AML: pacientes con leucemia mieloide aguda (n=30). El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AML y donantes sanos para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

Se analizaron también las subpoblaciones CD4+CD8-, CD4-CD8+ y CD4-CD8- de las células T y NKT-like en los pacientes de LMA y en los controles sanos (Fig. 75). En los pacientes de LMA se observó una disminución del porcentaje de células TCD4+ LAG3+TIM3-PD-1- ($p=0,046$) y de células T CD8+ LAG3+TIM3-PD-1- ($p=0,015$). Por último, los resultados mostraron en los pacientes de LMA una disminución de células LAG3+TIM3+ en la población NKT-like CD8-CD4- ($p=0,049$) y T CD8-CD4- ($p=0,034$). Además, en la población de células T CD8-CD4- de los pacientes de LMA disminuían significativamente las células LAG3+PD-1-TIM3- ($p=0,007$) al compararlos con los controles sanos (Fig. 75).

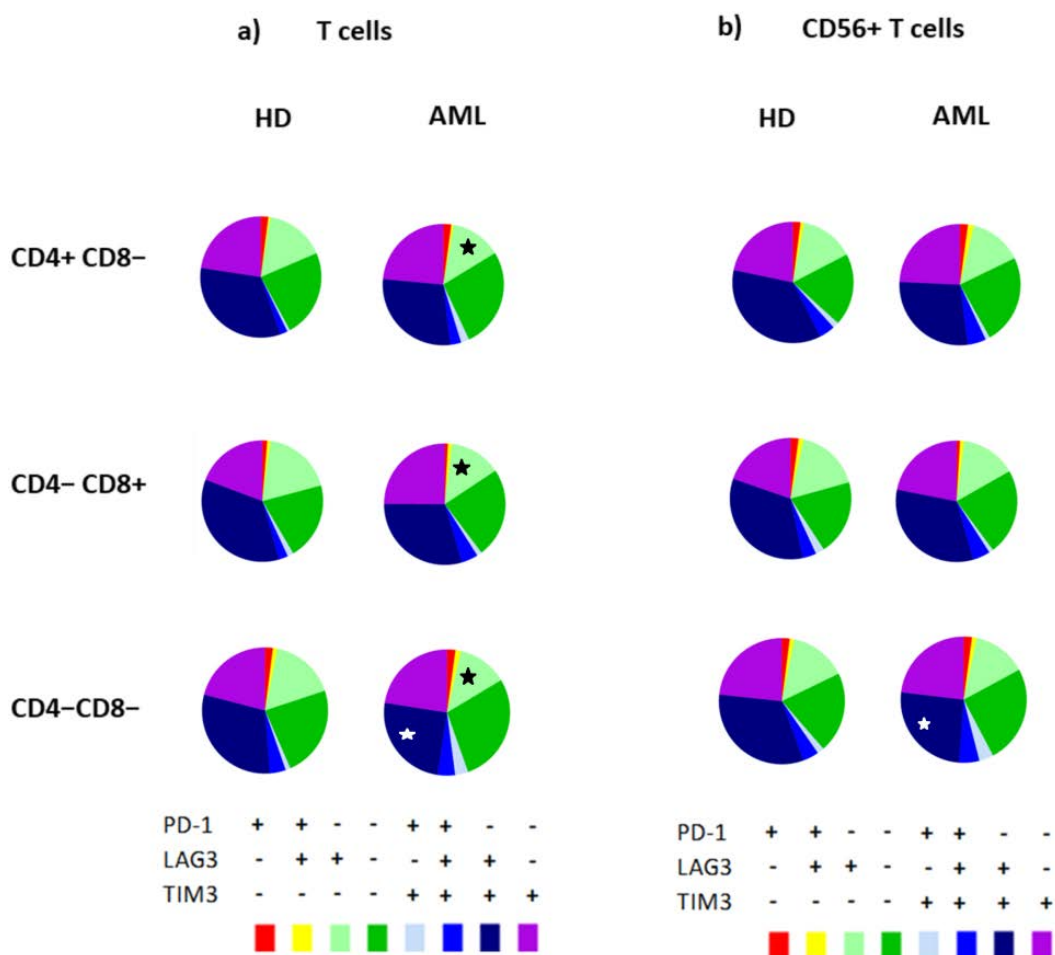


Figura 75: Coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD4-CD8-. Cada color en el pastel (gráficos circulares) corresponde a una combinación específica de antígenos indicada en la parte inferior de la figura para HD: donantes sanos (n=20) y AML: pacientes con leucemia mieloide aguda (n=25) en las células T (a) y NKT-like (b). El asterisco (*) dentro de los segmentos se refiere a diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con AML y donantes sanos para los subconjuntos indicados ($p < 0.05$).

- Caracterización fenotípica de los blastos de LMA: PD-1Ls

El estudio de los ligandos de PD-1, en los blastos mostró que CD273 estaba expresado en un porcentaje próximo al 40% mientras que la expresión de CD274 fue prácticamente nula. Se analizó la coexpresión de los ligandos de PD-1 en los blastos de LMA (Fig. 76). El porcentaje de blastos que expresaba únicamente el ligando de PD-1, CD273 fue del $37,23 \pm 21,83\%$ mientras que el porcentaje de expresión de CD274 fue del $1,66 \pm 1,16\%$. El $0,45 \pm 0,48$ de los blastos coexpresaban ambos ligandos.

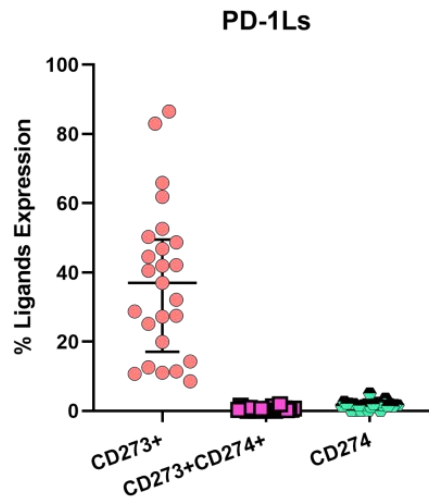


Figura 76: Análisis de coexpresión de los ligandos de PD-1. En la gráfica se representa la expresión de CD273 (círculos rosas), CD274 (círculos verdes) y la coexpresión de ambos ligandos (cuadrados rosas) en la superficie de los blastos de los pacientes de LMA (n=25). La línea central representa la media del porcentaje de blastos positivos para el ligando indicado y los bigotes la desviación estándar.

El estudio de la relación entre la expresión de CD273 en los blastos de LMA y la expresión de su receptor PD-1 en la superficie de las células NK, NKT-like y las células T mostró una correlación positiva significativa ($p=0,018$) entre la expresión de CD273 en los blastos de LMA y PD-1 en las células NKT-like tal como aparece reflejado en la figura 77.

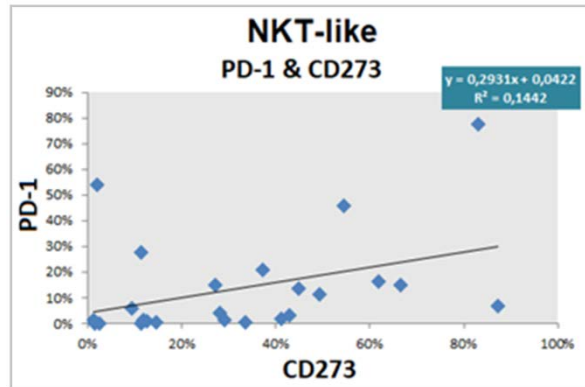


Figura 77: Análisis de correlación entre el porcentaje de células NKT-like PD-1+ y blastos de AML CD273+ (n=25).

Los resultados mostraron una correlación positiva significativa entre la expresión de CD166 en los blastos de LMA y la expresión de PD-1 en la superficie de las células T ($p=0,027$; $r=0,450$) y la coexpresión de PD-1/TIM3 ($p=0,041$; $r=0,419$) en la superficie de las células NK.

Los resultados mostraron una correlación significativa positiva entre la expresión del ligando CD122 en los blastos de LMA y la coexpresión de PD-1 / TIM3 en la superficie de las células NK ($p=0,043$; $r=0,457$), células T ($p=0,008$; $r=0,574$) y células NKT-like ($p=0,012$; $r=0,551$) de los pacientes de LMA. Y con la expresión de PD-1 en las células NKT-like ($p=0,019$; $r=0,520$).

- Caracterización fenotípica de blastos: L-SECTIN y CEACAM1

Analizamos la expresión de L-SECTIN y CEACAM-1, ligandos respectivos de LAG3 y TIM3 en la superficie de los blastos de LMA y los resultados mostraron una expresión de L-SECTIN de $76,48 \pm 35,36$ (Fig. 78a) y una expresión de CEACAM-1 de $46,34 \pm 34,54$ (Fig. 78b).

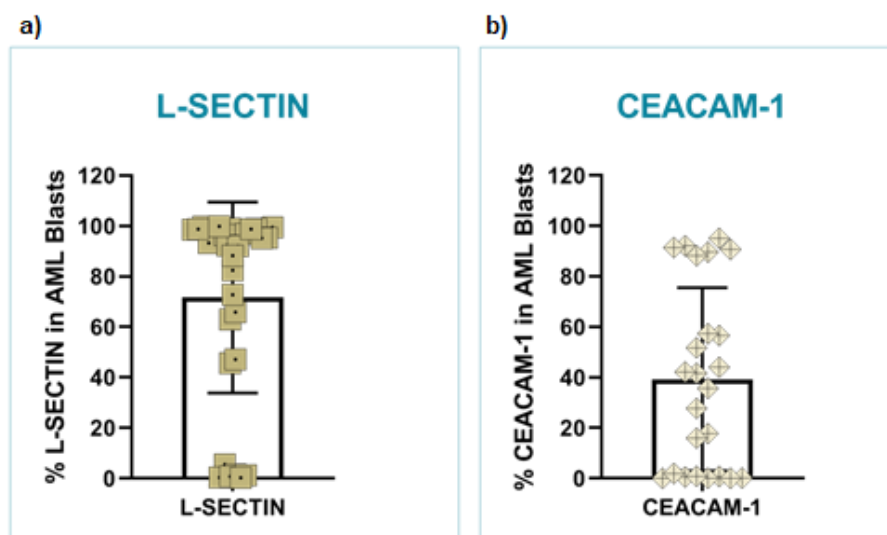


Figura 78: Análisis de los ligandos L-SECTIN y CEACAM-1 en los blastos de LMA.

La línea central representa la media del porcentaje de blastos positivos para el ligando indicado y los bigotes la desviación estándar de la expresión en la superficie de los blastos de los pacientes de LMA de L-SECTIN (n=30) y CEACAM-1 (n=26).

La expresión de L-SECTIN en la superficie de los blastos de LMA no se correlacionaba de manera significativa con la expresión de LAG3 en la superficie de las células NK ($p=0,079$; $r=-0,351$), ni en las células NKT-like ($p=0,988$; $r=-0,003$), ni en las células T ($p=0,6$; $r=-0,106$).

La expresión de CEACAM-1 en la superficie de los blastos de LMA no se correlacionaba de manera significativa con la expresión de TIM3 en la superficie de las células NK ($p=0,153$; $r=-0,295$), ni en las células NKT-like ($p=0,677$; $r=0,088$), ni en las células T ($p=0,924$; $r=0,020$).

- Análisis de Supervivencia: PD-1, TIM3 y LAG3

Analizamos la supervivencia de los pacientes de LMA (Fig. 79), no observando diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según la expresión de PD-1 en la superficie de las células NK ($p=0,3913$), NKT-like ($p=0,0582$) y células T ($p=0,0612$).

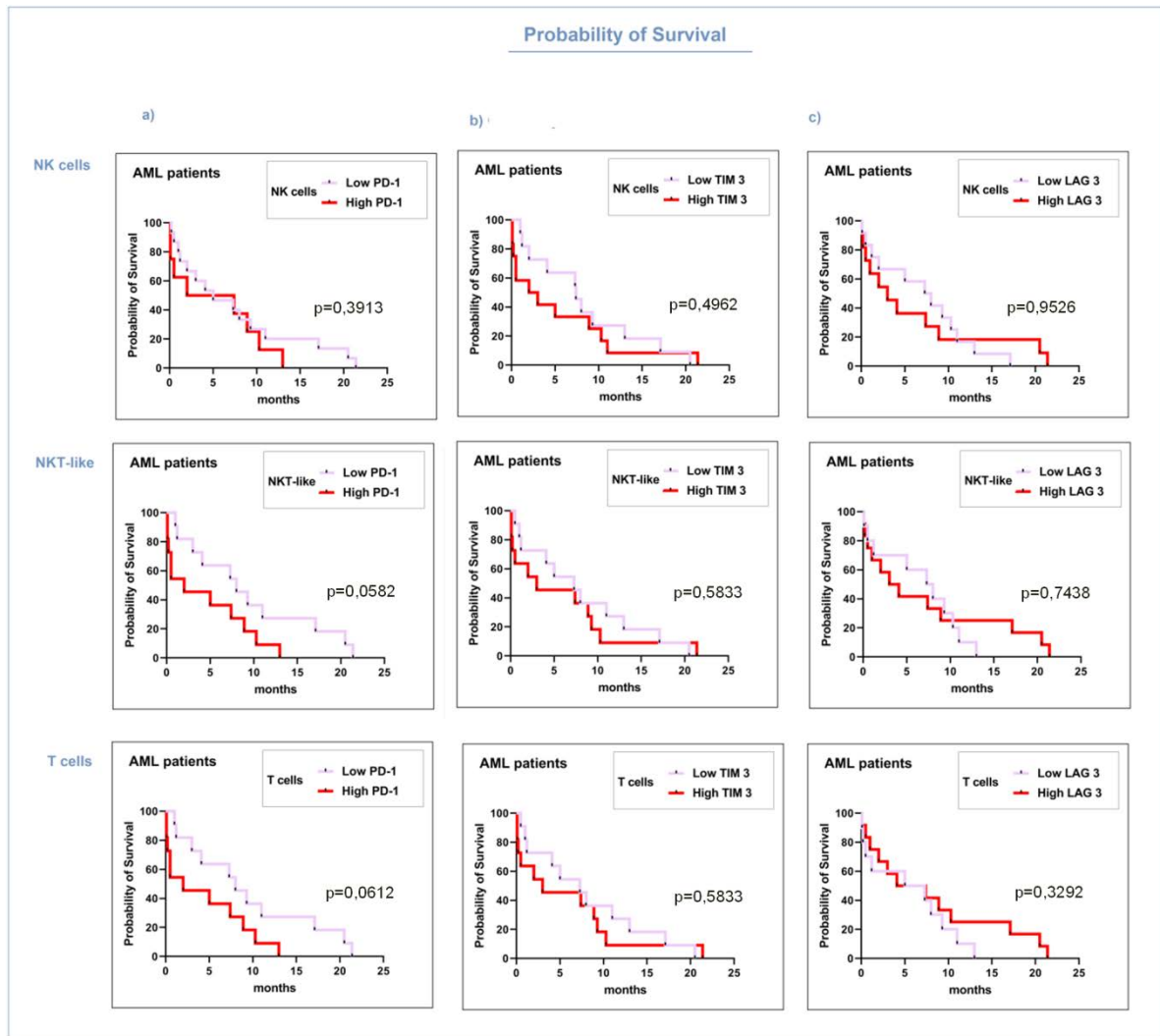


Figura 79: Análisis de supervivencia en función de la expresión de PD-1, TIM3 y LAG3 en pacientes de LMA. Los pacientes de LMA ($n = 25$) se estratificaron según tuvieran un alto porcentaje de células positivas para el receptor indicado (líneas rojas) y pacientes con bajo porcentaje de células positivas (líneas malvas). La figura muestra las curvas de supervivencia en los pacientes de LMA con mayor y menor expresión de PD-1 (columna a), TIM3 (columna b) y LAG3 (columna c), en las células NK, NKT-like y T ($n=25$).

En el análisis de supervivencia, los resultados no mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según expresión de TIM3 en la superficie de las células NK ($p=0,4962$), NKT-like ($p=0,5833$) y células T ($p=0,5833$).

Los resultados no mostraron tampoco diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA según expresión de LAG3 en la superficie de las células NK ($p=0,9526$), NKT-like ($p=0,7438$) y células T ($p=0,3292$).

Se realizó el análisis de la supervivencia de los pacientes de LMA en función de las diferentes subpoblaciones definidas por las coexpresiones de PD-1, TIM3 y LAG3 en las células NK, NKT-like y T.

En el estudio de las células NK (Fig. 80) los resultados mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor porcentaje de células NK con el fenotipo PD-1+TIM3+ ($p=0,0285$). Los pacientes con menor coexpresión de PD-1 y TIM3 en las células NK reducían el riesgo de muerte en un 57%.

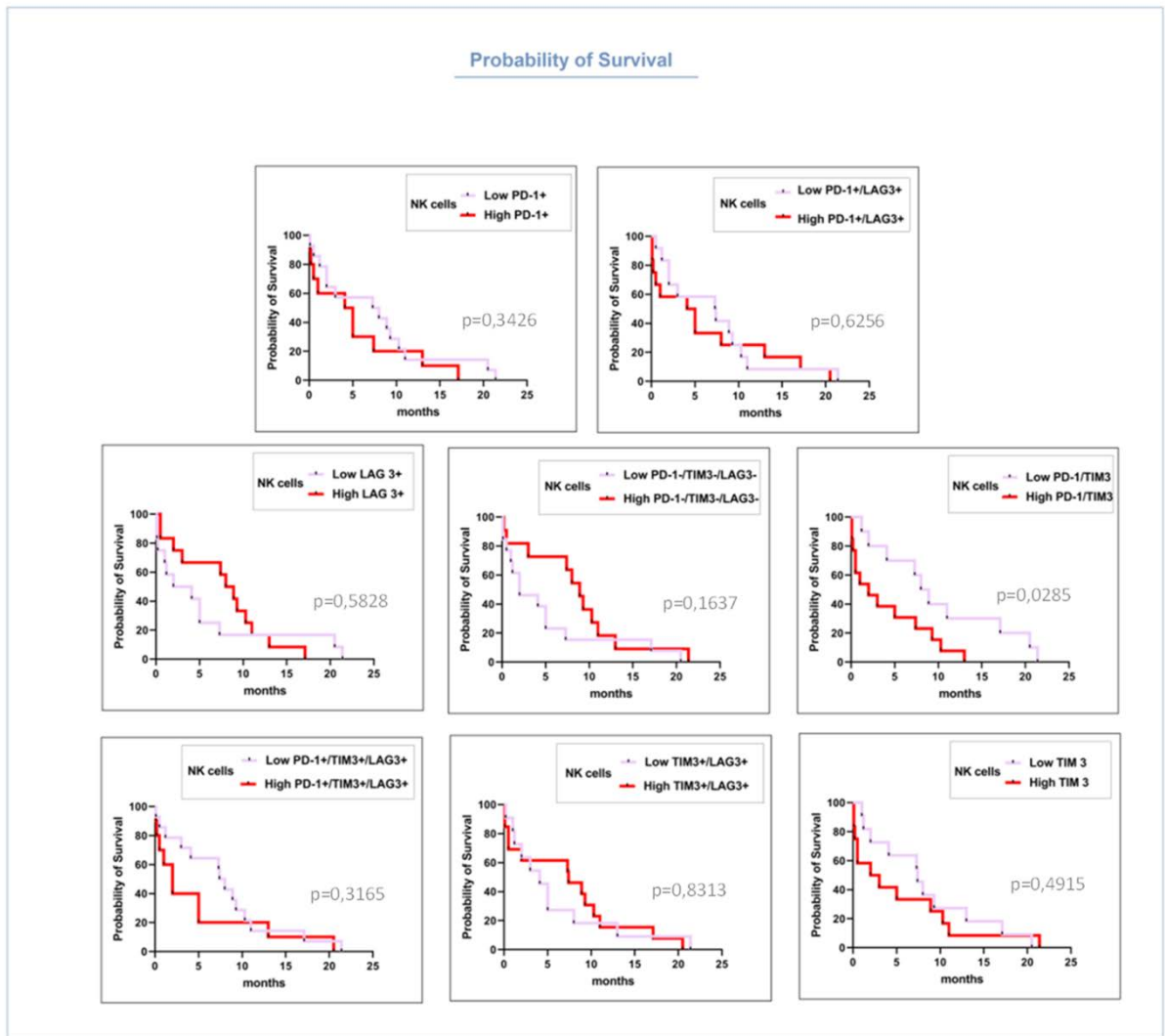


Figura 80: Análisis de supervivencia en función de la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3 en las células NK de los pacientes de LMA. Los pacientes de LMA (n = 25) se estratificaron según la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3, cada gráfico representa una de las ocho combinaciones posibles. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje y la línea malva corresponde a pacientes con bajo porcentaje de la combinación específica de receptores indicada en la parte superior derecha de la figura.

En relación con las células NKT-like (Fig. 81), los pacientes de LMA con menor expresión de PD-1 en las células NKT-like reducían el riesgo de muerte en un 51%, aunque las curvas de supervivencia no fueron significativamente diferentes ($p=0,0715$).

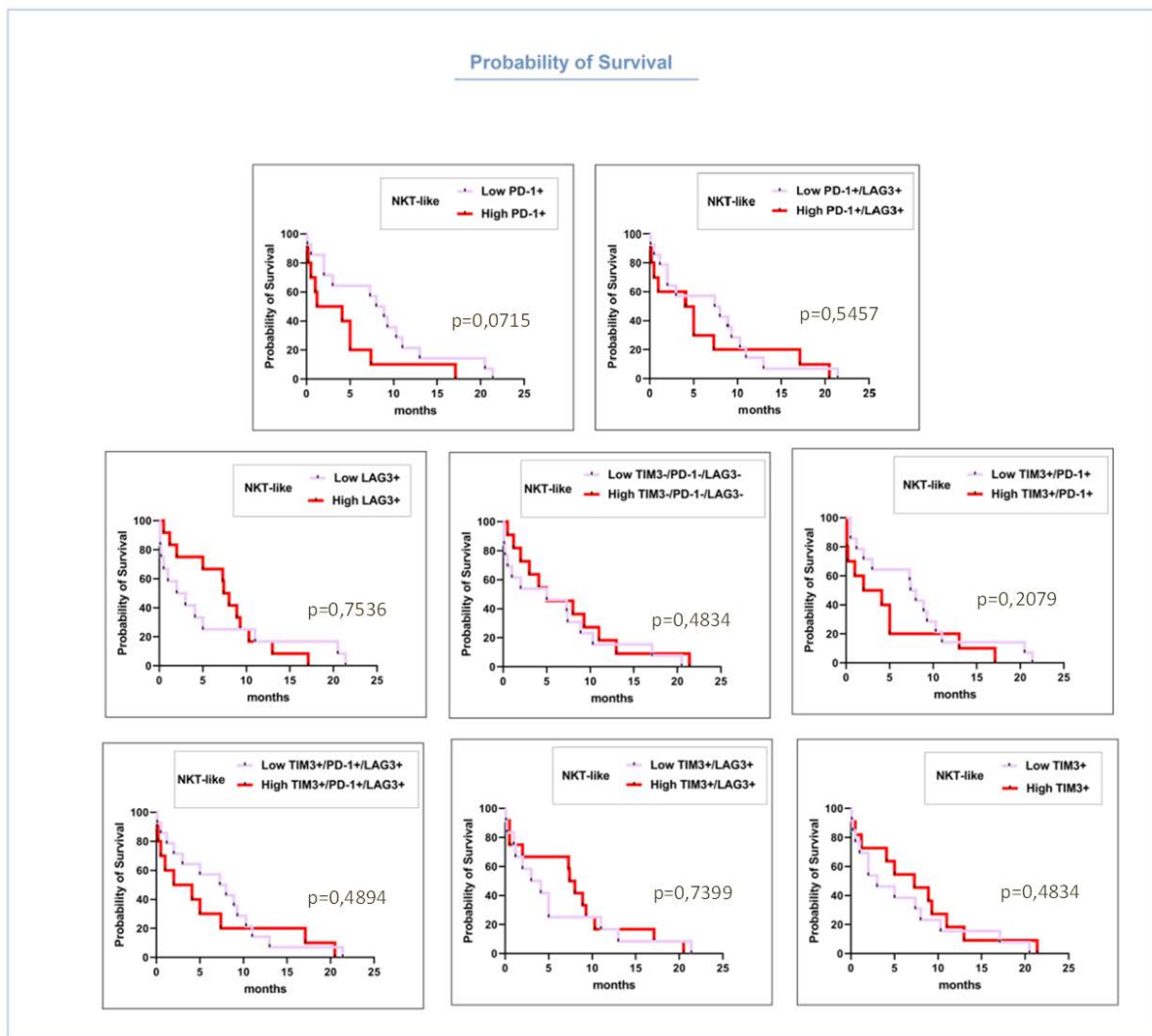


Figura 81: Análisis de supervivencia: coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3 en las células NKT-like de los pacientes de LMA. Los pacientes de LMA (n = 25) se estratificaron según la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3, cada gráfico representa una de las ocho combinaciones posibles. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje y la línea malva corresponde a pacientes con bajo porcentaje de la combinación específica de receptores indicada en la parte superior derecha de la figura.

Por último, analizamos la supervivencia de los pacientes de LMA en función de las coexpresiones de PD-1, TIM3 y LAG3 en las células T (Fig. 82). Los resultados mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor porcentaje de células T PD-1+LAG3-TIM3- ($p=0,0340$) y una reducción del riesgo relativo de muerte de un 47% en pacientes con menor expresión.

Las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor coexpresión de PD-1+TIM3+ en las células T también resultaron estadísticamente diferentes ($p=0,0109$) y los pacientes con menor coexpresión de PD-1 y TIM3 en las células T reducían el riesgo de muerte en un 63%. Los resultados mostraron también diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA con mayor y menor coexpresión de PD-1 y LAG3 ($p=0,0472$) en las células T. Los pacientes con menor coexpresión de PD-1 y LAG3 en las células T reducían el riesgo de muerte en un 53%.

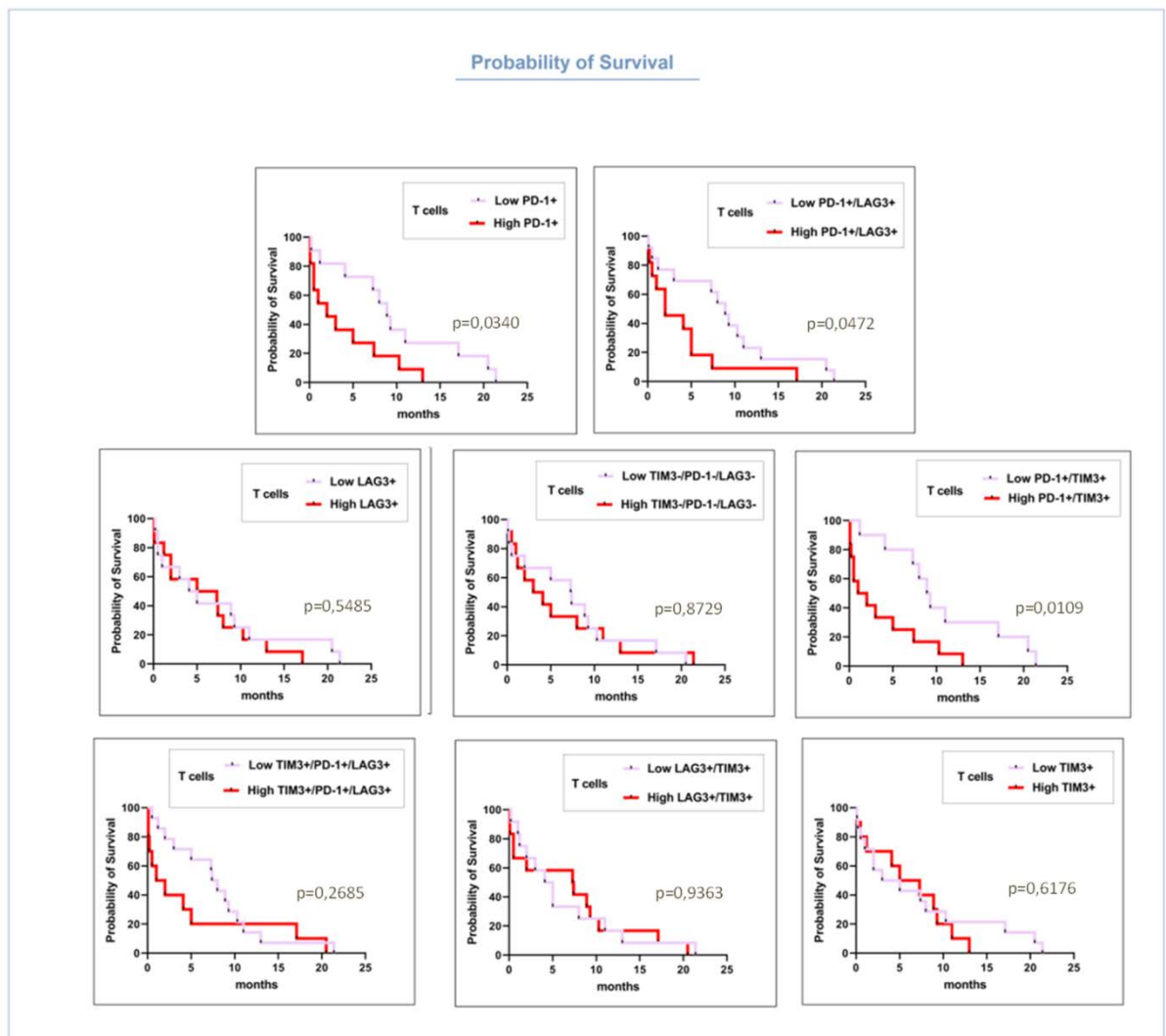


Figura 82: Análisis de supervivencia en función de la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3 en las células T de los pacientes de LMA. Los pacientes de LMA ($n = 25$) se estratificaron según la coexpresión de PD-1, TIM3 y LAG3 cada gráfico representa una de las ocho combinaciones posibles. Las líneas rojas corresponden a pacientes con alto porcentaje y la línea malva corresponde a pacientes con bajo porcentaje de la combinación específica de antígenos indicada en la parte superior derecha de la figura.

I) ANÁLISIS DE CORRELACIONES: RECEPTORES

ANÁLISIS DE RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE RECEPTORES en células NK, NKT-like y T de sangre periférica de pacientes de LMA y controles sanos

Analizamos las relaciones estadísticas entre la expresión de receptores activadores e inhibidores en la superficie de las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA y controles sanos. Comparamos las significaciones en ambos grupos como indicamos a continuación:

Células NK

En las células NK de los controles sanos (Fig. 83) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y CD6 ($p=0,008$)
 - ✓ CD16 y NKG2D ($p=0,031$)
 - ✓ NKp46 y KIR ($p=0,044$)
 - ✓ NKp80 y TIGIT ($p=0,004$)
 - ✓ CD244 y TIGIT ($p=0,008$)
 - ✓ CD244 y TACTILE ($p=0,000$)
 - ✓ CD57 y NKp44 ($p=0,012$)
 - ✓ CD57 y NKG2A ($p=0,028$)
 - ✓ DNAM-1 y TIM3 ($p=0,043$)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
 - ✓ NKp30 y CD85j ($p=0,031$)
 - ✓ NKG2C y PD-1 ($p=0,023$)
 - ✓ CD57 y TIM3 ($p=0,038$)

En las células NK de los pacientes de LMA (Fig. 83) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ NKp46 y LAG3 ($p=0,022$)
 - ✓ NKp46 y TACTILE ($p=0,024$)
 - ✓ NKp30 y TIGIT ($p=0,009$)
 - ✓ CD244 y TIGIT ($p=0,048$)
 - ✓ NKG2D y KIR ($p=0,048$)

- ✓ CD85j y KIR (p=0,014)
- ✓ CD57 y CD6 p=0,011)
- ✓ CD57 y NKG2C (p=0,009)
- ✓ TIGIT y TACTILE (p=0,002)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
- ✓ CD16 y NKp80 (p=0,005)
- ✓ NKp44 y TIM3 (p=0,037)
- ✓ DNAM-1 y TACTILE (p=0,012)
- ✓ NKG2D y TACTILE p=0,048)

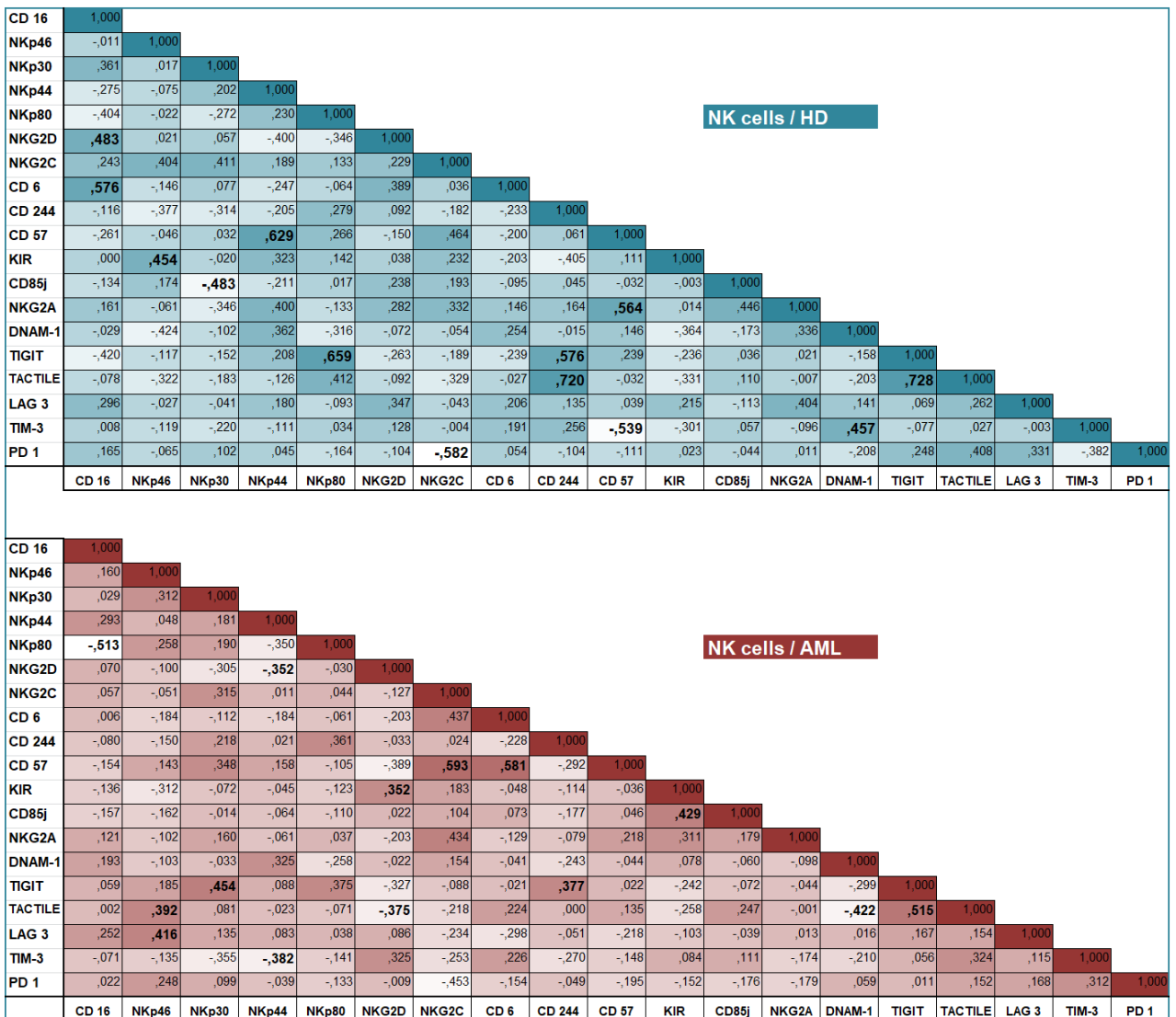


Figura 83: Matriz de correlación entre variables en las células NK. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones entre los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK. El mapa esta creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS.

En la parte superior las relaciones positivas en los controles sanos aparecen representadas en escala de azul y las relaciones inversas en escala del blanco. En la parte inferior las relaciones positivas en los pacientes de LMA aparecen representadas en escala de rojo y las relaciones inversas en escala del blanco. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación y con el número en negrita aquellas correlaciones significativas.

Células NKT-like

En las células NKT-like de los controles sanos (Fig. 84) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y CD57 ($p=0,007$)
 - ✓ CD16 y NKG2A ($p=0,020$)
 - ✓ CD57 y NKG2A ($p=0,013$)
 - ✓ NKp30 y NKp44 ($p=0,000$)
 - ✓ NKp80 y TIGIT ($p=0,001$)
 - ✓ TIGIT y TACTILE ($p=0,043$)
 - ✓ TIGIT y TIM3 ($p=0,032$)
 - ✓ CD244 y NKG2C ($p=0,014$)
 - ✓ CD244 y CD85j ($p=0,018$)
 - ✓ CD6 y LAG3 ($p=0,048$)
 - ✓ LAG3 y TIM3 ($p=0,039$)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
 - ✓ NKp46 y NKp44 ($p=0,029$)
 - ✓ NKp46 y LAG3 ($p=0,029$).
 - ✓ NKp80 y NKG2C ($p=0,031$)
 - ✓ NKG2C y PD-1 ($p=0,031$)
 - ✓ NKp80 y DNAM-1 ($p=0,042$)
 - ✓ KIR y LAG3 ($p=0,046$)
 - ✓ CD85j y TIM3 ($p=0,046$)
 - ✓ CD85j y LAG3 ($p=0,024$)

En las NKT-like de los pacientes de LMA (Fig. 84) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y NKp46 ($p=0,041$)
 - ✓ CD16 y CD6 ($p=0,033$)
 - ✓ CD16 y PD-1 ($p=0,043$)
 - ✓ PD-1 y NKG2A ($p=0,044$)
 - ✓ NKp30 y NKp44 ($p=0,006$)
 - ✓ KIR y NKG2D ($p=0,013$)
 - ✓ KIR y TIGIT ($p=0,016$)
 - ✓ KIR y CD85j ($p=0,005$)
 - ✓ CD57 y NKG2C ($p=0,006$)
 - ✓ CD244 y TIGIT ($p=0,050$)
 - ✓ TACTILE y LAG3 ($p=0,018$)
 - ✓ LAG3 y TIM3 ($p=0,000$)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y CD85 ($p=0,038$),
 - ✓ NKp30 y NKG2D ($p=0,001$)
 - ✓ NKG2D y NKp44 ($p=0,026$)
 - ✓ CD6 y NKp80 ($p=0,036$)
 - ✓ CD6 y KIR ($p=0,016$)
 - ✓ CD6 y CD85j ($p=0,20$)
 - ✓ DNAM-1 y CD244 ($p=0,011$)
 - ✓ DNAM-1 y KIR ($p=0,012$)
 - ✓ DNAM-1 y TIGIT ($p=0,002$)
 - ✓ NKG2A y TACTILE ($p=0,023$)

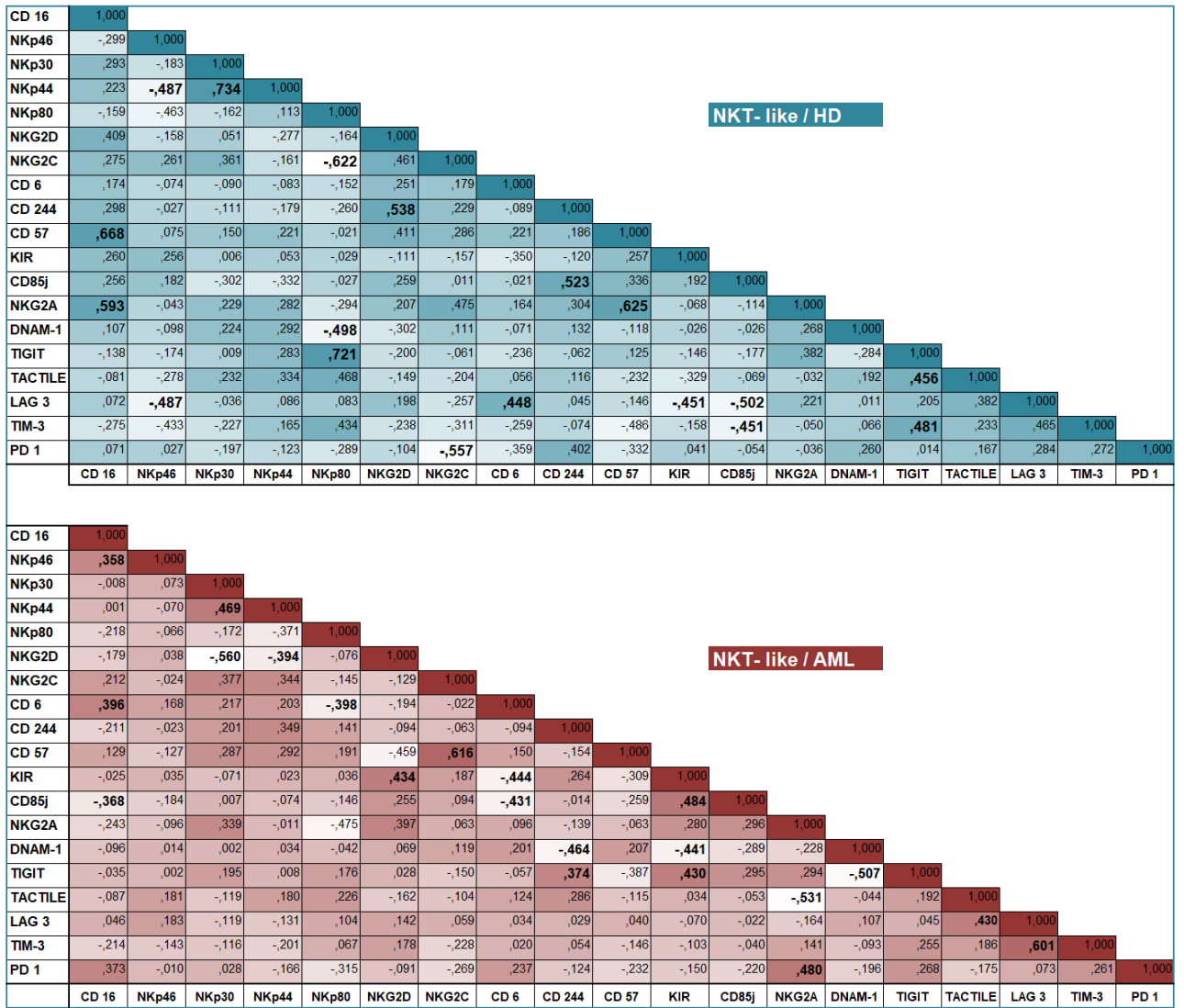


Figura 84: Matriz de correlación entre variables en las células NKT-like. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones entre los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NKT-like. El mapa esta creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS. En la parte superior las relaciones positivas en los controles sanos aparecen representadas en escala de azul y las relaciones inversas en escala del blanco. En la parte inferior las relaciones positivas en los pacientes de LMA aparecen representadas en escala de rojo y las relaciones inversas en escala del blanco. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación y en número negrita aquellas correlaciones significativas.

Células T

En las células T de los controles sanos (Fig. 85) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ NKp30 y NKp44 (p=0,002)
 - ✓ NKp80 y TACTILE (p=0,015)
 - ✓ TACTILE y TIGIT (p=0,024)
 - ✓ CD6 y LAG3 (p=0,038)
 - ✓ CD244 y CD85j (p=0,008)
 - ✓ CD85j y KIR (p=0,046)
 - ✓ CD57 y NKG2A (p=0,023)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y TIM3 (p=0,009)
 - ✓ NKp46 y TACTILE (p=0,037)
 - ✓ NKp46 y CD85j (p=0,031)
 - ✓ NKp30 y CD85j (p=0,032)
 - ✓ NKp80 y PD-1 (p=0,047)
 - ✓ PD-1 y NKG2C (p=0,003)

En las células T de los pacientes de LMA (Fig. 85) los resultados mostraron:

- Relación significativa positiva entre la expresión de:
 - ✓ CD16 y DNAM-1 (p=0,004)
 - ✓ NKp30 y CD244 (p=0,006)
 - ✓ NKp30 y NKp44 (p=0,001)
 - ✓ NKp80 y TIGIT (p=0,032)
 - ✓ TIGIT y TACTILE (p=0,011)
 - ✓ NKG2D y KIR (p=0,008)
 - ✓ KIR y CD85j (p=0,004)
 - ✓ LAG3 y TIM3 (p=0,000)
- Relación significativa inversa entre la expresión de:
 - ✓ NKp30 y NKG2D (p=0,001)
 - ✓ NKp44 y TIM3 (p=0,040)
 - ✓ NKG2C y PD-1 (p=0,005)
 - ✓ CD57 y TACTILE (p=0,047)
 - ✓ TIM3 y NKp44 (p=0,40)

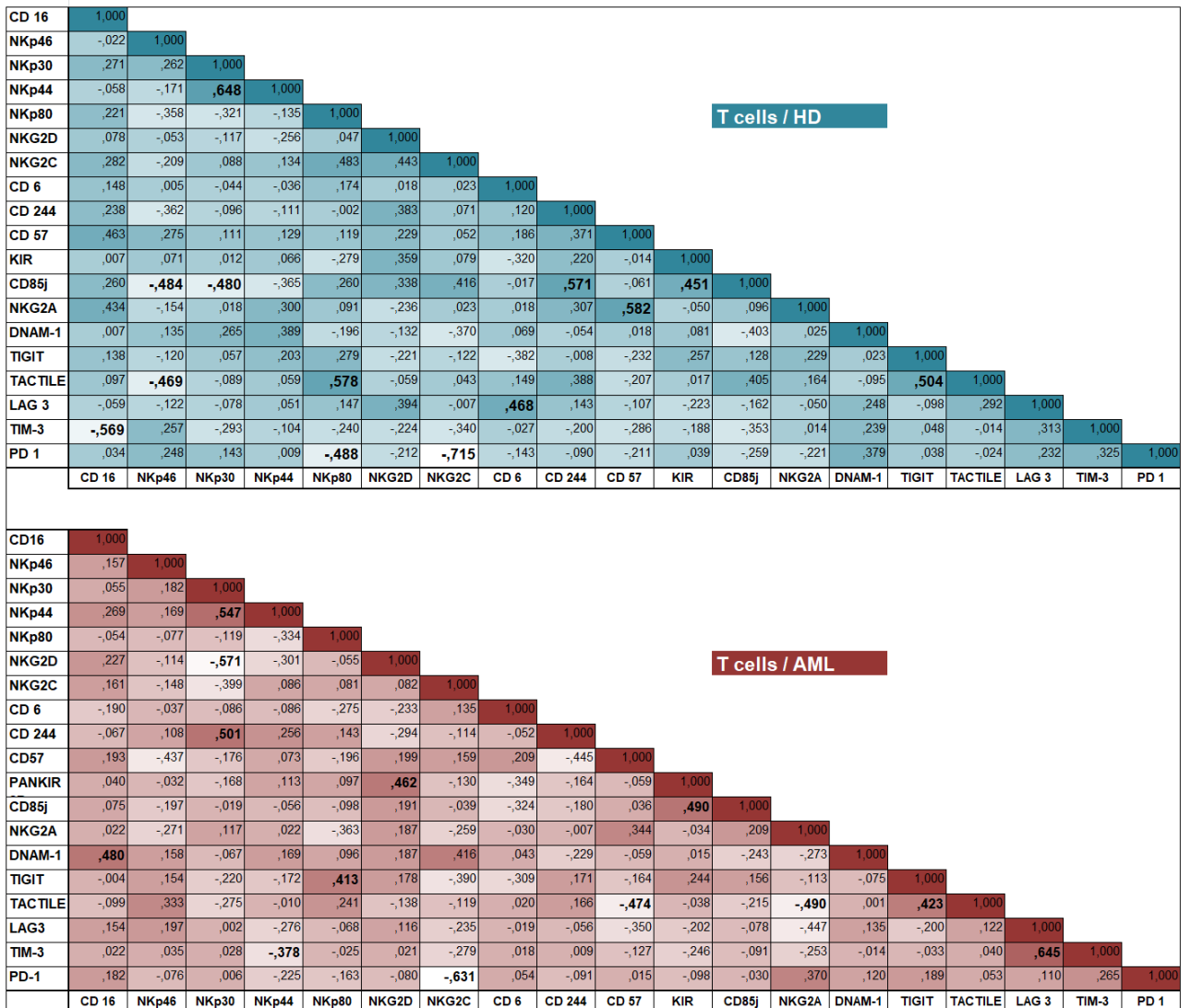


Figura 85: Matriz de correlación entre variables en las células NKT-like. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones entre los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NKT-like. El mapa esta creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS. En la parte superior las relaciones positivas en los controles sanos aparecen representadas en escala de azul y las relaciones inversas en escala del blanco. En la parte inferior las relaciones positivas en los pacientes de LMA aparecen representadas en escala de rojo y las relaciones inversas en escala del blanco. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación y en número en negrita aquellas correlaciones significativas.

V.3 Médula ósea

ANÁLISIS DE CHECKPOINTS Y RECEPTORES ACTIVADORES en células NK, NKT-like y T de pacientes de LMA médula ósea vs sangre periférica

Se llevó a cabo el análisis de las muestras de médula ósea de aquellos pacientes de LMA de los que también habíamos recibido muestras de sangre periférica en el momento de diagnóstico, incluyendo para el análisis un total de 14 muestras de médula ósea. En estos pacientes, se realizó la comparación entre los resultados obtenidos en el análisis de las poblaciones linfocitarias y la expresión de receptores en la médula ósea con los de sangre periférica.

Análisis de Poblaciones de linfocitos

En el análisis del porcentaje de linfocitos, los resultados mostraron una diferencia significativa ($p=0,026$) entre la médula ósea y la sangre periférica de los pacientes de LMA (Fig. 86).

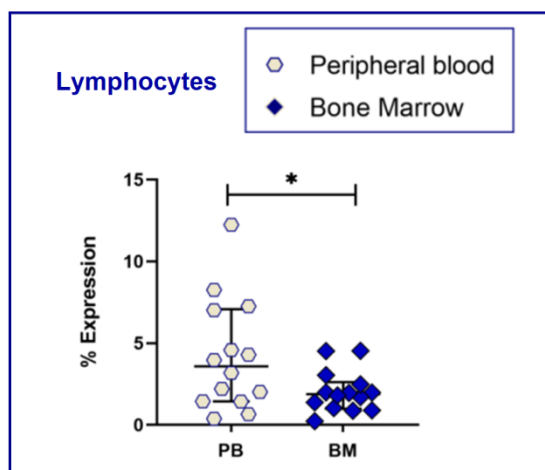


Figura 86: Análisis de linfocitos en la Médula Ósea y Sangre Periférica de los pacientes de LMA. Las células mononucleares (PBMCs) presentes en la sangre periférica (PB, peripheral blood) y médula ósea (BM, bone marrow) de los pacientes de LMA (en inglés, *acute myeloid leukemia*, AML) y de los controles sanos (en inglés, *healthy donors*, HD) se analizaron por citometría de flujo. La población linfocitaria fue seleccionada utilizando el marcador CD45 (siendo considerados linfocitos las células identificadas como CD45^{high}) y en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC). El porcentaje de linfocitos en sangre periférica (n=14) está representado en la figura por hexágonos (PB, peripheral blood) y el porcentaje de linfocitos en la médula ósea (BM, bone marrow) se representa por rombos (n=14). * $p\leq 0,05$.

Los resultados mostraron una diferencia significativa ($p=0,026$) en el porcentaje de células NK ($p=0,029$) y células NKT-like entre la médula ósea y la sangre periférica de los pacientes de LMA. No se observaron diferencias en el porcentaje de células T (Fig. 87).

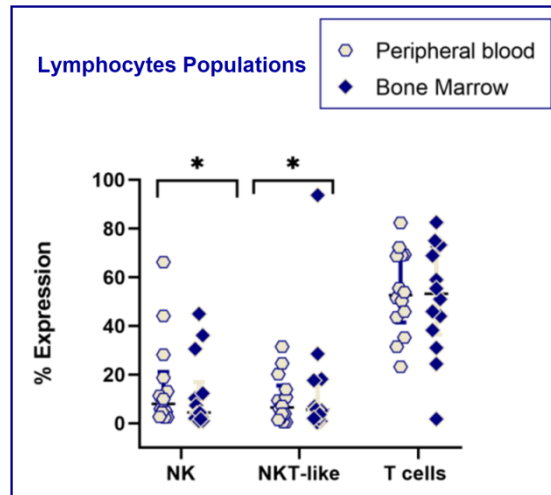


Figura 87: Análisis de las poblaciones de células NK, NKT-like y linfocitos T en la Médula Ósea y Sangre Periférica de los pacientes de LMA. El porcentaje de linfocitos en sangre periférica se representa por hexágonos (PB) y el porcentaje de linfocitos en la médula ósea (BM) por rombos azules.

Análisis de Receptores

Analizamos la expresión de receptores activadores e inhibidores en la superficie de las células NK, NKT-like y células T de médula ósea y la comparamos con la expresión de receptores activadores e inhibidores en la superficie de las células NK, NKT-like y células T de la sangre periférica de los pacientes de LMA.

Células NK

Los resultados mostraron diferencias significativas al comparar en las células NK de la médula ósea y sangre periférica la expresión de los receptores NKp44 ($p=0,043$), TIM3 ($p=0,032$) y PD-1 ($p=0,023$) (Fig. 88). La expresión en la superficie de las células NK de sangre periférica de los pacientes de LMA de los receptores fue: NKp44 ($1,04\pm 19,34\%$), TIM3 ($86,84\pm 10,82\%$) y PD-1 ($0,46\pm 1,97\%$) y en medula ósea: NKp44 fue ($22,01\pm 29,11\%$), TIM3 ($81,01\pm 7,40\%$) y PD-1 ($0,31\pm 9,99\%$).

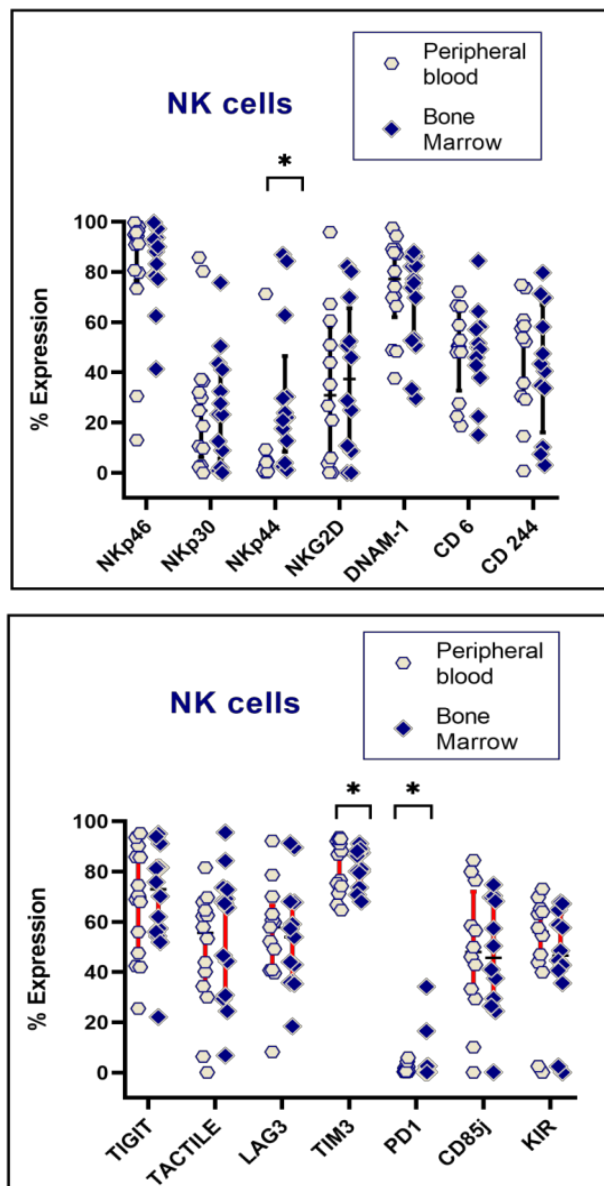


Figura 88: Expresión de receptores en las células NK de médula ósea y sangre periférica en pacientes de LMA. Análisis de la expresión de receptores activadores (figura izquierda) y receptores inhibidores (figura derecha) en las células NK de la médula ósea (rombos) y sangre periférica (hexágonos) de los pacientes de LMA.

Células NKT-like

Los resultados mostraron diferencias significativas al comparar en las células NKT-like de la médula ósea y sangre periférica la expresión de los receptores NKp30 ($p=0,034$), NKp44 ($p=0,034$) y PD-1 ($p=0,031$) (Fig. 89). La expresión en la superficie de las células NKT-like de sangre periférica de los pacientes de LMA de los receptores fue: NKp30 ($3,48\pm 19,67\%$), NKp44 ($0,85\pm 7,8\%$) y PD-1 ($0,47\pm 17,88\%$) y en médula ósea: NKp30 fue ($6,38\pm 16,37\%$), NKp44 ($18,48\pm 24,27\%$) y PD-1 ($0,79\pm 13,75\%$)

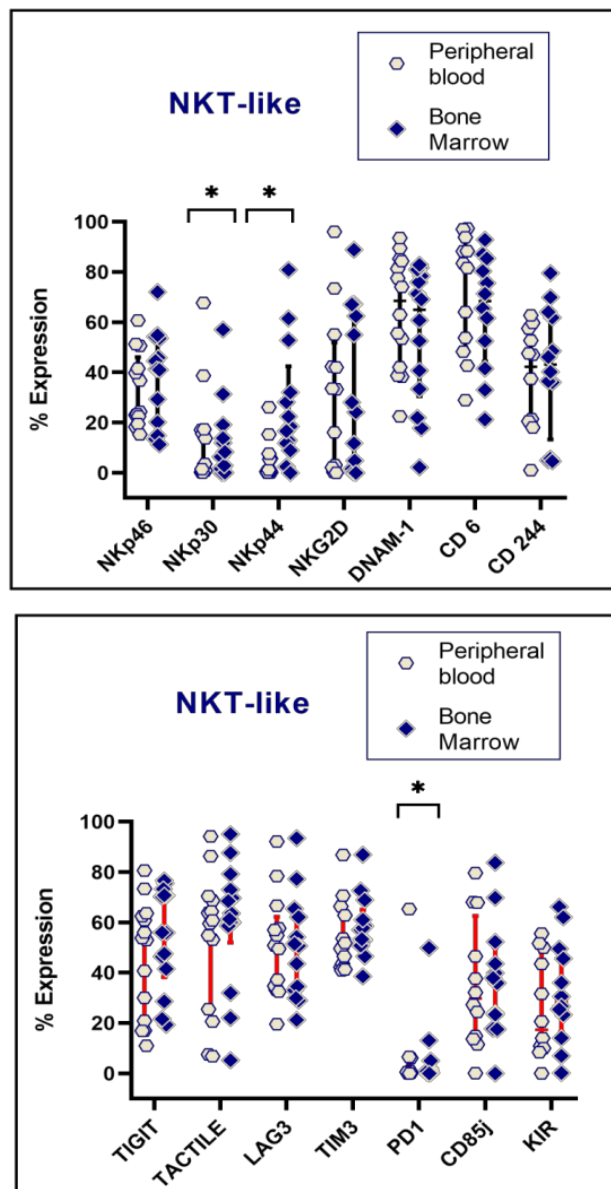


Figura 89: Expresión de receptores en las células NKT-like de médula ósea y sangre periférica en pacientes de LMA. Análisis de la expresión de receptores activadores (figura izquierda) y receptores inhibidores (figura derecha) en las células NKT-like de la médula ósea (rombos) y sangre periférica (hexágonos) de los pacientes de LMA.

Células T

Los resultados mostraron diferencias significativas al comparar en las células T de la médula ósea y sangre periférica la expresión de los receptores NKp30 ($p=0,034$), NKG2D ($p=0,029$), CD6 ($p=0,040$), CD244 ($p=0,040$), PD-1 ($p=0,032$) y KIR ($p=0,040$) (Fig. 90). La expresión en la superficie de las células T de sangre periférica de los pacientes de LMA de los receptores fue: NKp30 ($16,24\pm 22,42\%$), NKG2D ($7,17\pm 7,29\%$) CD6 ($92,26\pm 7,62\%$), CD244 ($11,17\pm 13,77\%$) KIR ($2,43\pm 11,50\%$) y PD-1 ($0,43\pm 3,77\%$) y en médula ósea: NKp30 ($0,91\pm 11,25\%$), NKG2D ($8,45\pm 15,32\%$) CD6 ($90,78\pm 7,98\%$), CD244 ($17,89\pm 16,65\%$) KIR ($3,18\pm 12,31\%$) y PD-1 ($1,14\pm 9,16\%$).

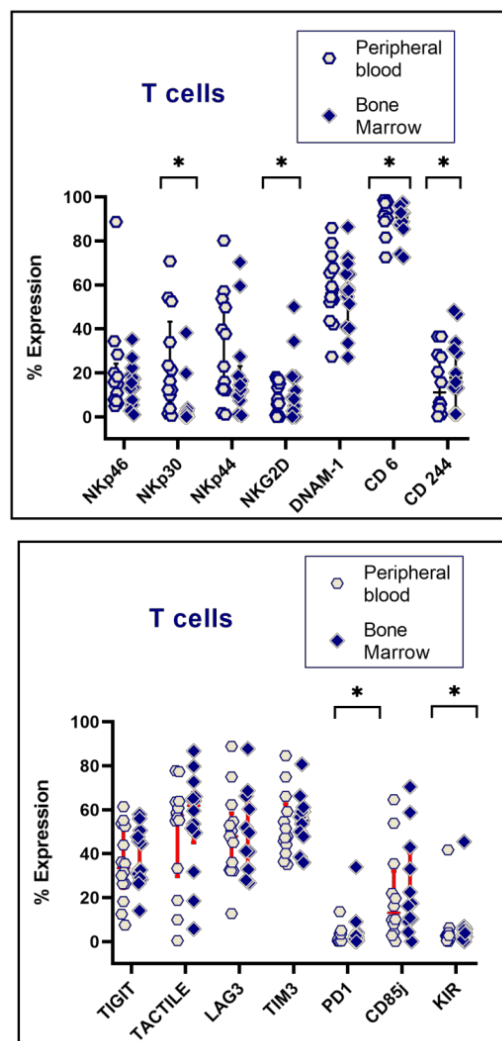


Figura 90: Expresión de receptores en las células T de médula ósea y sangre periférica de pacientes de LMA. Análisis de la expresión de receptores activadores (figura izquierda) y receptores inhibidores (figura derecha) en las células T de la médula ósea (color azul marino) y sangre periférica (color crema) de los pacientes de LMA.

FENOTIPO de BLASTOS de LMA

Analizamos la expresión de diferentes ligandos en la superficie de los blastos de las LMA mediante citometría de flujo (Fig. 91).

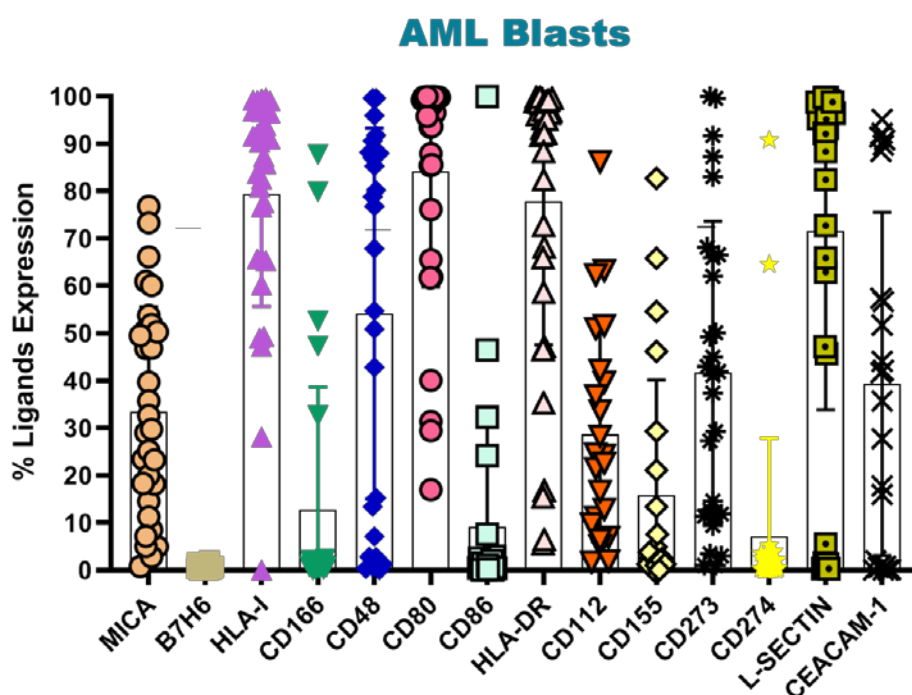


Figura 91: Expresión de ligandos en blastos de LMA. Las células leucémicas (blastos) de los pacientes de LMA (en inglés, *acute myeloid leukemia*, AML) se analizaron por citometría de flujo. La población fue seleccionada utilizando el marcador CD45 (siendo considerados blastos las células identificadas como CD45^{low}) y en función del tamaño (FSC) y complejidad (SSC). La expresión de los ligandos MICA (n=31); B7H6 (n=25); HLA-I (n=32); CD166 (n=25) CD48 (n=22); ; CD80 (n=31); CD86 (n=25); HLA-DR (n=24); CD112 (n=20); CD155 (n=20); CD273 (n=29); CD274 (n=30); L-SECTIN (n=31); CEACAM-1 (n=26) aparece representado en la figura. La línea superior de la caja representa la media y los bigotes la desviación estándar de la muestra. Ligando de NKG2D:MICA (34,42%±22,36%); Ligando de NKp30: B7H6 (0,55%±0,48%); Ligando de receptores de moléculas de HLA-I (79,39%± 27,31%); Ligando de CD6: CD166 (3,03%±10,34%); Ligando de CD244: CD48 (63,49% ±32,9%); Ligando de CTLA/CD28: CD80 (85,09% ±26,03%) y CD86 (2,11%±4,87%); HLA-DR (81,56%±27,68%); Ligando de receptores de nectinas: CD112 (31,63%±22,89%) y CD155 (18,82%± 24,28%); Ligandos del receptor PD-1: CD273 (41,9% ±23,9%) y CD274 (5,14% ±17,71%); Ligando de LAG3: L-SECTIN (81,53% ±27,95%); Ligando de TIM3: CEACAM-1 (52,49%±29,18%).

- Análisis de correlación: ligandos en los blastos de LMA

Analizamos las correlaciones entre la expresión de los distintos ligandos expresados en la superficie de los blastos de LMA (Fig. 92). Debido a la baja expresión de los ligandos B7H6, CD274 y CD86 y riesgo para valor las correlaciones obviamos los resultados.

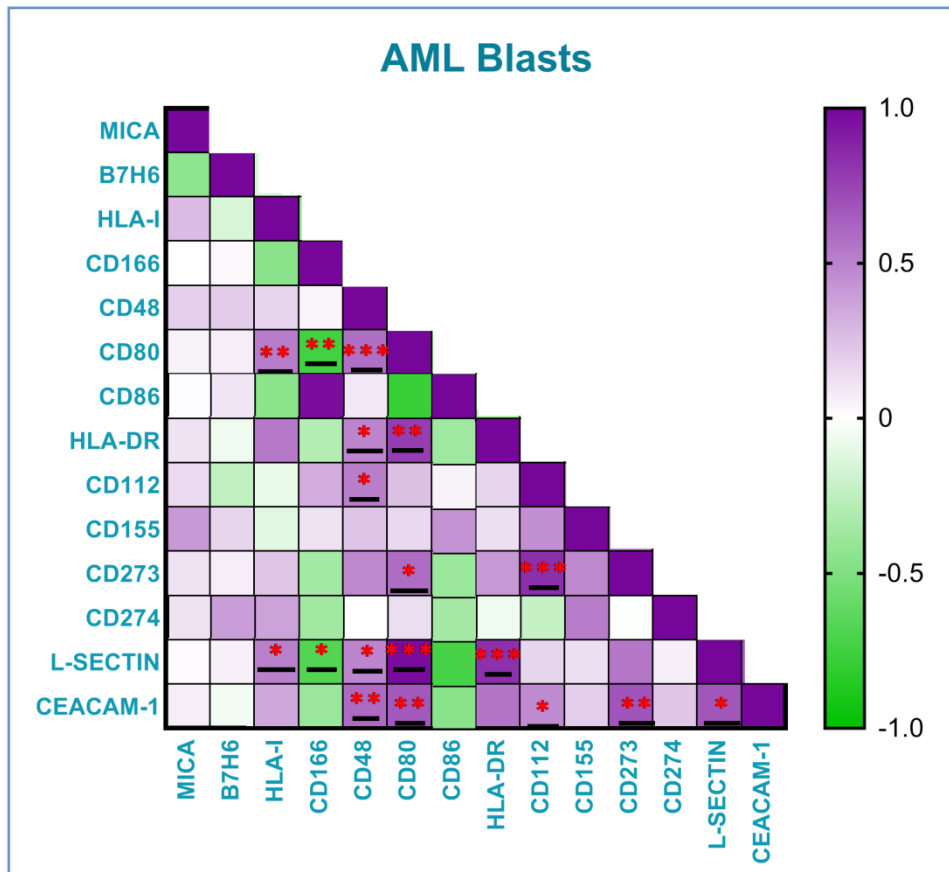


Figura 92: Matriz de correlación. Expresión de Ligandos en blastos de LMA. Análisis de las relaciones de la expresión de los distintos ligandos en los blastos de LMA. En la figura se representan las relaciones positivas entre la expresión de moléculas en los blastos en tonos morados y las inversas en tonos verdes. En el interior de cada cuadrado las estrellas rojas representan el grado de significación (*p<0,05; **p<0,005; ***p=0,000).

La expresión de MICA/B en la superficie de los blastos de LMA, no se relacionaba de manera significativa con la expresión de ningún otro ligando.

Al analizar la relación entre la expresión de los ligandos de PD-1 con el resto de los ligandos, los resultados mostraron que la expresión de CD273 se relacionaba de manera positiva con la expresión de CD112 ($p=0,000$; $r=0,0863$), CEACAM-1 ($p=0,001$; $r=0,636$), L-SECTIN ($p=0,048$; $r=0,391$) y CD80 ($p=0,016$; $r=0,468$).

En el análisis de los ligandos de la familia de las nectinas y moléculas tipo nectinas, la expresión de CD112 se relacionaba de manera positiva significativa con la expresión de CD48 ($p=0,020$; $r=0,544$), CEACAM-1 ($p=0,034$; $r=0,503$) y como señalamos anteriormente con la expresión de CD273.

La expresión de CD48 además de con la expresión de CD112 se relacionó de manera significativa positiva con la expresión de HLA-DR ($p=0,031$; $r=0,460$), L-SECTIN ($p=0,031$; $r=0,460$), CD80 ($p=0,000$; $r=0,722$) y CEACAM-1 ($p=0,003$; $r=0,601$).

La expresión de L-SECTIN también se relacionaba de manera significativa positiva con la expresión de HLA-DR ($p=0,000$; $r=0,820$), HLA-I ($p=0,015$; $r=0,462$), CD80 ($p=0,000$; $r=0,800$), CEACAM-1 ($p=0,017$; $r=0,463$) y de manera significativa inversa con CD166 ($p=0,016$; $r=0,476$).

La expresión de CD80 también se relacionó de manera positiva significativa con HLA-I ($p=0,004$; $r=0,568$) y HLA-DR ($p=0,001$; $r=0,594$).

- Análisis de correlación: ligandos y receptores

Después de analizar la expresión de los ligandos, analizamos la relación entre la expresión de dichos ligandos en los blastos de LMA y la expresión de los receptores que habíamos analizado previamente en la superficie de las células NK, NKT-like y células T. Los resultados mostraron:

La expresión de MICA/B en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera inversa con la expresión de CD244 ($p=0,008$).
- ❖ En las células NKT-like de manera inversa con CD244 ($p=0,027$).
- ❖ En células T de manera inversa con CD6 ($p=0,039$).

La expresión de HLA-I en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera inversa con NKp44 ($p=0,005$) y CD57 ($p=0,007$).
- ❖ En las células NKT-like de manera inversa con NKG2A ($p=0,020$).
- ❖ En las células T de manera inversa con NKG2A ($p=0,045$).

La expresión de CD48 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con la expresión de TIM3 ($p=0,040$).
- ❖ En las células NKT-like de manera inversa a CD6 ($p=0,047$).
- ❖ En las células T de manera positiva con la expresión de TIGIT ($p=0,034$).

La expresión de CD80 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con la expresión de TIM3 ($p=0,006$) y de manera inversa con CD244 ($p=0,001$).
- ❖ En las células NKT-like de manera positiva a NKp30 ($p=0,002$) y de manera inversa a la expresión de CD244 ($p=0,004$) y NKG2A ($p=0,000$).
- ❖ En las células T de manera positiva con la expresión NKp30 ($p=0,023$) y de manera inversa con CD244 ($p=0,003$) y NKG2A ($p=0,003$).

La expresión de HLA-DR en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con TIM3 ($p=0,003$) y de manera inversa a la expresión de CD244 ($p=0,026$), a la coexpresión de LAG3/PD-1 ($p=0,036$).

- ❖ En las células NKT-like de manera positiva a NKp30 ($p=0,04$).

- ❖ En las células T de manera inversa a CD244 ($p=0,013$).

La expresión de CD112 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con la expresión de TIM3 ($p=0,008$) y la de PD-1 ($p=0,032$).

- ❖ En las células NKT-like de manera positiva a PD-1 ($p=0,004$), NKp44 ($p=0,050$) y NKG2D ($p=0,024$).

- ❖ En las células T de manera positiva con PD-1 ($p=0,024$), NKp30 ($p=0,015$), NKp44 ($p=0,035$), CD85j ($p=0,014$) NKG2D ($p=0,025$) y NKG2A ($p=0,047$).

La expresión de CD155 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con TIGIT ($p=0,039$) con TACTILE ($p=0,049$) y manera inversa con DNAM-1 ($p=0,009$)

- ❖ En las células NKT-like de manera positiva con NKp46 ($p=0,017$) y de manera inversa a DNAM-1 ($p=0,006$) y CD6 ($p=0,034$).

- ❖ En las células T de manera inversa a DNAM-1 ($p=0,019$) y CD6 ($p=0,000$).

La expresión de CD273 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera positiva con la expresión de los receptores KIR ($p=0,011$).

- ❖ En las células NKT-like de manera positiva con PD-1 ($p=0,018$), NKp30 ($p=0,002$) y NKp80 ($p=0,037$) y de manera inversa con NKp46 ($p=0,050$).

- ❖ En las células T de manera positiva a NKp30 ($p=0,046$).

La expresión de L-SECTIN en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NK de manera inversa con la expresión de CD244 ($p=0,020$).
- ❖ En las células NKT-like de manera positiva con la expresión de NKp30 ($p=0,004$) y de manera inversa con la expresión de NKG2A ($p=0,002$).
- ❖ En las células T de manera de manera positiva a la expresión de NKp30 ($p=0,048$) y de manera inversa a CD244 ($p=0,011$) y a NKG2A ($p=0,000$).

La expresión de CEACAM-1 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera estadísticamente significativa:

- ❖ En las células NKT-like de manera positiva con la expresión de NKp80 ($p=0,010$) y de manera inversa con la expresión de NKG2A ($p=0,033$).

- Análisis de supervivencia: fenotipo de los blastos de LMA

Analizamos la supervivencia de los pacientes que se estratificaron según la expresión de los distintos ligandos analizados en la superficie de los blastos de LMA (Fig. 88).

Los resultados mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los 21 pacientes de LMA estratificados según la expresión de CD48 en los blastos de LMA ($p=0,0302$). Los pacientes de LMA con menor porcentaje de CD48 reducían el riesgo relativo de muerte en un 60%.

Los resultados también mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los 20 pacientes de LMA estratificados según la expresión de CD274 ($p=0,0111$) y CD86 en los blastos de LMA ($p=0,0218$), pero consideramos complicado asegurar una relevancia en la progresión de la enfermedad debido a la muy baja expresión de estos ligandos en la mayoría de los blastos de los pacientes de LMA analizados. Tan solo se observó una alta expresión de CD274 en 2 pacientes y una alta expresión de CD86 en 4 pacientes.

No se obtuvieron diferencias significativas en función del porcentaje de expresión en los blastos de los otros ligandos analizados (Fig. 93).

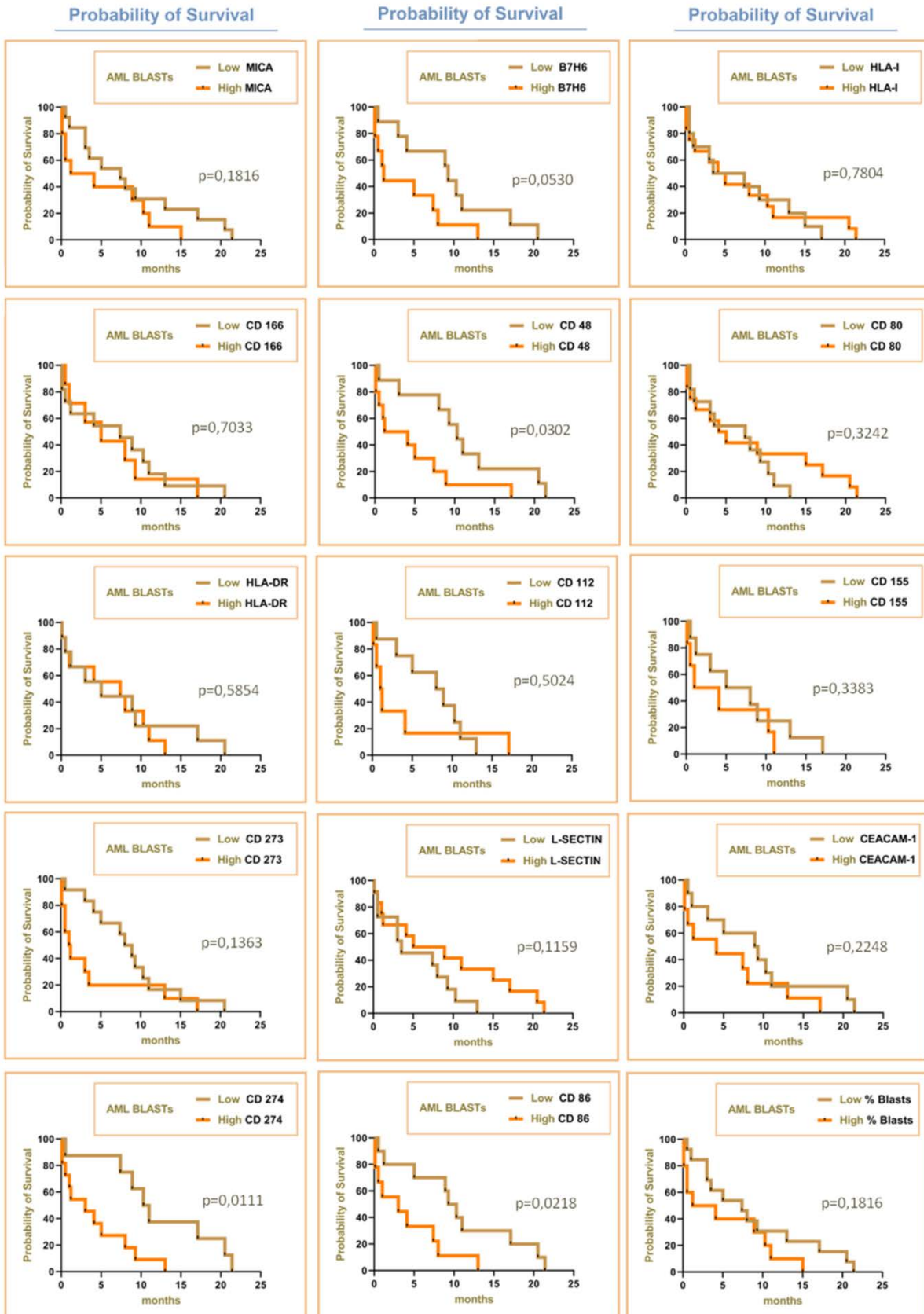


Figura 93: Análisis de supervivencia en función del fenotipo y porcentaje de blastos leucémicos. Las líneas naranjas corresponden a pacientes con alto porcentaje de blastos positivos para el ligando indicado y las líneas marrones a pacientes con bajo porcentaje de células leucémicas positivas para dicho marcador.

Análisis de Proteínas Cytotóxicas Intracelulares

Analizamos el contenido intracelular de Perforina, Granulicina y Granzima B en las células NK, NKT-like y células T.

Células NK

Los resultados (Fig. 90) mostraron en los pacientes de LMA un descenso significativo del porcentaje de células NK que contenían Perforina ($p=0,015$), Granulicina ($p=0,019$) y Granzima B ($p=0,018$) en comparación con los controles sanos.

El análisis de Perforina en las células NK de los pacientes de LMA mostró expresión en el $75,28\pm 16,68\%$ y en los controles sanos en el $86,64\pm 6,5\%$ de las células. El porcentaje de células NK que contenían Granulicina en los pacientes de LMA fue del $78,76\pm 20,13\%$ y en los controles sanos del $89,30\pm 8,12\%$. La Granzima B estaba expresada en un $80,95\pm 12,41\%$ de las células NK de los pacientes de LMA y en un $90\pm 4,2\%$, en el caso de los controles sanos (Fig. 94).

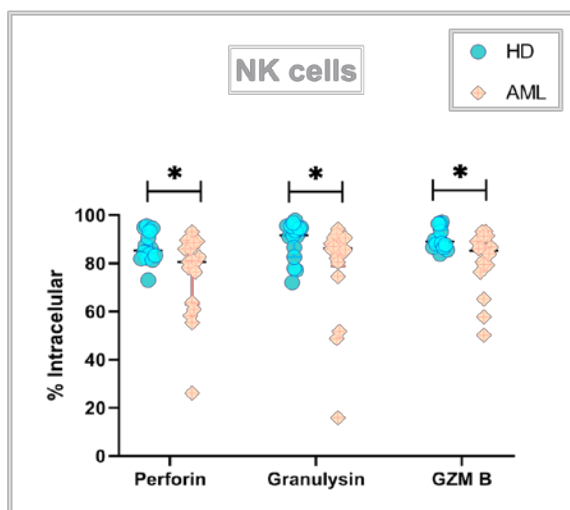


Figura 94: Análisis del contenido intracelular de Perforina, Granulicina y Granzima B en las células NK. El contenido intracelular de las proteínas citotóxicas en los pacientes de LMA queda representado por rombos y en los controles sanos por círculos azules.

Continuamos con el análisis de correlación entre la expresión de Perforina, Granulisina y Granzima B, en el interior de las células NK y la expresión de los receptores en la superficie.

En las células NK de los controles sanos los resultados mostraron una relación significativa positiva entre el contenido intracelular de Perforina y la expresión de CD16 ($p=0,030$; $r=0,578$) y CD6 ($p=0,001$; $r=0,771$) y una relación inversa con CD244 ($p=0,020$; $r=0,613$) y NKp30 ($p=0,026$; $r=0,591$). El contenido intracelular de Granulisina y Granzima B en las células NK de los controles sanos se relacionó significativamente de manera inversa con la expresión de NKp80 ($p=0,40$; $r=0,536$).

En las células NK de los pacientes de LMA, tan solo resultó significativa la relación inversa entre el contenido intracelular de Perforina y la expresión de CD244.

Células NKT-like

Los resultados mostraron un descenso significativo de células NKT-like en los pacientes de LMA que contenían Granulisina ($p=0,000$) y Granzima B ($p=0,014$). El $34,27\pm 17,74\%$ de las células NKT-like de los pacientes de LMA expresaron perforina frente al $41,35\pm 25,57\%$ de los controles sanos.

El porcentaje de células NKT-like que expresaban Granulisina fue del $44,29\pm 18,28\%$ en los pacientes de LMA y del $77,75\pm 20,70\%$ en los controles sanos. La Granzima B se encontró en el $50,88\pm 22,59\%$ de células NKT-like en los pacientes de LMA y en el $71,10\pm 23,34$ de células NKT-like en los controles sanos (Fig. 95).

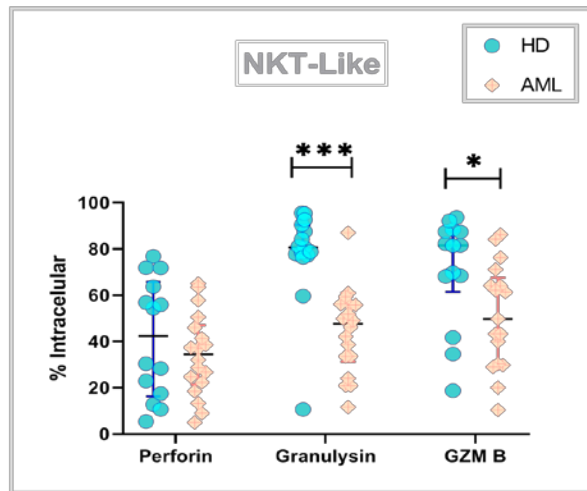


Figura 95: Análisis del contenido intracelular de Perforina, Granulinsina y Granzima B en las células NKT-like. El contenido intracelular de las proteínas citotóxicas en los pacientes de LMA queda representado por rombos y en los controles sanos por círculos.

Se analizó la relación entre el contenido intracelular de Perforina y la expresión de receptores de membrana en las células NKT-like y los resultados no mostraron ninguna correlación significativa en los controles sanos mientras que en los pacientes de LMA la concentración intracelular de Perforina se relacionaba de manera directa con la expresión de NKp46 ($p=0,010$; $r=0,624$) y NKG2C ($p=0,013$; $r=0,783$) y estuvo próxima a significación la relación inversa con la expresión de CD244 ($p=0,051$; $r=0,600$).

En el análisis del contenido intracelular de Granulinsina en las células NKT-like de los controles sanos los resultados mostraron una relación positiva con la expresión de DNAM-1 ($p=0,041$; $r=0,532$), CD57 ($p=0,021$; $r=0,668$), CD85j ($p=0,014$; $r=0,618$) y PD-1 ($p=0,022$, $r=0,586$) mientras que en los pacientes de LMA el contenido intracelular de Granulinsina se relacionaba de manera significativa inversa con la expresión de CD244 ($p=0,016$; $r=0,700$).

En el análisis del contenido intracelular de Granzima B en las células NKT-like de los controles sanos los resultados mostraron una relación positiva con la expresión de DNAM-1 ($p=0,048$, $r=0,518$), CD85j ($p=0,001$; $r=0,754$) y KIR ($p=0,031$; $r=0,557$) y en los pacientes de LMA, el contenido intracelular de Granzima B se relacionaba de manera directa con NKp46 ($p=0,005$; $r=0,668$) y NKG2C ($p=0,002$; $r=0,867$).

Células T

Los resultados no mostraron diferencias significativas en el análisis del contenido intracelular de Perforina, Granulicina y Granzima B en las células T de los pacientes de LMA cuando se compararon con los controles sanos. El porcentaje de células T con expresión intracelular de Perforina fue de $15,20 \pm 26,02\%$ en los pacientes de LMA y de $16,69 \pm 30,18\%$ en los controles sanos. La Granulicina estuvo expresada en un $8,43 \pm 6,81\%$ de los linfocitos T de los pacientes de LMA y la expresión en los controles sanos fue de $13,12 \pm 11,32\%$. El porcentaje de expresión de Granzima en las células T de los pacientes de LMA fue de un $14,05 \pm 8,12\%$ y en los controles sanos de $13,71 \pm 12,02\%$ (Fig. 96).

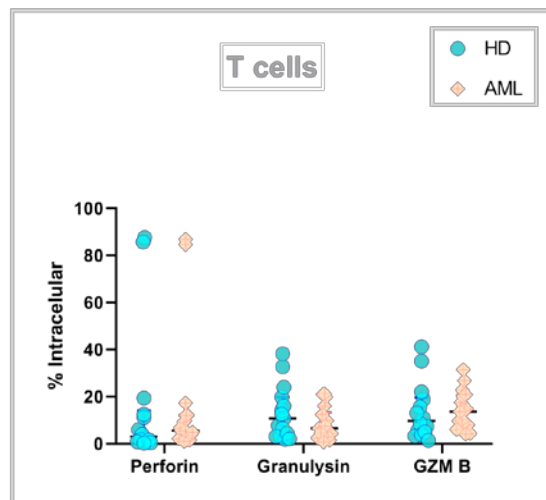


Figura 96: Análisis de Perforina, Granulicina y Granzima B en las células T. El contenido intracelular de las proteínas citotóxicas en los pacientes de LMA queda representado por rombos y en los controles sanos por círculos azules.

- Análisis de correlación: Proteínas citotóxicas intracelulares

En el análisis de correlación de la perforina (Fig. 97) en las células NK los resultados mostraron en los controles sanos una relación positiva con el receptor CD16 ($p=0,030$; $r=0,0578$) y CD6 ($p=0,001$; $r=0,771$). La perforina se relacionó de manera negativa con NKp30 ($p=0,026$; $r=0,591$) y CD244 ($p=0,020$; $r=0,613$) en los controles sanos. En los pacientes de LMA la perforina mostró una relación inversa con CD244 ($p=0,21$; $r=0,682$).

En el análisis de correlación de la granulicina (Fig. 97) en las células NK los resultados mostraron en los controles sanos una relación inversa con el receptor NKp80 ($p=0,040$; $r=0,0536$).

En el análisis de correlación de la granzima B (Fig. 97) en las células NK los resultados mostraron en los controles sanos una relación inversa con el receptor NKp80 ($p=0,040$; $r=0,0536$).

Healthy Donors					
NK cells	CD 16	NKp30+	NKP80	CD 6	CD 244
Perforin	,578	-,591		,771	-,613
Granulysin			-,536		
GZM B			-,536		

AML patients	
NK cells	CD 244
Perforin	-,682
Granulysin	
GZM B	

Figura 97. Análisis de correlaciones de proteínas citotóxicas intracelulares en las células NK. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones significativas entre las proteínas citotóxicas intracelulares analizadas y los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NK de los controles sanos y pacientes de LMA. El mapa esta creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS. Las relaciones positivas aparecen representadas en verde y las relaciones inversas en morado. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación.

En el análisis de correlación de la perforina en las células NKT-like (Fig. 98) los resultados mostraron en los pacientes de LMA una relación positiva con el receptor NKp46 ($p=0,010$; $r=0,624$) y NKG2C ($p=0,013$; $r=0,783$) y una relación inversa con CD244 ($p=0,051$; $r=0,600$).

En el análisis de correlación de granulicina en las células NKT-like (Fig. 98) los resultados mostraron en los controles sanos una relación positiva con DNAM-1 ($p=0,041$; $r=0,532$), PD-1 ($p=0,022$; $r=0,586$), CD85j ($p=0,014$; $r=0,618$) y CD57 ($p=0,007$; $r=0,668$). La relación de granulicina en los pacientes de LMA fue inversa a CD244 ($p=0,016$; $r=0,700$)

En el análisis de correlación de Granzima B en las células NKT-like (Fig. 98) los resultados mostraron en los controles sanos una relación positiva con DNAM-1 ($p=0,048$; $r=0,518$), CD85j ($p=0,001$; $r=0,754$) y KIR ($p=0,031$; $r=0,557$).

En los pacientes de LMA, la expresión de granzima B en las células NKT-like (Fig. 93) se relacionó de manera positiva con NKp46 ($p=0,005$; $r=0,668$) y NKG2C ($p=0,002$; $r=0,867$).

Healthy Donors					
NKT-like	DNAM-1	PD-1	CD85j	KIR	CD57
Perforin					
Granulysin	,532	,586	,618		,668
GZM B	,518		,754	,557	

AML patients			
NKT-like	NKp46	CD 244	NKG2C
Perforin	,624	-,600	,783
Granulysin		-,700	
GZM B	,668	-,400	,867

Figura 98. Análisis de correlaciones de proteínas citotóxicas intracelulares en las células NKT-like. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones significativas entre las proteínas citotóxicas intracelulares analizadas y los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células NKT-like de los controles sanos y pacientes de LMA. El mapa está creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS. Las relaciones positivas aparecen representadas en verde y las relaciones inversas en morado. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación.

En el análisis de correlación de la perforina (Fig. 99) en las células T los resultados no mostraron ninguna relación con la expresión de los receptores de membrana en los controles sanos, mientras que en los pacientes de LMA, se relacionaba de manera positiva con la expresión de CD16 ($p=0,049$; $r=0,471$).

En el análisis de Granulysina (Fig. 99) en las células T de los controles sanos, los resultados mostraron una relación positiva con la expresión de los receptores KIR ($p=0,011$; $r=0,632$) mientras en los pacientes de LMA mostró una relación una relación positiva con la expresión de TIGIT ($p=0,002$, $r=0,801$).

En el análisis de Granzima B (Fig. 99) en las células T de los controles sanos los resultados mostraron una relación positiva con la expresión de CD57 ($p=0,029$, $r=0,582$), KIR ($p=0,029$, $r=0,714$) y CD85j ($p=0,035$; $r=0,565$) y el las células T de los pacientes de LMA el contenido intracelular de Granzima B se relacionaba con TIGIT ($p=0,012$; $r=0,593$).

Healthy Donors			
T cells	CD85j	KIR	CD57
Perforin			
Granulysin		,632	
GZM B	,565	,714	,582

AML patients		
T cells	CD16	TIGIT
Perforin	,471	
Granulysin		,801
GZM B		,593

Figura 99. Análisis de correlaciones de proteínas citotóxicas intracelulares en las células T. La figura representa un mapa de calor (*heatmap*) de las correlaciones significativas entre las proteínas citotóxicas intracelulares analizadas y los distintos receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de las células T de los controles sanos y pacientes de LMA. El mapa esta creado en Excel a partir de los resultados del análisis de correlaciones de Spearman realizado con el programa SPSS. Las relaciones positivas aparecen representadas en verde y las relaciones inversas en morado. En cada cuadro se indica en coeficiente de correlación.

- Análisis de supervivencia: Proteínas citotóxicas intracelulares

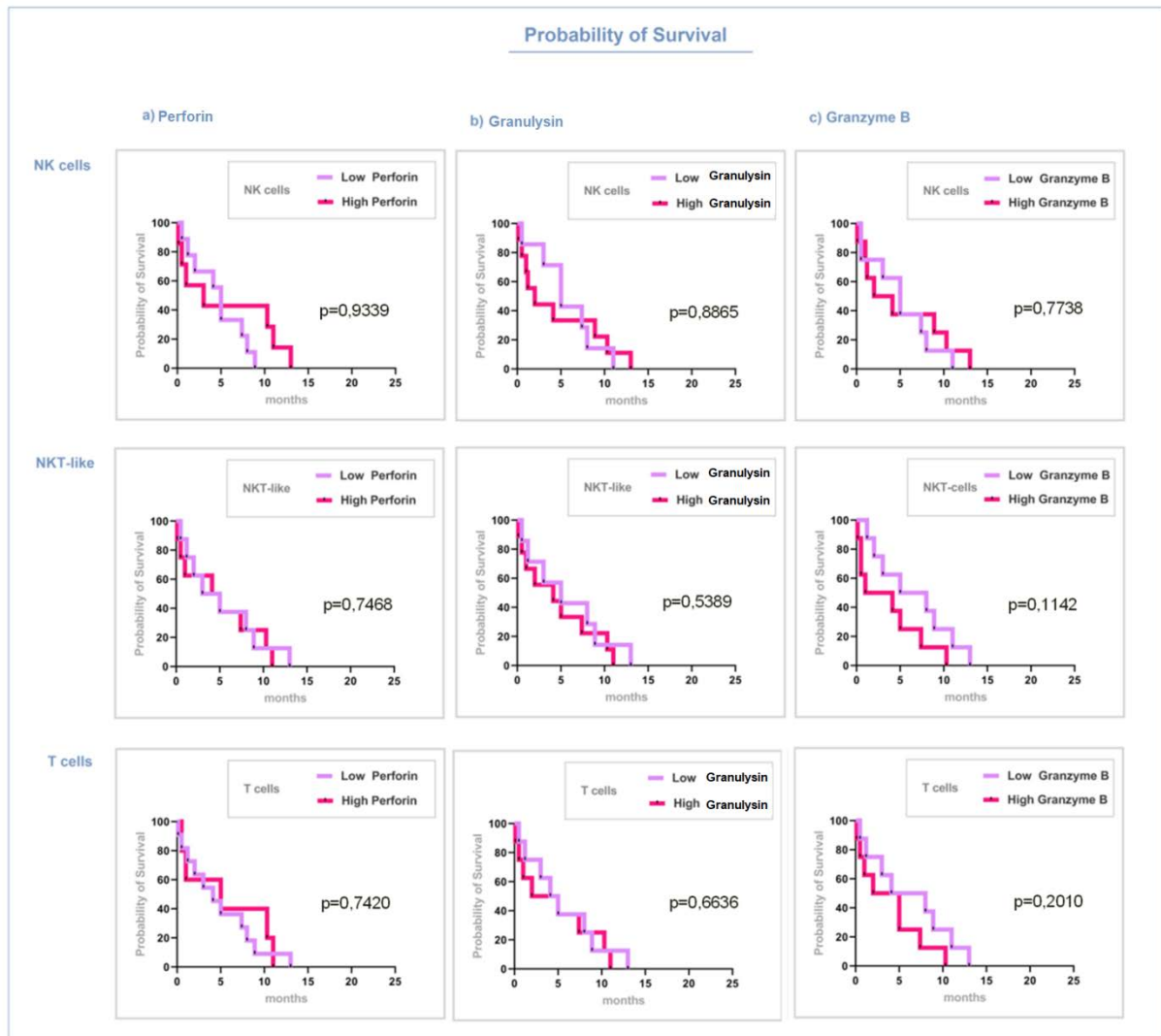


Figura 100: Análisis de Supervivencia en función del contenido intracelular de Perforina, Granulinsina y Granzima B en pacientes de LMA. Los pacientes de LMA (n=18) se estratificaron según la concentración intracelular de Perforina (columna a), Granulinsina (columna b) y Granzima B (columna c). Las líneas rosas corresponden a pacientes con alta concentración para la proteína intracelular indicada y las líneas malvas a baja concentración. Se representan las curvas de supervivencia según la concentración intracelular de proteínas citotóxicas en las células NK, NKT-like y células T.

RESUMEN DE RESULTADOS

Análisis de poblaciones

La población de células NK se encuentra disminuida en los pacientes de LMA.

Fenotipo de linfocitos

La expresión de determinados *checkpoints* aumenta en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA.

- La expresión de NKG2A aumenta en las células NK.
- La expresión de TIGIT aumenta en las células T.
- La coexpresión de TIGIT/TACTILE aumenta en las células NK, NKT-like y en las células T.
- La coexpresión de PD-1/TIM3 aumenta en las células NK y T.

Las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA presentan una expresión disminuida de ciertos receptores activadores.

- La expresión de CD6 se encuentra disminuida en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA.
- La expresión de DNAM-1 se encuentra disminuida en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA.
- La expresión de NKp80 se encuentra disminuida en las células NK, NKT-like CD4+ y TCD4+ de los pacientes de LMA.
- La coexpresión de NKp46/NKp30 disminuye en las células NK.
- La expresión del receptor de citotoxicidad dependiente de anticuerpo CD16 disminuye en las células NK y T de los pacientes de LMA.

Médula ósea

- Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de los receptores PD-1, TIM3 y NKp44 en células NK al comparar la médula ósea con la de sangre periférica de los pacientes de LMA.
- Los resultados mostraron diferencias significativas en la expresión de los receptores PD-1, NKp44 y NKp30 en las células NKT-like al comparar la médula ósea con la sangre periférica de los pacientes de LMA.
- Los resultados también mostraron diferencias significativas al comparar en las células T de la médula ósea y sangre periférica la expresión de los receptores PD-1, NKp30, NKG2D, CD6, CD244 y KIR.

Blastos de LMA

- La expresión de CD155 en la superficie de los blastos de LMA se relaciona de manera inversa con la expresión de DNAM-1 en las células NK, NKT-like y T y de manera positiva con TIGIT y TACTILE en las células NK de los pacientes de LMA.
- La expresión de CD112 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera positiva con la expresión de PD-1 en las células NK, NKT-like y T en los pacientes de LMA.
- La expresión de CD48 en la superficie de los blastos de LMA se relacionó de manera positiva con la expresión de TIM3 en las células NK, con la expresión de TIGIT en las células T y de manera inversa con la expresión de CD6 en las células NKT-like
- Una menor expresión de HLA-I en los blastos de LMA se relacionó con una mayor expresión de NKG2A en las células NKT-like y T en los pacientes de LMA

Proteínas citotóxicas intracelulares

- Las células NK de los pacientes de LMA, presentaban una concentración intracelular menor de Perforina, Granulisina y Granzima B en los pacientes de LMA.
- La concentración intracelular de perforina en las células NK se relacionaba de manera positiva con CD16 y CD6 tan solo en los controles sanos.
- Los valores encontrados de las proteínas citotóxicas intracelulares en las células NKT-like estuvo mucho más próxima a la concentración de dichas proteínas en las células NK que en las células T.
- La concentración intracelular de Granulisina y Granzima B fue menor en las células NKT-like de los pacientes de LMA que en los controles sanos
- La concentración intracelular de perforina en las células NK y NKT-like se relacionaba de manera inversa con la expresión de CD244 en la superficie, además en las células NKT-like ocurría lo mismo con la Granzima B y la Granulisina.

Supervivencia de los pacientes de LMA

- Los pacientes de LMA con los niveles más bajos de coexpresión de TIGIT/TACTILE y PD-1/TIM3 en las células NK y T mostraron una mayor supervivencia
- Los pacientes con menor expresión de CD48 en los blastos de LMA tuvieron una supervivencia mayor.
- El ligando de PD-1, CD274 presenta una expresión débil la superficie de los blastos de LMA, sin embargo, una menor expresión de CD274 se asoció a una supervivencia mayor en los pacientes de LMA.

DISCUSIÓN

La leucemia mieloide aguda es una neoplasia hematológica caracterizada por un mal pronóstico, una alta tasa de recaída y una baja supervivencia. Hasta hace relativamente poco, las opciones terapéuticas para los pacientes de LMA se han basado únicamente en quimioterapia intensiva y el trasplante de células madre hematopoyéticas. A menudo los pacientes en edades avanzadas tratados con dosis altas de quimiotácticos presentan problemas de toxicidad, lo que complica aún más el manejo de esta enfermedad ²⁹². A pesar de los avances en el diseño de nuevas terapias y el gran número de tratamientos aprobados en los últimos 5 años la evolución clínica de los pacientes de LMA sigue siendo mala.

Tanto las células NK como las células T han sido propuestas como células efectoras en la eliminación de los blastos de LMA y candidatas aptas para su uso en tratamientos de inmunoterapia. Las células NK expresan un amplio panel de receptores activadores que interaccionan con sus ligandos expresados en células tumorales ²⁹³. Determinadas situaciones pueden inducir la expresión de receptores característicos de las células NK en las células T ²⁹⁴. El análisis del sistema inmunitario del paciente es crucial para el diseño de terapias eficaces personalizadas dirigidas a reactivarlo. Diversas alteraciones descritas en células NK y T en pacientes de LMA limitan la inmunovigilancia de las células transformadas y diferentes tratamientos han conseguido revertir, al menos en parte, estas alteraciones y mejorar la citotoxicidad del sistema inmunológico contra las células tumorales ^{47,295}.

El bajo recuento de linfocitos en sangre periférica se ha asociado desde 1974 a estadios tumorales avanzados y baja respuesta al tratamiento en pacientes de cáncer ²⁹⁶⁻²⁹⁸. Nuestros resultados mostraron un descenso significativo del porcentaje de linfocitos en la sangre periférica de los pacientes de LMA que podría ser consecuencia de la limitación de la médula ósea para llevar a cabo el proceso normal de hematopoyesis por el alto porcentaje de blastos encontrados ⁴⁹.

El porcentaje de las células inmunitarias puede variar según el tipo de cáncer y tiene efectos sobre la progresión de la enfermedad y el pronóstico de los pacientes ²⁹⁹.

Las células NK tienen un papel crítico en la inmunovigilancia tumoral y un estudio de seguimiento a 11 años demostró que una baja citotoxicidad de la células NK se correlacionaba con un mayor riesgo de padecer cáncer ³⁰⁰. Las células NK son componentes claves del sistema inmunitario para la eliminación de los blastos leucémicos ³⁰¹. La actividad anti-leucémica de las células NK, el reconocimiento de lo no propio y la rápida capacidad para eliminar células transformadas queda demostrada en los trasplantes de células madre alogénicas con incompatibilidad HLA-I/KIR ^{302,303}. Las células NK representan la primera población de linfocitos que se reconstituye después del alotrasplante de células madre de sangre periférica ³⁰⁴ y una pronta recuperación de las células NK se asocia con una supervivencia mayor ³⁰⁵.

Nuestros resultados mostraron un descenso significativo de células NK en la sangre periférica de los pacientes de LMA coincidiendo con otros autores que describieron alteraciones en la proporción de células NK con respecto al total de linfocitos en los pacientes de LMA ³⁰⁶.

Dentro de la población de células NK pueden distinguirse dos poblaciones en función de la expresión del receptor CD56. La población de células NK CD56bright representa un conjunto de células más inmaduras con mayor capacidad de producción de citoquinas y quimioquinas ^{307,308}. El proceso de remodelación del sistema inmunitario asociado a la edad conocido como inmunosenescencia provoca una disminución de células NK CD56bright ^{309,310}. Se han propuesto diferentes hipótesis para explicar el desarrollo y maduración de las células NK. Mientras unos modelos defienden la idea de que las células NK CD56bright son células precursoras de las células CD56dim ³¹¹, otros defienden un modelo no lineal y una alta heterogeneidad en las subpoblaciones observándose cambios en la expresión de algunos receptores asociados a infecciones virales ³¹².

Nuestros resultados mostraron un descenso significativo de células NK CD56bright en la sangre periférica de los pacientes en el momento del diagnóstico de LMA en comparación con los controles sanos, apoyando resultados previos que indicaban que la LMA se asocia a alteraciones en las subpoblaciones de células NK ³¹³.

Junto a estas alteraciones previamente descritas hemos observado también una disminución de células NK CD8+ en los pacientes de LMA que se correlacionaba con la concentración intracelular de Granzima B y Perforina, proteínas citotóxicas que se encuentran descendidas en los pacientes de LMA.

En nuestro estudio, se observa que el porcentaje de células T de sangre periférica de los pacientes de LMA está aumentado en comparación con los controles sanos, coincidiendo con Le Dieu et al.⁷⁰. Las células T CD4+ son claves en el mantenimiento de la homeostasis. La linfopenia de células T CD4+ es frecuente en pacientes con cáncer avanzado y se asocia a una mayor toxicidad después de ser tratados con quimioterapia y a una esperanza de vida muy corta³¹⁴. Aunque los resultados no mostraron alteraciones en el porcentaje de linfocitos T CD4+, sí que detectamos una disminución significativa de la expresión de CD4 en las células NKT-like de los pacientes de LMA. Teniendo en cuenta que la mayoría de las células NKT-like expresan el correceptor CD8, la relevancia del descenso de la población NKT-like CD4+ en los pacientes de LMA requiere más estudios.

Las subpoblaciones de linfocitos T CD8+ se expanden para mejorar la respuesta citotóxica tras el reconocimiento a través del receptor TCR del complejo péptido-HLA-I en las células diana³¹⁵. Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el porcentaje de células T CD8+ en los pacientes de LMA en comparación con los voluntarios sanos. Resultados de otros grupos describieron un incremento de una población de células T CD8+ disfuncional que expresaban diferentes puntos de control inhibitorio (*checkpoints*) y que se correlacionaban con un mal pronóstico en los pacientes de LMA^{316,317}.

La molécula CD57 es un marcador asociado a células maduras³¹⁸. La infección por CMV puede inducir cierta madurez de manera precoz⁸⁵ de tal manera que varios estudios señalan que la infección por HCMV induce la aparición de una población de células NK CD57+ y de células T CD57+ con gran capacidad funcional^{311,312,319}. La infección crónica por HCMV y otras condiciones como la inflamación crónica o la transformación tumoral pueden también inducir fenotipos típicos de agotamiento celular³²⁰.

Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en las poblaciones de células NK CD57+, NKT-like CD57+ y células T CD57+ en los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos, sugiriendo que la LMA no está implicada, o al menos no provoca cambios importantes, en la expresión de CD57 en estas poblaciones linfocitarias.

El receptor CD16, es responsable de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y capacita a las células NK para lisar directamente células infectadas por virus y células tumorales recubiertas de anticuerpos. Se han descrito alteraciones en pacientes de cáncer y pacientes con infección crónica por VIH que implican un descenso de CD16 en la superficie de las células NK ³²¹. Coincidiendo con estos autores, hemos observado en los pacientes de LMA un descenso significativo de CD16 en la superficie de las células NK y de las células T en comparación con los controles sanos. Esta alteración podría suponer una limitación para la eliminación de los blastos a través de la ADCC. Por otro lado, el contenido intracelular de Perforina en los controles sanos se relacionaba de manera positiva con la expresión de CD16 en las células NK, pero no en los pacientes de LMA, apoyando la existencia de un fenotipo alterado en las células NK de los pacientes. El uso de anticuerpos dirigidos a antígenos asociados a tumores que interactúan con CD16, ha mostrado eficacia al mejorar la citotoxicidad de las células NK contra las células tumorales ³²². Del mismo modo, experimentos in vitro utilizando anticuerpos bi-específicos (BiKE), con capacidad de unirse a CD16 en las células NK y al antígeno tumoral CD33 expresado en blastos de LMA han conseguido mejorar la citotoxicidad de las células NK contra la línea celular de LMA HL60 positiva para CD33 ^{322,323}. El descenso de la expresión de CD16 observado en nuestro estudio en los pacientes podría limitar el éxito de estas terapias siendo conveniente el uso de citoquinas que consiguieran aumentar la expresión de CD16 para potenciar el efecto de los anticuerpos, sí bien es cierto que experimentos in vitro con células NK de pacientes con síndromes mielodisplásicos que presentaban un descenso de la expresión de CD16, han mostrado eficacia en el uso de anticuerpos BiKE CD16xCD33 que indujeron una fuerte degranulación y producción de citoquinas por las células NK, sugiriendo que aunque exista una baja expresión de CD16 es posible inducir una señalización a través de este receptor suficiente para mediar funciones efectoras ³²³.

En nuestro estudio hemos encontrado una tendencia no significativa ($p=0,0595$) entre las curvas de supervivencia de los pacientes estratificados según alta y baja expresión de CD16 en la superficie de las células NK, mostrando mejores tasas de supervivencia aquellos pacientes que presentaban alta expresión de CD16 en las células NK. Estos estudios apoyan el papel fundamental de este receptor en las células NK.

Numerosos trabajos ponen de manifiesto la importancia de los receptores de la citotoxicidad natural (NCR) en la capacidad de las células NK para eliminar células transformadas o infectadas por virus y se han descrito alteraciones en la expresión de estos receptores en diversas patologías³²⁴. Aunque inicialmente se pensaba que la expresión de los NCR era exclusiva de las células NK actualmente se sabe que estos receptores pueden estar expresados en otros tipos de células y que la inducción de los NCR en las células T y NKT-like podría estar mediada por citoquinas proinflamatorias³²⁵. Nuestros resultados mostraron que tanto las células T como las células NKT-like expresaban los tres receptores analizados, aunque con porcentajes inferiores a las células NK.

La expresión de NKp46 y NKp30 en la superficie de las células NK se ha correlacionado con su capacidad para lisar células leucémicas y una baja expresión de NCRs (fenotipo NCRdull) se ha asociado con una baja capacidad citotóxica de las células NK contra los blastos de LMA³²⁶ y, por el contrario, el aumento de la expresión de los receptores de citotoxicidad natural se asocia a una mejora en la función de las células NK de pacientes en remisión completa³²⁷. En los pacientes de LMA hemos observado un descenso significativo de la coexpresión de los receptores NKp46 y NKp30 en la superficie de las células NK, coincidiendo con estudios realizados anteriormente en nuestro grupo de investigación y por otros grupos^{155,326,328}. Una alta expresión de NKp46 y NKp30 se ha asociado a un aumento de la actividad antitumoral en las células NK y la mejora de la actividad citotóxica contra los blastos de LMA³²⁹. El descenso observado en la expresión de estos receptores en las células NK podría tener consecuencias sobre el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa al disminuir las interacciones bidireccionales entre las células dendríticas y las células NK a través del receptor NKp30.

Estas interacciones favorecen la maduración de las células dendríticas y la eliminación de células dendríticas inmaduras. En este sentido, alteraciones en la expresión de NKp30 se han relacionado con una respuesta antiviral deficiente en las células T ³³⁰.

La expresión de B7H6 (ligando de NKp30) en la superficie de los blastos de LMA analizados fue muy baja coincidiendo con estudios anteriores que mostraron que los blastos leucémicos de aproximadamente el 80% de los pacientes de LMA expresaban niveles muy bajos de los ligandos de los NCR, probablemente debido al bloqueo de la maduración de los blastos ya que estos ligandos se expresan tras la maduración de células mielomonocíticas ³³¹.

El tercer receptor NCR analizado fue NKp44, un receptor que se induce tras la activación, que no presentó diferencias al comparar los pacientes de LMA con los controles sanos. La expresión de una de las isoformas de NKp44 que porta ITIM se ha asociado con una supervivencia deficiente en pacientes de leucemia mieloide aguda¹⁰³. En la serie de pacientes estudiados, el análisis de supervivencia no mostró diferencias significativas entre pacientes con alta o baja expresión de NKp44 en las tres poblaciones linfocitarias analizadas. Hay que tener en cuenta que, en nuestro caso, no hemos realizado el estudio y estratificación en función de las isoformas de NKp44 expresadas por los pacientes de LMA.

El estudio longitudinal con pacientes de LMA llevado a cabo por Fauriat et al.³²⁹ mostró que el desarrollo de la leucemia inducía un descenso de la expresión de NKp46 y NKp30 y que los pacientes que lograban una remisión completa reversionaban la expresión completa de NKp46 y parcial de NKp30. Los pacientes de LMA con alta expresión de NKp46 en las células NK mostraron una supervivencia más alta frente a los que presentaban baja expresión de este receptor ³²⁷. Nuestros resultados mostraron diferencias significativas entre las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA estratificados según la expresión de NKp46 en las células NKT-like, siendo mayor la supervivencia en aquellos pacientes con alto porcentaje de células NKT-like NKp46+. En pacientes mayores, una alta expresión de NKp30 o NKp46 en las células NK antes y durante los tratamientos de inmunoterapia predijo una mejor supervivencia general libre de recaída de la leucemia ³³².

El cultivo in vivo con IL-15 consiguió aumentar la expresión de NKp30 y recuperar, al menos parcialmente, la función de las células NK en pacientes ancianos con LMA ³²⁹.

NKp80, es el receptor de la lectina tipo C inducida por la activación (AICL), ambos, receptor y ligando se expresan en las células hematopoyéticas ¹⁰⁹. En el presente estudio, tanto las células NK como las células T CD4+ y NKT-like CD4+ de los pacientes de LMA mostraron una expresión reducida del receptor NKp80 en comparación con los controles sanos. En las células NK la unión de NKp80 a su ligando induce degranulación y lisis de las células diana ³³³. En las células T la expresión de NKp80 junto a otros receptores representa un subconjunto de linfocitos con alta capacidad de degranulación y secreción de citoquinas ¹¹⁵. Tanto en las células NK como en las células T, la interacción NKp80-AICL estimula la lisis de las células mieloides malignas y promueve la liberación de las citoquinas proinflamatorias IFN- γ y TNF ¹¹¹. Además, la interacción de NKp80 expresado en las células NK con AICL expresado en los monocitos promueve la liberación de citoquinas por ambas células y un estado inflamatorio ¹⁰⁹. Cuando las células NK están en reposo retienen las glicoproteínas de AICL a nivel intracelular, la exposición a citoquinas inflamatorias, la unión de NKp80-AICL y procesos de glicosilación inducen su expresión en la superficie. La expresión del ligando AICL en la superficie de las células NK regula negativamente la expresión de NKp80 y además las células NK que expresan AICL se vuelven susceptibles a la lisis mediada por NKp80 expresado en otras células ³³⁴.

El uso de proteínas de fusión que contienen un fragmento variable monocatenario (scFv) con especificidad frente a HER2 unido al dominio extracelular de AICL (AICL:HER2-scFv) o de B7-H6 (B7-H6:HER2-scFv) ha demostrado eficacia para desencadenar la lisis mediada por células NK frente a células de cáncer de mama HER2+ y mejorar la citotoxicidad celular mediada por los anticuerpos terapéuticos trastuzumab (anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2, anti-HER2) y cetuximab (anti-receptor del factor de crecimiento epidérmico, anti-EGFR) ³³⁵.

Las células leucémicas a menudo expresan AICL, y el uso de la proteína de fusión NKp80-Fc ha demostrado eficacia al aumentar significativamente la conjugación de células NK con las células leucémicas AICL+, promoviendo la degranulación de las células NK y la apoptosis de las células de leucemia ³³⁶. En este sentido, la disminución de la expresión de AICL ha sido descrita como un mecanismo de escape del virus asociado al sarcoma de Kaposi ³³⁷.

Experimentos diseñados para bloquear la interacción entre NKp80 y AICL mediante mAb anti-NKp80, NKp80 soluble o mAb anti-AICL (7F12 correspondiente a la patente EP2064245B1 de Steinle & Welte, Innate Pharma SAS, Università degli Studi di Genova) han confirmado el papel de NKp80 en la lisis de células mieloides malignas que expresan AICL y en la producción de citoquinas por las células NK.

Teniendo en cuenta los conocimientos actuales sobre NKp80, el descenso significativo de NKp80 en las células NK y T que hemos observado en los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos contribuiría al deterioro de la respuesta inmunitaria contra las células leucémicas en los pacientes de LMA.

NKG2D es un receptor estimulador de la actividad lítica en células NK y células T ^{338,339}. Reconoce moléculas que se sobreexpresan con frecuencia en diferentes tipos de tumores incluidas neoplasias hematológicas. Los ligandos de NKG2D, MICA/B se sobreexpresan en condiciones anormales de stress celular ^{328,340}. En nuestra serie de pacientes de LMA hemos observado una alta expresión de MICA/B en los blastos leucémicos y su expresión ha mostrado una fuerte relación positiva con el porcentaje de blastos de LMA.

Coincidiendo con resultados anteriores de nuestro grupo de investigación ³²⁸, la expresión de NKG2D no se reduce en los pacientes con LMA, sugiriendo que este receptor es un buen candidato para el diseño de estrategias de inmunoterapia. No podemos descartar que en nuestros pacientes la lisis mediada por NKG2D esté inhibida por moléculas de MICA solubles capaces de bloquear el sitio de unión al receptor evitando así el reconocimiento de las células tumorales.

La liberación de formas solubles de los ligandos de NKG2D es frecuente tanto en tumores hematológicos como en tumores sólidos ^{341,342}. Opciones terapéuticas destinadas a bloquear las moléculas solubles de NKG2D podrían representar una buena opción terapéutica en los pacientes de LMA.

La molécula coestimuladora CD6, es una proteína transmembrana implicada en la activación, proliferación y diferenciación celular ^{135,132}. La activación de las células T a través de su TCR puede conducir a una disminución de la expresión de CD6 y tanto esta alteración como el aumento de CD6 soluble se ha asociado a pérdida de actividad y/o capacidad proliferativa ¹³¹. Se ha descrito que los pacientes de LMA que lograron una remisión completa después de la terapia de inducción mostraron una mayor expresión de CD6 en la superficie de las células T comparado con aquellos que no lograron una remisión de la enfermedad ³⁴³. La estimulación conjunta de CD6 y CD3 mostró niveles de actividad similares a la coestimulación con CD28 ¹³³, apoyando el papel coestimulador de CD6.

Nuestros resultados mostraron un descenso significativo de la expresión de CD6 en la superficie de las células T y NKT-like de los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos. Este descenso se observó también en las células NK de los pacientes de LMA coincidiendo con resultados anteriores del grupo ³²⁸. Además, la expresión de CD6 en la superficie de las células NK se correlacionaba de manera positiva con la concentración intracelular de las proteínas citotóxicas Perforina y Granzima B que también disminuían de manera significativa en los pacientes de LMA. Es necesario profundizar en el estudio de CD6 y su relevancia en la inmunovigilancia tumoral en los pacientes de LMA y la posibilidad de modular su expresión mediante citoquinas como sucede con otros receptores.

La molécula de adhesión celular de leucocitos activados (ALCAM/CD166) es el ligando de CD6 que se encuentra expresado en las células dendríticas. Las células T establecen interacciones bidireccionales con las células dendríticas mediadas por CD6 y CD166.

En modelos in vitro el uso de líneas celulares mieloides, principalmente monocitos y macrófagos, modificadas genéticamente para que no expresen CD166 e infectadas con VIH, se ha demostrado que la ausencia de CD166 inhibe la adhesión y migración de estas células infectadas ³⁴⁴ apoyando el papel de CD166 en la adhesión celular. CD166 se expresa en células mieloides y un anticuerpo monoclonal humano dirigido a CD166 conjugado con un derivado de la duocarmicina como agente citotóxico ha sido eficaz en la eliminación in vitro de blastos de LMA ³⁴⁵. Nuestros resultados mostraron una baja expresión de este ligando en los blastos de LMA lo que limitaría la función de la interacción CD6-CD166 en el control de la progresión de la enfermedad.

El receptor CD244 es una proteína transmembrana de la familia SLAM descrita inicialmente como un receptor que induce citotoxicidad y liberación de citoquinas. Dependiendo de la proteína adaptadora a la que se asocie este receptor puede también transmitir señales inhibitorias, así CD244 en ausencia de adaptadores SAP es capaz de inhibir la citotoxicidad mediada por los receptores activadores CD16 y NKG2D ³⁴⁶. Nuestros resultados mostraron tanto en los pacientes de LMA como en los controles sanos una relación inversa significativa entre la expresión de CD244 y el contenido intracelular de Perforina en las células NK. En las células NKT-like de los pacientes de LMA la expresión de CD244 se relacionaba de manera inversa con el contenido intracelular de Perforina, Granulisina y Granzima B. Estudios in vivo han mostrado una mayor eficacia de las células NK en la eliminación de células tumorales CD48+ cuando eran deficientes en CD244 y se ha asociado la expresión de CD244 en las células NK con fenotipos exhaustos en infecciones crónicas y cáncer. Se ha sugerido que la terapia anti-CD244 podría ser beneficiosa según muestran los resultados del bloqueo de CD244, que inhiben la proliferación en las líneas celulares de leucemia humana sin afectar a las células madre hematopoyéticas sanas ^{146,148}.

Asimismo, se ha descrito que CD244 unido a la proteína adaptadora EAT-2 puede reclutar la fosfolipasa C- γ 1 y competir con CD2 por el ligando CD48 y de esta manera inhibir la activación celular tanto de las células T como de las células NK ³⁴⁷. La forma soluble de CD48 ha mostrado mayor afinidad por CD244 que por CD2 ¹³⁶. En las células NK se ha demostrado que CD244 es capaz de unirse en cis a CD48 expresado en la misma célula NK limitando así la unión y lisis de las células diana CD48+ ¹⁴⁸. Experimentos de cocultivo han mostrado un descenso de la actividad de las células NK tras la interacción con células diana que presentaban una alta expresión de CD48 ³⁴⁸. Las curvas de supervivencia de los pacientes de LMA estratificados según la expresión de CD48 en los blastos en el presente estudio, han permitido detectar diferencias significativas siendo los pacientes con bajo porcentaje de CD48 en los blastos los que presentaban una supervivencia mayor, que podría justificarse por la función inhibidora de CD244 previamente descrita o por asociarse la expresión de CD48 a estadios más avanzados de la enfermedad o tipos de leucemia con menor supervivencia.

Las células NK humanas reconocen las moléculas de HLA-I expresadas por las células sanas, a través de los receptores KIR expresados en su superficie. Los receptores KIR cuando se unen a las moléculas de HLA-I fosforilan los motivos ITIM y reclutan SHP-1 paralizando la señal de activación y evitando el ataque de lo propio. De manera contraria, las células NK son capaces de eliminar las células transformadas que han perdido la expresión de estas moléculas ⁷⁶. A diferencia de los pacientes con tumores sólidos, los pacientes de LMA suelen conservar una alta expresión de HLA-I en la superficie de los blastos pudiendo evitar así la lisis mediada por las células NK ³⁴⁹. En nuestros análisis hemos observado que la expresión de los receptores KIR2D en las células NK, NKT-like y T de los pacientes de LMA no se diferencia de la de los controles sanos y además que todos los pacientes de LMA presentaban una alta expresión de HLA-I en sus blastos. Los ensayos clínicos con el anticuerpo anti-KIR (IPH2101) en pacientes con Mieloma Múltiple en recaída/refractario o latente demostraron seguridad y tolerabilidad pero no un beneficio terapéutico ³⁵⁰.

La transferencia adoptiva de células NK alogénicas como tratamiento de neoplasias malignas hematológicas ha demostrado no solo seguridad sino eficacia gracias a la alorreactividad de las células NK en condiciones de incompatibilidad del receptores KIR con los ligandos de HLA en células cancerosas ³⁵¹.

Otro de los receptores analizados capaz de reconocer moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad es CD85j que se expresa principalmente en células de la estirpe mieloide (monocitos, macrófagos y células dendríticas) pero también en la linfoide (células B, NK y T) ¹⁶². Nuestros resultados mostraron un descenso significativo de CD85j en las células T CD8+ y NKT-like CD8+. Gustafson et al. ¹⁶⁵ demostraron que la expresión de CD85j caracteriza una población de células T CD8 efectoras terminalmente diferenciadas (TEMRA) "senescentes" pero no agotadas. CD85j actúa como un regulador de la expansión de células T específicas de virus (principalmente CMV) durante el envejecimiento ¹⁶⁵.

La molécula no clásica HLA-G, que se expresa en muy pocos tejidos sanos pero en algunos tumores, al unirse a CD85j induce la secreción de IL-6, IL-10, TNF α , VEGF, e IL-10 promoviendo un microambiente que favorece el crecimiento tumoral ^{163,352}. Sería interesante el estudio de CD85j en los blastos de LMA. En un modelo experimental murino el bloqueo de PIRB (del inglés *paired immunoglobulin-like receptor*), el homólogo del receptor CD85j humano, consiguió frenar el desarrollo de los blastos de LMA sin verse afectado el proceso normal de hematopoyesis ³⁵³.

Destacan también entre los receptores específicos de las moléculas de HLA-I, los receptores NKG2A y NKG2C que reconocen la molécula HLA-I no clásica HLA-E, que se expresa en casi la totalidad de células mononucleares de sangre periférica. NKG2C transmite señales activadoras mientras que la interacción de HLA-E con NKG2A lleva al reclutamiento de SHP-1 e inhibición de la lisis de la célula diana ³⁵⁴. En nuestro estudio, no hemos observado diferencias significativas en la expresión de NKG2C en los pacientes de LMA. Se ha propuesto que la estimulación continua de las células NK CD57+ a través de NKG2C induce la expresión de los receptores inhibidores LAG3 y PD-1 dando lugar a células NK exhaustas con baja capacidad de respuesta ³⁵⁵.

NKG2A es uno de los principales puntos de control inhibitorio identificados en las células NK y nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de NKG2A en la superficie de las células NK. Además, la expresión de HLA-I en los blastos de LMA mostró en el presente estudio una correlación inversa con la expresión del receptor NKG2A en las células NKT-like y T de los pacientes de LMA. El aumento de expresión de NKG2A en las células NK de los pacientes de LMA, se ha relacionado con una baja actividad citotóxica ³⁵⁶. Del mismo modo, en pacientes con cáncer de hígado la alta expresión de NKG2A contribuyó al agotamiento de las células NK y a un mal pronóstico ³⁵⁷. El anticuerpo monoclonal humanizado dirigido al bloqueo de NKG2A ha demostrado reactivar la citotoxicidad en las células NK y está siendo usado en neoplasias hematológicas ³⁵⁸.

Uno de los nuevos candidatos como *checkpoint* es el receptor inhibitorio TIGIT, que se expresa entre otras células inmunitarias, en las células NK y T. TIGIT comparte ligandos con el receptor activador DNAM-1 desencadenando funciones opuestas ^{359,360}.

DNAM-1 es un receptor activador/coestimulador implicado en la inmunidad antitumoral por su capacidad de reconocer directamente las células malignas, participa tanto en mecanismos de adhesión celular como en la sinapsis inmunitaria. La unión de DNAM-1 con su ligando provoca una cascada de señalización que media actividad citotóxica, producción de citoquinas y señales de proliferación, diferenciación y supervivencia ^{174,175}. Los pacientes de LMA analizados mostraron un descenso de DNAM-1 en las células NK, NKT-like y T. Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con publicaciones anteriores ^{175,361} que muestran que DNAM-1 se expresa en la mayoría de las células NK y células T y confirman resultados anteriores del grupo que describían un descenso en la expresión de DNAM-1 en las células NK de pacientes de LMA en comparación con los donantes sanos ^{328,362}. Una baja expresión de DNAM-1 en las células NK se ha relacionado con una baja citotoxicidad en pacientes diagnosticados con linfoma de Hodgkin y linfoma difuso de células B ³⁶³. El papel de DNAM-1 en el reconocimiento y la lisis de blastos leucémicos de LMA ha sido demostrado en varios modelos que apoyan la hipótesis de que la baja expresión de DNAM-1 en células NK de pacientes de LMA contribuye al deterioro de la capacidad citotóxica observado en las células NK de estos pacientes.

Las células NKT-like de los pacientes de LMA, también presentaron una expresión reducida de DNAM-1. Una baja expresión de DNAM-1 en las células NKT-like infiltrantes de tumor en pacientes con cáncer gástrico se ha asociado a una supervivencia deficiente ³⁶⁴.

Igualmente coincidiendo con hallazgos previos ³¹⁶ los resultados mostraron una baja expresión de DNAM-1 en las células T y T CD8+ de los pacientes de LMA. Además, hemos observado una mayor expresión del receptor inhibitor TIGIT en las células T de los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos. La expresión de TIGIT se ha asociado con una mala evolución clínica en pacientes con LMA y las células T CD8+ TIGIT+ representan células exhaustas con baja producción de citoquinas que contribuyen al deterioro funcional de las células T observado en pacientes de LMA ³⁶⁵. La eliminación de TIGIT en estas células mediante silenciamiento génico mejora la producción de citoquinas lo que apoya el papel de TIGIT en la supresión de las respuestas antitumorales de las células T ³⁶⁵.

TACTILE (CD96) ha sido otro receptor analizado del eje de receptores de moléculas de nectinas, comparte el ligando CD155 con DNAM-1 y TIGIT, tiene la peculiaridad de poseer motivos tanto inhibidores como activadores y su función se asocia mayoritariamente a adhesión y a migración celular ¹⁸⁶. En el presente estudio observamos que aproximadamente la mitad de las células NK, NKT-like y T expresan TACTILE.

Para comprender mejor los mecanismos implicados en el escape de las células leucémicas a la acción de las células efectoras inmunitarias, analizamos la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NK, NKT-like y células T en pacientes de LMA en comparación con controles sanos. Hemos observado un aumento de células NK y T con un fenotipo DNAM-1-TIGIT+TACTILE+. Nuestros resultados, que muestran una reducción significativa de DNAM-1 y una mayor coexpresión de TIGIT y TACTILE en pacientes con LMA, sugieren que estas alteraciones pueden estar, al menos en parte, implicadas en la disminución de las funciones efectoras de las células citotóxicas descritas previamente en estos pacientes

³²⁹.

La expansión de células T DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ se asocia con una supervivencia más baja en los pacientes de LMA analizados. En las células NK, altos porcentajes de células DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ también mostraron una tendencia a asociarse con una supervivencia reducida. Una alta expresión de TIGIT en la médula ósea de pacientes de LMA después de un trasplante de células madre alogénicas se ha asociado con una menor supervivencia general y supervivencia libre de progresión ³⁶⁶. La sobreexpresión de TACTILE en las células NK de pacientes con carcinoma hepatocelular se ha asociado a un fenotipo de agotamiento ³⁶⁷. El bloqueo de TACTILE solo o en combinación con anti-TIGIT en células T CD8+ infiltrantes de tumores de ratón y humanos mejora la función de las células T CD8+ apoyando el papel de este receptor como *checkpoint* ³⁶⁸.

Nuestros resultados apoyan la hipótesis de que la expansión de las células DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ en linfocitos T y NK, contribuye a la disminución del reconocimiento y lisis de los blastos de LMA y se asocia a una menor supervivencia del paciente ³⁶⁹.

Analizamos la expresión de dos moléculas de lectina en la superficie de los blastos de LMA. CD155, ligando de DNAM-1, TIGIT y TACTILE ³⁷⁰ y CD112, ligando de DNAM-1 y TIGIT. Ambas moléculas (CD112 y CD155) aparecen a menudo expresadas en diferentes tipos de células cancerosas, incluidos los blastos de leucemia mieloide ^{173,360,371}.

Se ha demostrado la importancia de la unión de DNAM-1 a CD155 en las primeras fases de la eliminación de los blastos por las células NK ³⁷² y la exposición crónica de DNAM-1 a sus ligandos ha sido propuesto como un mecanismo de regulación negativa de la expresión del receptor ³⁷³. Experimentos in vitro demuestran un descenso de DNAM-1 tras el contacto con blastos leucémicos con expresión de las moléculas CD112 y CD155 ^{328,362}. Nuestros resultados mostraron una relación negativa entre la expresión de CD155 en los blastos de LMA y la expresión de DNAM-1 en la superficie de las células NK, NKT-like y T, coincidiendo con autores anteriores que describieron una correlación negativa entre la expresión de CD112 y CD155 en los blastos leucémicos y la expresión de DNAM-1 en las células NK ^{328,362} y células T ^{316,365} de los pacientes con LMA.

Además, hemos observado una correlación positiva de la expresión de CD155 en los blastos de LMA con la expresión de TIGIT en las células NK. Experimentos in vitro han demostrado que la molécula CD155 soluble de origen humano, se une con mayor afinidad a DNAM-1 que a TIGIT y TACTILE, afectando a la degranulación de las células NK al bloquear la señalización mediada por DNAM-1 ³⁷⁴, lo que sugiere que TIGIT podría contribuir a la disfunción de las células NK y T interrumpiendo la homodimerización de DNAM-1 debido a una mayor afinidad por el ligando CD155 ³⁷⁵.

Por último, nuestros resultados también mostraron una correlación positiva de la expresión de CD155 en los blastos de LMA con la expresión de TACTILE en las células NK. Sin embargo, estudios con la línea celular NK92 mostraron una disminución de la expresión de TACTILE tras el cocultivo con la línea celular Daudi transfectada con CD155 ¹⁸⁷.

Consideramos según los resultados obtenidos que tanto el bloqueo de TIGIT/TACTILE como el de CD155 podría suponer un beneficio en la respuesta citotóxica contra los blastos de LMA. El anticuerpo dirigido al bloqueo de TACTILE se encuentra aún en fase preclínica ³⁵⁸. Es importante destacar que TACTILE es un marcador de células leucémicas que podría estar implicado en determinadas funciones biológicas ¹⁸⁹, por lo que anticuerpos dirigidos a su bloqueo podría frenar el desarrollo de la progresión de la enfermedad. Consideramos necesaria una mejor caracterización de la función de TACTILE en el reconocimiento y lisis de células diana para el diseño de nuevos protocolos de inmunoterapia basados en este receptor.

Si bien en general los tratamientos de inmunoterapia en los últimos años se han centrado en gran medida en el uso de anticuerpos monoclonales dirigidos a puntos de control inhibitorio, sin duda el uso de anticuerpos anti-PD-1 ha supuesto uno de los principales avances en la inmunoterapia contra el cáncer de los últimos años ³⁷⁶. Otros *checkpoints* como LAG3 y TIM3, han demostrado una gran sinergia con PD-1 inhibiendo el sistema inmunitario.

En el presente estudio la expresión de LAG3 y TIM3 ha sido más elevada que la de PD-1 en las poblaciones linfocitarias analizadas. LAG-3 es una molécula reguladora de la homeostasis de las células T. En las células T CD4+ la unión de LAG-3 a su ligando MHC-II inhibe la producción de citoquinas y modula negativamente la expansión de esta población celular ²³¹. LAG3 promueve la diferenciación de las células T hacia un fenotipo regulador. En este sentido, las células Treg activadas expresan LAG-3 que mejora su función supresora ²³⁵. La escisión de LAG-3 y liberación de LAG-3 soluble (sLAG-3) aumenta después de la activación de las células T in vitro e in vivo ²³⁰. LAG3 soluble ha sido propuesto como un marcador serológico de la respuesta Th1 ya que la mayoría de los clones de linfocitos T CD4+ activados con perfiles Th1 o Th0 expresaron LAG-3 y liberaban LAG-3 soluble que se correlacionaba con la producción de IFN- γ ³⁷⁷. En las células T CD8+ la expresión de LAG-3 se induce en respuesta al estímulo antigénico y la expresión de LAG-3 durante infecciones víricas agudas y crónicas se ha correlacionado con una tasa de división celular reducida ³⁷⁸. La mayor parte de LAG-3 se encuentra retenido en los compartimentos intracelulares y se transloca después de la estimulación. Sin estimulación la mayoría de LAG-3 se degrada en los compartimentos lisosomales ²²⁸. La estimulación de las células NKT restringidas por CD1d puede también inducir la expresión ectópica de LAG-3 ³⁷⁹.

En las células NK humanas, el bloqueo de LAG-3 con anticuerpos monoclonales no ha mostrado ningún efecto sobre la citotoxicidad de las células NK ³⁸⁰. Sin embargo, en ratones con una mutación que impide la expresión de LAG3, las células NK mostraron un defecto en la citotoxicidad frente a algunas células tumorales sugiriendo que en este modelo murino LAG3 estaría actuando como correceptor activador ³⁸¹.

En células de melanoma que expresan MHC-II se ha descrito que la interacción con LAG-3 las protege de la apoptosis inducida por fármacos o mediada por FAS estando implicadas las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT ³⁸². Estos resultados sugieren que la interacción LAG-3 con MHC-II puede ejercer una función bidireccional inhibiendo a las células T del sistema inmunitario y por otro lado protegiendo a las células tumorales MHC-II+ de la apoptosis.

Las células dendríticas plasmocitoides activadas producen aproximadamente 5 veces más sLAG-3 que las células T activadas ²³¹. LAG-3 ha sido propuesto como adyuvante por su capacidad para estimular las células presentadoras de antígenos vía MHC-II. En un modelo murino, la administración conjunta de LAG-3 soluble y células tumorales o el uso de células tumorales transfectadas con LAG-3 humano resultó en la reducción parcial o total del crecimiento del tumor. Los ratones fueron resistentes a una segunda exposición a las células tumorales estando implicadas las células T CD8+ específicas del tumor en dicha protección ³⁸³.

En los ratones con cáncer gástrico se observaron bajos niveles de sLAG-3 en sangre periférica y su expresión se correlacionó positivamente con la expresión de IL-12 e IFN- γ . La presencia de una concentración alta de sLAG-3 se relacionó con un mejor pronóstico y mayor supervivencia general. Los estudios in vivo en un modelo murino indicaron que sLAG3 inhibe el crecimiento tumoral y promueve la secreción de IL-12 e IFN- γ por los linfocitos T CD8+, apoyando los resultados obtenidos en los pacientes ³⁸⁴.

En nuestro estudio, el porcentaje de células NK, NKT-like y T positivas para LAG3 fue similar en las tres poblaciones analizadas observando un descenso en su expresión no significativo en las tres poblaciones de linfocitos en los pacientes de LMA en comparación con los controles sanos. El análisis de la expresión de L-SECTIN, otro de los ligandos conocidos de LAG-3, ha mostrado una alta expresión de esta molécula en los blastos de LMA. Se ha propuesto que L-SECTIN actúa limitando la actividad de las células T en las enfermedades infecciosas y la expresión de L-SECTIN en células tumorales promueve el crecimiento tumoral al inhibir la proliferación de las células T específicas de tumor ³⁸⁵.

Otro de los receptores estudiados ha sido TIM3 que fue inicialmente descrito como una molécula reguladora de la inmunidad y tolerancia en células T CD4+ activadas. En estudios in vitro, la estimulación a través de CD3 y CD28 aumentó tanto el nivel de expresión como el número de células T TIM-3+, y se ha demostrado que TIM3 regula negativamente la secreción de IFN- γ y citoquinas tipo Th1 y Th17, representando por lo tanto un mecanismo de regulación de la producción de citoquinas tras la activación de las células T ³⁸⁶. Se ha sugerido que TIM3 puede contribuir al agotamiento de las células T ³⁸⁷. Leitner et al. ²¹¹ observaron que TIM3 se expresaba en un porcentaje menor de células y en niveles mucho más bajos en individuos infectados con VIH-1. Además, observaron que el bloqueo in vitro de TIM3 no aumentaba la respuesta de las células T específicas del VIH-1. Estos autores no mostraron evidencias de la interacción de TIM3 con Gal-9 y sugieren que no participa en el control de la activación de las células T humanas. Sin embargo, no se puede excluir que otros ligandos de TIM3 sean capaces de inducir señales inhibitorias en los linfocitos T humanos.

Se ha observado que las células NK maduras CD56dim CD16+ con alta expresión de TIM3 tienen capacidad de producir citoquinas y mantienen su capacidad citotóxica. Sin embargo, la señalización a través de TIM3 mediante anticuerpos agonistas suprime la citotoxicidad mediada por las células NK. Estos resultados sugieren que la unión de TIM3 a sus ligandos expresados en células diana podría regular negativamente la citotoxicidad ³⁸⁸. La alta expresión de TIM3 en las células NK durante la gestación conduce al establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunitaria materno-fetal apoyando el papel inmunorregulador de TIM3 en estas células ³⁸⁹. TIM3 puede actuar como marcador de maduración de células NK pero su expresión desregulada puede comprometer la función de las células NK ²⁰⁶. En pacientes con adenocarcinoma de pulmón la sobreexpresión de TIM3 en células NK ha sido correlacionado con estadios más avanzados de la enfermedad y metástasis ³⁹⁰.

En contraposición, los resultados de otras publicaciones sugieren que en las células NK humanas, TIM3 puede funcionar como un correceptor que aumenta la producción de IFN- γ en respuesta a los blastos de LMA Gal-9+. Sin embargo, en este modelo la exposición a células diana Gal-9+ no tuvo efecto sobre la degranulación de las células NK ³⁹¹.

Al analizar la expresión de TIM3, hemos observado que las células NK presentaban una expresión mayor de TIM3 tanto en los controles sanos como en los pacientes de LMA en comparación con las poblaciones de células NKT-like y células T. Los resultados mostraron una disminución significativa de células T positivas para TIM3 en los pacientes de LMA. En el análisis de coexpresiones tanto las células T TIM3+LAG3+ como las células NKT-like TIM3+LAG3+ disminuían de manera significativa en los pacientes de LMA.

En células inmunitarias innatas, TIM3 contribuye a la homeostasis inmunitaria regulando la activación de estas células innatas e indirectamente la activación de la respuesta inmunitaria adaptativa. En macrófagos la expresión de TIM3 aumenta tras la activación, siendo considerado como un marcador de activación y un supresor de su actividad. En los monocitos TIM3 se expresa de manera constitutiva y disminuye tras la estimulación a través de algunos TLR, favoreciendo la producción de IL-12. Sin embargo, la expresión desregulada de TIM3 en las células inmunitarias innatas puede afectar la progresión de enfermedades infecciosas y el cáncer ²⁰⁶. En otros modelos experimentales, se ha descrito que TIM3 expresado en monocitos y macrófagos promueve la fagocitosis de células apoptóticas a través de la interacción con fosfatidilserina favoreciendo la presentación cruzada de antígenos procedentes de esas células apoptóticas y el inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa ²²¹.

Gal-9 se expresa en macrófagos infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y cuando se une a TIM3 expresado en células Th1 induce la apoptosis de los macrófagos infectados limitando el crecimiento bacteriano intracelular ³⁹². En células dendríticas, TIM3 puede actuar como un regulador de la inmunidad antitumoral inhibiendo la eficacia antitumoral de la quimioterapia al unirse a HMGB1, una proteína asociada al daño tisular ²²¹. En las células NK de los pacientes de LMA, la unión de TIM3 a Gal-9 expresada en los blastos estimula la producción de IFN- γ que a su vez induce la expresión de indolamina-2,3-dioxigenasa 1 (IDO1) en los blastos de LMA. IDO1 regula negativamente la degranulación de las células NK y favorece el escape de la leucemia ²⁷¹.

La glicoproteína CEACAM-1 es una molécula de adhesión que confiere una señal de supervivencia dependiente de fosfatidilinositol 3-quinasa al controlar las vías ERK/MEK y PI3K/Akt. CEACAM-1 actúa regulando la supervivencia celular, diferenciación y crecimiento de las células mononucleares de sangre periférica humana ³⁹³. Sin embargo, en modelos in vitro, la sobreexpresión de CEACAM-1 en líneas celulares de mieloma múltiple redujo significativamente la proliferación, la invasión y migración celular. Además, la expresión de CEACAM-1 fue más frecuente en pacientes en estadio I que en aquellos con estadio II o III relacionándose su expresión con el avance de la enfermedad ³⁹⁴. En pacientes de LMA se observó un aumento de CEACAM-1 soluble al compararlo con el suero de controles sanos que se correlacionó con un peor pronóstico³⁹⁵. A la molécula CEACAM-1 se le ha adjudicado un papel fundamental para establecer sinapsis inmunológicas eficientes para la activación de las células T CD8+ frente a la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV). En este modelo murino, el bloqueo de CEACAM-1 previno el agotamiento de las células T CD8+ y mejoró el control de la infección viral in vivo ²¹⁸. En nuestro estudio, CEACAM-1, se encontraba expresado en casi la mitad de los blastos de los pacientes analizados.

Finalizamos con el checkpoint más ampliamente estudiado y usado hasta el momento para el tratamiento de pacientes con cáncer, PD-1. Es una proteína que inhibe la activación celular, en la cola citoplasmática posee dos motivos estructurales basados en tirosina, ITIM e ITSM, este último está implicado en la inhibición mediada por este receptor al reclutar SHP-2 ³⁹⁶.

Las infecciones virales crónicas pueden inducir la sobreexpresión de PD-1 ³⁹⁷ y los niveles de señales inhibitorias a través de PD-1 determinan posteriormente el alcance de las respuestas inmunitarias en los sitios de inflamación ¹⁹⁵. La unión de PD-1 a sus ligandos inhibe la respuesta de las células T, la señalización a través del TCR, la secreción de citoquinas y la proliferación ¹⁹⁵. En los análisis de coexpresión las células T PD1+ aumentaron en los pacientes de LMA y mayores porcentajes se correlacionaron con peores tasas de supervivencia.

En el análisis comparativo entre la médula ósea y la sangre periférica de los pacientes de LMA, PD-1 fue el único receptor que muestra diferencias significativas en las tres poblaciones de linfocitos. El número de pacientes analizados en nuestro estudio con muestras pareadas de médula ósea y sangre periférica es pequeño y serán necesarios más estudios comparativos para confirmar los resultados obtenidos. Recientemente Jiaxiong Tan et al.³⁹⁸, observaron una mayor proporción de células T PD-1+ en la médula ósea de los pacientes de LMA al compararla con sangre periférica. Además, los pacientes que no lograron una remisión completa después del primer ciclo de quimioterapia presentaban una mayor proporción de células T PD-1+ TIM3+ tanto en la médula ósea como en la sangre periférica de estos pacientes. Estudios adicionales son necesarios para determinar la influencia del microambiente en la expresión de los checkpoints y la relación con los resultados clínicos.

La coexpresión de diferentes receptores inhibidores es habitual en las células inmunitarias, actuando en muchas ocasiones de forma sinérgica regulando las funciones efectoras. En el presente análisis tanto las células T como las células NK con el fenotipo PD-1+TIM3+ aumentaban en los pacientes de LMA. En pacientes infectados con el virus de la hepatitis C (VHC), se observó una alta coexpresión de PD-1 y TIM3 en las células T del hígado²⁰⁹. En pacientes de LMA se ha descrito un aumento de PD-1 y TIGIT en las células T CD8+ y la subpoblación de células T CD8+ PD-1+ TIGIT+ CD226- se ha asociado con un fenotipo disfuncional con baja capacidad de producción de IFN- γ y TNF- α así como con la imposibilidad de lograr la remisión después de la quimioterapia y un mal pronóstico clínico³¹⁶. En modelos experimentales el co-bloqueo de TIGIT y PD-1 ejerce un efecto sinérgico que mejora la función efectora de las células T CD8+³⁷⁵. También se ha sugerido una respuesta inmunitaria defectuosa contra los blastos de LMA en las células T de los pacientes de LMA que presentaban un aumento de la coexpresión de PD-1 y CD244 en comparación con los controles sanos¹⁴⁴.

Las células NK expresan PD-1³⁹⁹ y en individuos sanos seropositivos para HCMV se ha descrito una población de células NK en sangre periférica CD56dim CD57+ maduras que presentaba alta expresión de PD-1 y una actividad tumoral alterada con baja capacidad de degranulación y producción de citoquinas así como una menor capacidad proliferativa⁴⁰⁰.

Merino et al.³⁵⁵ también observaron disfunciones en la actividad antitumoral de las células NK adaptativas o tipo memoria en las que se inducía la expresión de PD-1 tras el cocultivo con células endoteliales infectadas con HCMV. Se ha demostrado que el bloqueo de PD-1/PD-L1 puede restaurar la actividad en las células NK⁴⁰¹. En pacientes con mieloma múltiple, el uso de anticuerpos anti-PD-1, potencia la función de las células NK humanas PD1+ contra las células tumorales PD-L1+⁴⁰².

La eficacia de las terapias PD-1/PD-L1 es mayor en los cánceres PD-L1 positivos que en los PD-L1 negativos⁴⁰³. Los ligandos de PD-1 se expresan en diversas células tumorales y su expresión afecta negativamente la inmunidad antitumoral. Su expresión puede inducirse mediante citoquinas, habiéndose demostrado que la IL-10 induce la expresión de PD-L1 (CD274) en monocitos y la IL-4 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) estimulan la expresión de PD-L2 (CD273) en las células dendríticas. El IFN- γ , una citoquina secretada por células T y células NK activadas, induce la expresión de ambos ligandos en monocitos humanos y células dendríticas⁴⁰⁴.

Los niveles relativos de señales inhibitoras mediados por la interacción de PD-1 con sus ligandos pueden determinar el grado de activación de las células T y el umbral entre la tolerancia y la autoinmunidad¹⁹⁵. El bloqueo con anticuerpos dirigidos frente a PD-1 o PD-1Ls resultó en un aumento de la formación de conjugados entre las células T y las células dendríticas presentadoras de antígenos⁴⁰⁵. Nuestros resultados mostraron una mayor expresión de PD-L2 (CD273) que de PD-L1 (CD274) en la superficie de los blastos de LMA. Hemos encontrado una correlación positiva de la expresión de PD-L2 en los blastos con la expresión de PD-1 en las células NKT-like. Se ha descrito que, a concentraciones bajas de antígeno, las interacciones PD-L2-PD-1 inhiben las señales fuertes mediadas por CD28-B7. Por el contrario, con altas concentraciones de antígeno, las interacciones PD-L2-PD-1 reducen la producción de citoquinas pero no inhiben la proliferación¹⁹⁶.

A diferencia de la expresión de PD-L2 (CD273) que estaba presente en un porcentaje próximo al 40%, en nuestra serie de pacientes la expresión de PD-L1 (CD274) en los blastos de LMA fue muy baja. Una mayor expresión de este ligando se correlacionó con peores tasas de supervivencia.

Hay que considerar que el bajo porcentaje de blastos PD-L1+ observados en nuestro estudio, limita la relevancia de este hallazgo. Se ha descrito que la expresión de PD-L1 inducida por IFN- γ aumentaba en los blastos después del tratamiento de los pacientes de LMA por lo que se ha sugerido el uso de la terapia anti-PD-L1/PD-1 durante la fase de consolidación del tratamiento ²⁶². En un estudio retrospectivo en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas avanzado PD-L1+ tratados con pembrolizumab en monoterapia, los resultados mostraron una supervivencia mayor incluso en los pacientes de 75 años o más previamente seleccionados con buen estado funcional (ECOG PS 0-1) ²⁴³.

En relación con la evolución de la LMA, nuestros resultados mostraron mejores tasas de supervivencia en los pacientes de LMA con bajo porcentaje de células T PD1+ LAG3+. La estimulación antigénica persistente asociada al cáncer conduce a una sobreexpresión de LAG3 que junto a PD-1 han mostrado tener una sinergia notable para inhibir las respuestas inmunitarias ³⁸². El tratamiento con anti-PD-1 ha demostrado altas tasas de respuesta y un perfil de seguridad aceptable en pacientes con neoplasias hematológicas ⁴⁰⁶. Se ha descrito una mayor estimulación de células T cuando se realiza el bloqueo doble de PD-1/LAG3 en condiciones de inmunogenicidad débiles ⁴⁰⁷. BMS-986016, un anticuerpo dirigido a bloquear LAG3, se encuentra en ensayo clínico solo o en combinación con anti-PD-1 en cánceres hematológicos ³⁵⁸. Por otro lado, anteriormente mencionábamos que la expresión de LAG3 en células Treg mejora su actividad ²³⁵, por lo que el bloqueo de LAG-3 podría traducirse en una función inhibidora menos efectiva.

Por otro lado, los resultados del presente estudio mostraron que tanto las células T como las células NK con el fenotipo PD-1+TIM3+ aumentaban en los pacientes de LMA, y estos aumentos se correlacionaban con peores tasas de supervivencia en los pacientes. Los resultados presentados en la Reunión Anual de la Sociedad de Oncología Hematológica 2020 señalaron una actividad antileucémica prometedora del anticuerpo monoclonal anti-TIM3 sabatolimab en las neoplasias mieloides (AML y MDS).

Es importante destacar que TIM3, además de estar expresado en células inmunitarias, se expresa en las células madre leucémicas de la mayoría de los tipos de LMA, pero no en las células madre hematopoyéticas. En células madre leucémicas la unión de TIM3 a su ligando Gal-9 promueve el desarrollo de la LMA, habiéndose descrito un incremento de la concentración sérica de Gal-9 en los pacientes de LMA⁴⁰⁸. Similares resultados han sido obtenidos en pacientes con síndromes mielodisplásicos en los que se observó un incremento de la expresión de TIM3 en los blastos a medida que progresaba la enfermedad. Además, la concentración de Gal-9 en suero fue mayor en aquellos pacientes cuya enfermedad progresó a LMA⁴⁰⁹. En experimentos *in vitro*, el bloqueo de TIM3 en los blastos consiguió inhibir la proliferación de los blastos positivos para TIM3. Por otro lado, la expresión de TIM3 se ha asociado a una mayor producción de IL-6 e IL-1b, IL-10 y una regulación negativa de IL-12⁴¹⁰, por lo que al bloquear TIM3 se retrasaría la progresión de la enfermedad al revertir a un microambiente tumoral menos favorable.

En resumen, la presencia de *checkpoints* en las poblaciones celulares analizadas sugiere que terapias combinadas destinadas al bloqueo simultáneo de señales inhibitoras mediadas por estos receptores en los pacientes de LMA representan una opción terapéutica prometedora. Consideramos que una mejor comprensión de la situación del sistema inmunitario en el momento del diagnóstico de los pacientes de LMA es crucial para el diseño de estrategias de inmunoterapia eficaces, precisas y personalizadas.

CONCLUSIONES

- 1ª. En los pacientes de LMA los cambios más importantes en las poblaciones linfocitarias analizadas se han detectado en las células NK, observándose un descenso del porcentaje de células NK totales y de las subpoblaciones de células NK CD56bright y CD56dim, así como un menor porcentaje de células NK CD56+CD8+.
- 2ª. Las células NK de los pacientes de LMA presentan un fenotipo alterado con un descenso de la expresión de los receptores activadores NKp46, NKp30, NKp80, DNAM-1, CD16 y CD6 y un incremento de la expresión del receptor inhibidor NKG2A en comparación con los controles sanos. Asimismo, se observa un menor porcentaje de células NK que expresan Perforina, Granulisina y Granzima B.
- 3ª. Las células NKT-like de los pacientes de LMA presentan un descenso en el porcentaje de expresión de DNAM-1 y CD6, así como de Granulisina y Granzima B.
- 4ª. Las células T de los pacientes de LMA presentan un menor porcentaje de expresión de DNAM-1, CD6 y CD16 y una mayor expresión del receptor inhibidor TIGIT.
- 5ª. El análisis de supervivencia de los pacientes con LMA en relación con la expresión de los receptores estudiados muestra una menor supervivencia en aquellos pacientes que poseen:
 - Altos porcentajes de linfocitos T que expresan PD1, solo o en combinación con TIM3 y/o LAG3.
 - Altos porcentajes de células NK que coexpresan PD1 y TIM3.
 - Altos porcentajes de linfocitos T con el fenotipo DNAM1-TIGIT+TACTILE+.
 - Bajos porcentajes de células NKT-like que expresan el receptor activador NKp46.

- 6^a. En relación con el estudio del fenotipo de los blastos de LMA, se observa una alta expresión de HLA de clase I, HLA-DR, CD48, CD80 y L-SECTIN, y una expresión muy baja o indetectable de B7-H6, CD86, CD166 y CD274 en los blastos de la mayoría de los pacientes. La expresión de los restantes marcadores en los blastos de LMA, CD112, CD155, MICA/B, CD273 y CEACAM-1, presentó un alto grado de heterogeneidad entre los diferentes pacientes.
- 7^a. La expresión de CD155 en los blastos de LMA se correlaciona de manera inversa con la expresión de DNAM-1 en las células NK, NKT-like y T y de manera directa con la expresión de TIGIT y TACTILE en las células NK.
- 8^a. El análisis de supervivencia de los pacientes con LMA en relación con la expresión de los ligandos estudiados en los blastos muestra una menor supervivencia en aquellos pacientes con un mayor porcentaje de blastos con expresión de CD48.

Bibliografía

1. Miyamoto, K. & Minami, Y. Cutting Edge Molecular Therapy for Acute Myeloid Leukemia. *INT. J. MOL. 21(14):5114.* (2020).
2. Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2019 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 93, 1267-1291 (2018).
3. Morrison, S. J., Uchida, N. & Weissman, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11: 35-71 (1995).
4. Piller, G. The history of leukemia: a personal perspective. *Blood Cells.* 19, 521-529 (1993).
5. Piller, G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol.* ;112(2):282-92. (2001).
6. Benett JM *et al.* Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *American-British Cooperative Group. Ann Intern Med.* ;103(3):460-2. (1985).
7. Bennett, J. M. *et al.* Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *J Haematol.* 78(3):325-9 (1991).
8. Reis-Alves, S. C. *et al.* Immunophenotyping in myelodysplastic syndromes can add prognostic information to well-established and new clinical scores. *PLoS. One.* 8, e81048 (2013).
9. Cheson, B. D. *et al.* Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 8, 813-819 (1990).
10. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 374, 2209-2221 (2016).
11. Dohner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 129, 424-447 (2017).
12. Vakiti, A. & Mewawalla, P. Cancer, Acute Myeloid Leukemia (AML, Erythroid Leukemia, Myelodysplasia-Related Leukemia, BCR-ABL Chronic Leukemia). *CancerAM* (2019).
13. Pera, A. *et al.* Immunosenescence: Implications for response to infection and vaccination in older people. *Maturitas.* 82, 50-55 (2015).
14. Appelbaum, F. R. *et al.* Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 107, 3481-3485 (2006).
15. Saultz, J. N. & Garzon, R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J. Clin. Med.* 5, (2016).
16. Lowenberg, B. *et al.* On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *J. Clin. Oncol.* 7, 1268-1274 (1989).
17. Amadori, S. *et al.* Mitoxantrone, etoposide, and intermediate-dose cytarabine: an effective and tolerable regimen for the treatment of refractory acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 9, 1210-1214 (1991).
18. Lowenberg, B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood.* 121, 26-28 (2013).

19. Almeida, A. M. & Ramos, F. Acute myeloid leukemia in the older adults. *Leuk. Res. Rep.* 6: 1-7 (2016).
20. Portugal, R. *et al.* Daunorubicin 90 mg/m² in Acute Myeloid Leukemia Induction: Increased Toxicity in Young Patients. *Clin. Lymphoma Myeloma. Leuk.* 17, 527-531 (2017).
21. Scappaticci, G. B. *et al.* Outcomes of previously untreated elderly patients with AML: a propensity score-matched comparison of clofarabine vs. FLAG. *Ann. Hematol.* 10-3217 (2017).
22. Buckley, S. A. *et al.* A phase I/II study of oral clofarabine plus low-dose cytarabine in previously treated acute myeloid leukaemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients at least 60 years of age. *Br. J. Haematol.* 170, 349-355 (2015).
23. Park, H. *et al.* Comparison of cladribine- and fludarabine-based induction chemotherapy in relapsed or refractory acute myeloid leukaemia. *Ann. Hematol.* 95, 1777-1786 (2016).
24. Daver, N. *et al.* Vosaroxin in combination with decitabine in newly diagnosed older patients with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome. *Haematologica.* 102, 1709-1717 (2017).
25. Conserva, M. R., Anelli, L., Zagaria, A., Specchia, G. & Albano, F. The Pleiotropic Role of Retinoic Acid/Retinoic Acid Receptors Signaling: From Vitamin A Metabolism to Gene Rearrangements in Acute Promyelocytic Leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* 20, (2019).
26. Schetelig, J. *et al.* Hematopoietic cell transplantation in patients with intermediate and high-risk AML: results from the randomized Study Alliance Leukemia (SAL) AML 2003 trial. *Leukemia.* 29, 1060-1068 (2015).
27. Baron, F. *et al.* Graft-versus-tumor effects after allogeneic hematopoietic cell transplantation with nonmyeloablative conditioning. *J. Clin. Oncol.* 20;23, 1993-2003 (2005).
28. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science.* ;295(5562):2097-100. (2002).
29. Ruggeri, L. *et al.* Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood.* 110(1), 433-440. (2006).
30. Alyea, E. P. *et al.* Comparative outcome of nonmyeloablative and myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for patients older than 50 years of age. *Blood.* 105, 1810-1814 (2005).
31. Estey, E. Why Is Progress in Acute Myeloid Leukemia So Slow? *Semin. Hematol.* 52, 243-248 (2015).
32. El, F. R., Rasheed, W., Hawsawi, Y., Alsermani, M. & Hassanein, M. Targeting FLT3 Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cells.* 7, cells7010004 (2018).
33. Ghiaur, G. & Levis, M. Mechanisms of Resistance to FLT3 Inhibitors and the Role of the Bone Marrow Microenvironment. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 31, 681-692 (2017).
34. Ball, B. & Stein, E. M. Which are the most promising targets for minimal residual disease-directed therapy in acute myeloid leukemia prior to allogeneic stem cell transplant? *Haematologica.* 104(8) 1521-1531 (2019).

35. Inaba, H. *et al.* Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the multikinase inhibitor sorafenib in combination with clofarabine and cytarabine in pediatric relapsed/refractory leukemia. *J. Clin. Oncol.* 20;29, 3293-3300 (2011).
36. Weber-Nordt, R. M. *et al.* Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood.* 88, 809-816 (1996).
37. Hayakawa, F. *et al.* A novel STAT inhibitor, OPB-31121, has a significant antitumor effect on leukemia with STAT-addictive oncokinasases. *Blood Cancer J.* 3: 166 (2013).
38. Adachi, Y., Ishikawa, Y. & Kiyoi, H. Identification of volasertib-resistant mechanism and evaluation of combination effects with volasertib and other agents on acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 8, 78452-78465 (2017).
39. Pastore, F. & Levine, R. L. Epigenetic regulators and their impact on therapy in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 101, 269-278 (2016).
40. Zhang, S. *et al.* Co-expression of AML1-ETO and PML-RAR α following treatment of de novo acute myeloid leukemia with AML1-ETO. *Leuk. Lymphoma.* 60, 1316-1319 (2019).
41. Kantarjian, H. M. *et al.* Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* 20;30, 2670-2677 (2012).
42. Roboz, G. J. *et al.* Dose, schedule, safety, and efficacy of guadecitabine in relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Cancer.* 124, 325-334 (2018).
43. Norkin, M. & Richards, A. I. Sapacitabine in the treatment of acute myeloid leukemia. *Expert. Rev. Anticancer Ther.* 15, 1261-1266 (2015).
44. Maeda, T., Towatari, M., Kosugi, H. & Saito, H. Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 96, 3847-3856 (2000).
45. Nassereddine, S., Lap, C. J., Haroun, F. & Tabbara, I. The role of mutant IDH1 and IDH2 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 96, 1983-1991 (2017).
46. Lambie, A. J. *et al.* Reversible suppression of T cell function in the bone marrow microenvironment of acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 14331 (2020).
47. Barrett, A. J. Acute myeloid leukaemia and the immune system: implications for immunotherapy. *Haematol.* 188(1):147-158. (2020).
48. Ostroumov, D., Fekete-Drimusz, N., Saborowski, M., K \ddot{u} hnel, F. & Woller, N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol. Life Sci.* 75, 689-713 (2018).
49. Acheampong, D. O. *et al.* Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): a potent alternative therapy. *Biomed Pharmacother* 225-232 (2018).
50. Aiello, A. *et al.* Immunosenescence and Its Hallmarks: How to Oppose Aging Strategically? A Review of Potential Options for Therapeutic Intervention. *Front Immunol.* 10: (2019).

51. McHugh, D. & Gil, J. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J. Cell Biol.* 217, 65-77 (2018).
52. Fane, M. & Weeraratna AT, A. U. I. D. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat Rev Cancer.* ;20(2):89-106 (2020).
53. Bruck, O. *et al.* Immune profiles in acute myeloid leukemia bone marrow associate with patient age, T-cell receptor clonality, and survival. *Blood Adv.* 4, 274-286 (2020).
54. Lv, Y., Wang, H. & Liu, Z. The Role of Regulatory B Cells in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Med Sci Monit.* ;25:3026-3031 (2019).
55. Binder, S., Luciano, M. & Horejs-Hoeck, J. The cytokine network in acute myeloid leukemia (AML): A focus on pro- and anti-inflammatory mediators. *Cytokine Growth Factor Rev.* 43:8-15 (2018).
56. Sanchez-Correa, B. *et al.* Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine.* ;61(3):885-91. (2013).
57. Chen, T. *et al.* The impact of inflammation and cytokine expression of PM2.5 in AML. *Oncol Lett.* ;16(2):2732-2740 (2018).
58. Szczepanski, M. J. *et al.* Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 73-79 (2010).
59. Zhang, C. *et al.* Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum. Immunol.* 69, 490-500 (2008).
60. Sharma, P., Kumar, P. & Sharma, R. Natural Killer Cells - Their Role in Tumour Immunosurveillance. *J. Clin. Diagn. Res.* 11, BE01-BE05 (2017).
61. Chretien, A. S. *et al.* Natural Killer Defective Maturation Is Associated with Adverse Clinical Outcome in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in immunology*, 8, 573 (2017).
62. Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M. & Caligiuri, M. A. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 25, 47-52 (2004).
63. Moretta, A. The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 306-311 (2005).
64. Wang, X. *et al.* Dendritic Cells Are Critical for the Activation and Expansion of V β 2+ T Cells After Allogeneic Hematopoietic Transplantation. *Front Immunol.* 9: (2018).
65. Patil, R., Sureshababu, S. K. & Chiplunkar, S. V. Immunosuppressive role of + β + β T cells in cancer: the other side of the coin. *Translational Cancer Research; Vol 6, Supplement 1* (2017).
66. Hodge, G., Hodge S FAU - Holmes-Liew, C.-L., Holmes-Liew CL FAU - Reynolds, P., Reynolds PN FAU - Holmes, M. & Holmes, M. Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with increased peripheral blood natural killer and natural killer T-like granzymes, perforin, and T-helper-type 1 pro-inflammatory cytokines. *J Heart Lung Transplant.* ;31(8):888-95. (2012).

67. Kawarabayashi, N. *et al.* Decrease of CD56(+)T cells and natural killer cells in cirrhotic livers with hepatitis C may be involved in their susceptibility to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* ;32(5):962-9. (2000).
68. Jadidi-Niaragh, F. *et al.* Reduced frequency of NKT-like cells in patients with progressive chronic lymphocytic leukemia.
69. Aggarwal, N., Swerdlow, S. H., TenEyck, S. P., Boyiadzis, M. & Felgar, R. E. Natural killer cell (NK) subsets and NK-like T-cell populations in acute myeloid leukemias and myelodysplastic syndromes. *Cytometry B Clin Cytom.* 349-357 (2016).
70. Le, D. R. *et al.* Peripheral blood T cells in acute myeloid leukemia (AML) patients at diagnosis have abnormal phenotype and genotype and form defective immune synapses with AML blasts. *Blood.* 114, 3909-3916 (2009).
71. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 27, 111-122 (2007).
72. Anantharaman, A. *et al.* Programmed death-ligand 1 (PD-L1) characterization of circulating tumor cells (CTCs) in muscle invasive and metastatic bladder cancer patients. *BMC. Cancer.* 16, 744-2758 (2016).
73. Ortaldo, J. R., Wiltrout, R. H. & Reynolds, C. W. Natural killer activity: early days, advances, and seminal observations. *Crit Rev. Oncog.* 19, 1-13 (2014).
74. Herberman RB, Nunn ME, Holden HT & Lavrin, D. H. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer.* ;16(2):230-9. (1975).
75. Kiessling, R. F., Klein E FAU - Wigzell & Wigzell, H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol.* ;5(2):112-7. (1975).
76. Long, EO. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol. Rev.* 224: 70-84 (2008).
77. Long, E. O., Kim, H. S., Liu, D., Peterson, M. E. & Rajagopalan, S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 31: 227-258 (2013).
78. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 388-400 (2015).
79. Bhatnagar, N. *et al.* Fc̄RIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and Fc̄RII (CD32). *J Immunol.* 44(11):3368-79. (2014).
80. Amand, M. *et al.* Human CD56(dim)CD16(dim) Cells As an Individualized Natural Killer Cell Subset. *Front Immunol.* 2017 Jun 19;8:699. (2017).
81. Gordy, L. E. *et al.* IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *Journal of immunology* , 187(12), 6335-6345. (1950).

82. Peralbo, E., Alonso, C. F. & Solana, R. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol.* ;42(8):703-8. (2007).
83. Lin, S. J. *et al.* Cytotoxic Function and Cytokine Production of Natural Killer Cells and Natural Killer T-Like Cells in Systemic Lupus Erythematosus Regulation with Interleukin-15. *Mediators of Inflammation* 2019, 4236562 (2019).
84. Golden-Mason, L., Castelblanco, N. F., O'Farrelly, C. F. & Rosen, H. R. Phenotypic and functional changes of cytotoxic CD56pos natural T cells determine outcome of acute hepatitis C virus infection. *J Virol.* ;81(17):9292-8. (2007).
85. Hassouneh, F. *et al.* Effect of age and latent CMV infection on CD8+ CD56+ T cells (NKT-like) frequency and functionality. *Mech. Ageing Dev.* 158: 38-45 (2016).
86. Pita-Lopez, M. L., Pera, A. & Solana, R. Adaptive Memory of Human NK-like CD8(+) T-Cells to Aging, and Viral and Tumor Antigens. *Front Immunol.* ;7:616. (2016).
87. Wherry, E. J. & Ahmed, R. Memory CD8 T-Cell Differentiation during Viral Infection. *J. Virol.* 78, 5535-5545 (2004).
88. McLane, L., bdel-Hakeem, M. S. & Wherry, E. J. CD8 T Cell Exhaustion During Chronic Viral Infection and Cancer. *Annual Review of Immunology* 37, (2019).
89. Distinctive selection mechanisms govern the T cell receptor repertoire of peripheral CD4-CD8- alpha/beta T cells. *J. Exp. Med.* 176, 699-706 (1992).
90. Clenet, M. L., Gagnon, F., Moratalla, A. C., Viel, E. C. & Arbour, N. Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. *Sci. Rep.* 7: 11612 (2017).
91. Weledji, E. P. & Assob, J. C. The ubiquitous neural cell adhesion molecule (N-CAM). *Ann. Med. Surg. (Lond).* 3, 77-81 (2014).
92. Van Acker, H. H., Capsomidis, A., Smits, E. L. & Van, T., V CD56 in the Immune System: More Than a Marker for Cytotoxicity? *Front Immunol.* 8, (2017).
93. Raspadori, D. *et al.* CD56 antigenic expression in acute myeloid leukemia identifies patients with poor clinical prognosis. *Leukemia* 15, 1161-1164 (2001).
94. Bournazos, S., Wang, T. T. & Ravetch, J. V. The Role and Function of Fcgamma Receptors on Myeloid Cells. *Microbiol. Spectr.* 4, 10-2016 (2016).
95. Dai, H. S. *et al.* The Fc Domain of Immunoglobulin Is Sufficient to Bridge NK Cells with Virally Infected Cells. *Immunity.* 47, 159-170 (2017).
96. Yeap, W. H. *et al.* CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 6: 34310 (2016).
97. Rosales, C. Fcγ Receptor Heterogeneity in Leukocyte Functional Responses. *Front Immunol.* 20;8: (2017).
98. Watzl, C. & Long, E. O. Signal Transduction During Activation and Inhibition of Natural Killer Cells. *Curr. Protoc. Immunol.* 11, (2010).

99. Harrison, D., Phillips, J. H. & Lanier, L. L. Involvement of a metalloprotease in spontaneous and phorbol ester-induced release of natural killer cell-associated Fc gamma RIII (CD16-II). *J. Immunol.* 147, 3459-3465 (1991).
100. Sivori, S. *et al.* p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J. Exp. Med.* 186, 1129-1136 (1997).
101. Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 190, 1505-1516 (1999).
102. Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* 187, 2065-2072 (1998).
103. Shemesh, A. *et al.* Survival in acute myeloid leukemia is associated with NKp44 splice variants. *Oncotarget.* 7, 32933-32945 (2016).
104. Parodi, M. *et al.* NKp44-NKp44 Ligand Interactions in the Regulation of Natural Killer Cells and Other Innate Lymphoid Cells in Humans. *Front Immunol.* 10, (2019).
105. Siewiera, J. *et al.* Natural cytotoxicity receptor splice variants orchestrate the distinct functions of human natural killer cell subtypes. *Nat. Commun.* 6: 10183 (2015).
106. Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* 92, 221-229 (2014).
107. Shemesh, A. *et al.* Splice variants of human natural cytotoxicity receptors: novel innate immune checkpoints. *Cancer Immunol. Immunother.* 67, 1871-1883 (2018).
108. Lanier, L. L., Chang, C. & Phillips, J. H. Human NKR-P1A. A disulfide-linked homodimer of the C-type lectin superfamily expressed by a subset of NK and T lymphocytes. *J. Immunol.* 153, 2417-2428 (1994).
109. Vitale, M. *et al.* Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 31, 233-242 (2001).
110. Akatsuka, A. *et al.* Tumor cells of non-hematopoietic and hematopoietic origins express activation-induced C-type lectin, the ligand for killer cell lectin-like receptor F1. *Int. Immunol.* 22, 783-790 (2010).
111. Bartel, Y., Bauer, B. & Steinle, A. Modulation of NK cell function by genetically coupled C-type lectin-like receptor/ligand pairs encoded in the human natural killer gene complex. *Frontiers in immunology*, 4, 362 (2013).
112. Klimosch, S. N., Bartel, Y., Wiemann, S. & Steinle, A. Genetically coupled receptor-ligand pair NKp80-AICL enables autonomous control of human NK cell responses. *Blood.* 122, 2380-2389 (2013).
113. Freud, A. G. *et al.* NKp80 Defines a Critical Step during Human Natural Killer Cell Development. *Cell Rep.* 16, 379-391 (2016).
114. Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I. & Steinle, A. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* 7, 1334-1342 (2006).

115. Kuttruff, S. *et al.* Nkp80 defines and stimulates a reactive subset of CD8 T cells. *Blood*. 113, 358-369 (2009).
116. Jonjic, S. Manipulation of NKG2D ligands by cytomegaloviruses: impact on innate and adaptive immune response. *Frontiers in Immunology* 2, 85 (2011).
117. Peraldi, M. N. *et al.* Oxidative stress mediates a reduced expression of the activating receptor NKG2D in NK cells from end-stage renal disease patients. *J. Immunol.* 182, 1696-1705 (2009).
118. Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T. & Okabe, H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim. Biophys. Acta.* 1526, 10-12 (2001).
119. Borchers, M. T., Harris, N. L., Wesselkamper, S. C., Vitucci, M. & Cosman, D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol.* 291, L222-L231 (2006).
120. Fionda, C. *et al.* Heat shock protein-90 inhibitors increase MHC class I-related chain A and B ligand expression on multiple myeloma cells and their ability to trigger NK cell degranulation. *J. Immunol.* 183, 4385-4394 (2009).
121. Salih, H. R., Rammensee, H. G. & Steinle, A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169, 4098-4102 (2002).
122. Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O. & Kabelitz, D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand. J. Immunol.* 78, 120-129 (2013).
123. Ashiru, O. *et al.* NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J. Virol.* 83, 12345-12354 (2009).
124. Chen, Z. *et al.* CEACAM1 dampens antitumor immunity by down-regulating NKG2D ligand expression on tumor cells. *J. Exp. Med.* 19;208, 2633-2640 (2011).
125. Horng, T., Bezbradica, J. S. & Medzhitov, R. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat. Immunol.* 8, 1345-1352 (2007).
126. Zafirova, B., Wensveen, F. M., Gulin, M. & Polic, B. Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor. *Cell Mol. Life Sci.* 68, 3519-3529 (2011).
127. Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhang, J. & Tian, Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine.* 42, 128-136 (2008).
128. Zhang, C. *et al.* Opposing effect of IFN γ and IFN α on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN γ on NK cells. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1057-1067 (2005).
129. Jang, Y. H. *et al.* Increased blood levels of NKG2D(+)CD4(+) T- α cells in patients with alopecia areata. *J Am Acad Dermatol.* ;76(1):151-153. (2017).
130. Hassan, N. J. *et al.* CD6 Regulates T-Cell Responses through Activation-Dependent Recruitment of the Positive Regulator SLP-76. *Mol. Cell Biol.* 26, 6727-6738 (2006).

131. Carrasco, E. *et al.* Human CD6 Down-Modulation following T-Cell Activation Compromises Lymphocyte Survival and Proliferative Responses. *Frontiers in immunology*, 8, 769. (2017).
132. Chappell, P. *et al.* Structures of CD6 and Its Ligand CD166 Give Insight into Their Interaction. *Structure*. 23, 1426-1436 (2015).
133. Zimmerman, A. W. *et al.* Long-term engagement of CD6 and ALCAM is essential for T-cell proliferation induced by dendritic cells. *Blood*. 107, 3212-3220 (2006).
134. Chitteti, B. R. *et al.* CD166 regulates human and murine hematopoietic stem cells and the hematopoietic niche. *Blood*. 124, 519-529 (2014).
135. Nair, P., Melarkode, R., Rajkumar, D. & Montero, E. CD6 synergistic co-stimulation promoting proinflammatory response is modulated without interfering with the activated leucocyte cell adhesion molecule interaction. *Clin. Exp. Immunol.* 162, 116-130 (2010).
136. Brown, M. H. *et al.* 2B4, the Natural Killer and T Cell Immunoglobulin Superfamily Surface Protein, Is a Ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188, 2083-2090 (1998).
137. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 178, 1397-1406 (1993).
138. Youn, J. I., Collazo, M., Shalova, I. N., Biswas, S. K. & Gabrilovich, D. I. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J. Leukoc. Biol.* 91, 167-181 (2012).
139. McArdel, S. L., Terhorst, C. & Sharpe, A. H. Roles of CD48 in regulating immunity and tolerance. *Clin. Immunol.* 164:10-20., (2016).
140. Morra, M. *et al.* Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *EMBO J.* 20, 5840-5852 (2001).
141. Bloch-Queyrat, C. *et al.* Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J. Exp. Med.* 202, 181-192 (2005).
142. Parolini, S. *et al.* X-Linked Lymphoproliferative Disease: 2b4 Molecules Displaying Inhibitory Rather than Activating Function Are Responsible for the Inability of Natural Killer Cells to Kill Epstein-Barr Virus-Infected Cells. *J. Exp. Med.* 192, 337-346 (2000).
143. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 486-499 (2015).
144. Tan, J. *et al.* Higher PD-1 expression concurrent with exhausted CD8+ T cells in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Chin J. Cancer Res.* 29, 463-470 (2017).
145. Pacheco, Y. *et al.* Simultaneous TCR and CD244 signals induce dynamic downmodulation of CD244 on human antiviral T cells1. *J. Immunol.* 191, 2072-2081 (2013).
146. Agresta, L., Hoebe, K. H. N. & Janssen, E. M. The Emerging Role of CD244 Signaling in Immune Cells of the Tumor Microenvironment. *Front Immunol.* 9: (2018).
147. Kim, E. O. *et al.* Homotypic Cell to Cell Cross-talk Among Human Natural Killer Cells Reveals Differential and Overlapping Roles of 2B4 and CD2*. *J. Biol. Chem.* 285, 41755-41764 (2010).

148. Claus, M., Wingert, S. & Watzl, C. Modulation of natural killer cell functions by interactions between 2B4 and CD48 in cis and in trans. *Open. Biol.* 6, doi (2016).
149. Wyatt, R. C., Lanzoni, G., Russell, M. A., Gerling, I. & Richardson, S. J. What the HLA-!â€"Classical and Non-classical HLA Class I and Their Potential Roles in Type 1 Diabetes. *Curr. Diab. Rep.* 19, Epub-1245 (2019).
150. Williams, A. P., Bateman, A. R. & Khakoo, S. I. Hanging in the balance. KIR and their role in disease. *Mol. Interv.* 5, 226-240 (2005).
151. Bottino, C., Moretta, L., Pende, D., Vitale, M. & Moretta, A. Learning how to discriminate between friends and enemies, a lesson from Natural Killer cells. *Mol. Immunol.* 41, 569-575 (2004).
152. Parham, P. MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 201-214 (2005).
153. Ljunggren, H. G. & Karre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today.* 11, 237-244 (1990).
154. Anfossi, N. *et al.* Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity.* 25, 331-342 (2006).
155. Fauriat, C., Ivarsson, M. A., Ljunggren, H. G., Malmberg, K. J. & Michaelsson, J. Education of human natural killer cells by activating killer cell immunoglobulin-like receptors. *Blood.* 115, 1166-1174 (2010).
156. Moretta, A. *et al.* Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 14:619-48., (1996).
157. Alter, G. *et al.* Ligand-independent exhaustion of killer immunoglobulin-like receptor-positive CD8+ T cells in human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol.* ;82(19): 9668-9677 (2008).
158. Huard, B. & Karlsson, L. KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement. *Nature.* ;403(6767):325-8 (2000).
159. Jacomet, F. *et al.* Evidence for eomesodermin-expressing innate-like CD8(+) KIR/NKG2A(+) T-ácells in human adults and cord blood samples. *Eur J Immunol.* ;45(7):1926-33. (2015).
160. Cosman, D. *et al.* A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity.* 7, 273-282 (1997).
161. Bellon, T., Kitzig, F., Sayos, J. & Lopez-Botet, M. Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J. Immunol.* 168, 3351-3359 (2002).
162. Colonna, M. *et al.* A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells. *J. Exp. Med.* 186, 1809-1818 (1997).
163. Zilberman, S. *et al.* HLA-G1 and HLA-G5 active dimers are present in malignant cells and effusions: the influence of the tumor microenvironment. *Eur. J. Immunol.* 42, 1599-1608 (2012).

164. Kirwan, S. E. & Burshtyn, D. N. Killer cell Ig-like receptor-dependent signaling by Ig-like transcript 2 (ILT2/CD85j/LILRB1/LIR-1). *J. Immunol.* 175, 5006-5015 (2005).
165. Gustafson, C. E. *et al.* Immune Checkpoint Function of CD85j in CD8 T Cell Differentiation and Aging. *Front Immunol.* 8:692., (2017).
166. Spriggs, M. K. One step ahead of the game: viral immunomodulatory molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 14:101-30., (1996).
167. Lee, N. *et al.* HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5199-5204 (1998).
168. Borrego, F., Ulbrecht, M., Weiss, E. H., Coligan, J. E. & Brooks, A. G. Recognition of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-E complexed with HLA class I signal sequence-derived peptides by CD94/NKG2 confers protection from natural killer cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* 187, 813-818 (1998).
169. Carretero, M. *et al.* Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants. *Eur. J. Immunol.* 28, 1280-1291 (1998).
170. Gunturi, A., Berg RE FAU - Forman, J. & Forman, J. The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* 30, 29-34 (2004).
171. Iwaszko, M. & Bogunia-Kubik, K. Clinical significance of the HLA-E and CD94/NKG2 interaction. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.).* 59, 353-367 (2011).
172. Kamiya, T., Seow, S. V., Wong, D., Robinson, M. & Campana, D. Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells. *J. Clin. Invest.* 129, 2094-2106 (2019).
173. Sanchez-Correa, B. *et al.* DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Cancers. (Basel).* 11, cancers11060877 (2019).
174. Burns, G. F., Triglia, T., Werkmeister, J. A., Begley, C. G. & Boyd, A. W. TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J. Exp. Med.* 161, 1063-1078 (1985).
175. Shibuya, A. *et al.* DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity.* 4, 573-581 (1996).
176. Iguchi-Manaka, A. *et al.* Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J. Exp. Med.* 205, 2959-2964 (2008).
177. Gilfillan, S. *et al.* DNAM-1 promotes activation of cytotoxic lymphocytes by nonprofessional antigen-presenting cells and tumors. *J. Exp. Med.* 205, 2965-2973 (2008).
178. Gunji, Y. *et al.* Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34+ LFA-1- cells are more primitive than CD34+ LFA-1+ cells. *Blood.* 80, 429-436 (1992).

179. Kojima, H. *et al.* CD226 mediates platelet and megakaryocytic cell adhesion to vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 19;278, 36748-36753 (2003).
180. Seth, S. *et al.* Heterogeneous expression of the adhesion receptor CD226 on murine NK and T cells and its function in NK-mediated killing of immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 86, 91-101 (2009).
181. Zhang, Z. *et al.* DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J. Exp. Med.* 212, 2165-2182 (2015).
182. Joller, N. *et al.* Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity.* 40, 569-581 (2014).
183. Liu, S. *et al.* Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death. Differ.* 20, 456-464 (2013).
184. Wang, P. L., O'Farrell, S., Clayberger, C. & Krensky, A. M. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J. Immunol.* 148, 2600-2608 (1992).
185. Wu, H., Windmiller, D. A., Wang, L. & Backer, J. M. YXXM motifs in the PDGF-beta receptor serve dual roles as phosphoinositide 3-kinase binding motifs and tyrosine-based endocytic sorting signals. *J. Biol. Chem.* 278, 40425-40428 (2003).
186. Georgiev, H., Ravens, I., Papadogianni, G. & Bernhardt, G. Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. *Front Immunol.* 9:1072., (2018).
187. Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A. S. & Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J. Immunol.* 172, 3994-3998 (2004).
188. Gramatzki, M. *et al.* Antibodies TC-12 ("unique") and TH-111 (CD96) characterize T-cell acute lymphoblastic leukemia and a subgroup of acute myeloid leukemia. *Exp. Hematol.* 26, 1209-1214 (1998).
189. Hosen, N. *et al.* CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 11008-11013 (2007).
190. DU, W. *et al.* Cluster of differentiation 96 as a leukemia stem cell-specific marker and a factor for prognosis evaluation in leukemia. *Mol. Clin. Oncol.* 3, 833-838 (2015).
191. Zhu, Y. *et al.* Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J. Exp. Med.* 213, 167-176 (2016).
192. Whelan, S. *et al.* PVRL1 and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8(+) T-cell Function. *Cancer Immunol. Res.* 7, 257-268 (2019).
193. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11, 3887-3895 (1992).
194. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary

- human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* 173, 945-954 (2004).
195. Freeman, G. J. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034 (2000).
 196. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* 2, 261-268 (2001).
 197. Sheppard, K. A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* 574, 37-41 (2004).
 198. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 227-242 (2013).
 199. McIntire, J. J., Umetsu, D. T. & DeKruyff, R. H. TIM-1, a novel allergy and asthma susceptibility gene. *Springer Semin. Immunopathol.* 25, 335-348 (2004).
 200. Kuchroo, V. K., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Freeman, G. J. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 454-462 (2003).
 201. Cao, E. *et al.* T cell immunoglobulin mucin-3 crystal structure reveals a galectin-9-independent ligand-binding surface. *Immunity.* 26, 311-321 (2007).
 202. van de Weyer, P. S. *et al.* A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 571-576 (2006).
 203. Huang, Y. H. *et al.* CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature.* 517, 386-390 (2015).
 204. Saresella, M. *et al.* A role for the TIM-3/GAL-9/BAT3 pathway in determining the clinical phenotype of multiple sclerosis. *FASEB J.* 28, 5000-5009 (2014).
 205. Lee, J. *et al.* Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol. Cell Biol.* 31, 3963-3974 (2011).
 206. Han, G., Chen, G., Shen, B. & Li, Y. Tim-3: an activation marker and activation limiter of innate immune cells. *Front Immunol.* 4:449., (2013).
 207. Nakayama, M. *et al.* Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood.* 113, 3821-3830 (2009).
 208. Sakhdari, A. *et al.* Tim-3 negatively regulates cytotoxicity in exhausted CD8⁺ T cells in HIV infection. *PLoS. One.* 7, e40146 (2012).
 209. Golden-Mason, L. *et al.* Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Virol.* 83, 9122-9130 (2009).
 210. Jones, R. B. *et al.* Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J. Exp. Med.* 205, 2763-2779 (2008).

211. Leitner, J. *et al.* TIM-3 does not act as a receptor for galectin-9. *PLoS. Pathog.* 9, (2013).
212. McMahan, R. H. *et al.* Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J. Clin. Invest.* 120, 4546-4557 (2010).
213. Li, C. *et al.* Tim-3 is highly expressed in T cells in acute myeloid leukemia and associated with clinicopathological prognostic stratification. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 6880-6888 (2014).
214. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 117, 4501-4510 (2011).
215. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 117, 4501-4510 (2011).
216. Kashio, Y. *et al.* Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *J. Immunol.* 170, 3631-3636 (2003).
217. Ocana-Guzman, R., Torre-Bouscoulet, L. & Sada-Ovalle, I. TIM-3 Regulates Distinct Functions in Macrophages. *Front Immunol.* 7:229., (2016).
218. Khairnar, V. *et al.* CEACAM1 promotes CD8(+) T cell responses and improves control of a chronic viral infection. *Nat. Commun.* 9, 2561-04832 (2018).
219. Rangachari, M. *et al.* Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat. Med.* 18, 1394-1400 (2012).
220. Singer, B. B. *et al.* CEACAM1 (CD66a) mediates delay of spontaneous and Fas ligand-induced apoptosis in granulocytes. *Eur. J. Immunol.* 35, 1949-1959 (2005).
221. Tang, D. & Lotze, M. T. Tumor immunity times out: TIM-3 and HMGB1. *Nat. Immunol.* 13, 808-810 (2012).
222. Chiba, S. *et al.* Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat. Immunol.* 13, 832-842 (2012).
223. Wada, J. & Kanwar, Y. S. Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J. Biol. Chem.* 272, 6078-6086 (1997).
224. Perillo, N. L., Marcus, M. E. & Baum, L. G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J. Mol. Med. (Berl).* 76, 402-412 (1998).
225. Zhu, C. *et al.* The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.* 6, 1245-1252 (2005).
226. Triebel, F. *et al.* LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J. Exp. Med.* 171, 1393-1405 (1990).
227. Baixeras, E. *et al.* Characterization of the lymphocyte activation gene 3-encoded protein. A new ligand for human leukocyte antigen class II antigens. *J. Exp. Med.* 176, 327-337 (1992).

228. Bae, J., Lee, S. J., Park, C. G., Lee, Y. S. & Chun, T. Trafficking of LAG-3 to the surface on activated T cells via its cytoplasmic domain and protein kinase C signaling. *J. Immunol.* 193, 3101-3112 (2014).
229. Li, N. *et al.* Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *EMBO J.* 26, 494-504 (2007).
230. Li, N., Workman, C. J., Martin, S. M. & Vignali, D. A. Biochemical analysis of the regulatory T cell protein lymphocyte activation gene-3 (LAG-3; CD223). *J. Immunol.* 173, 6806-6812 (2004).
231. Workman, C. J. *et al.* LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J. Immunol.* 182, 1885-1891 (2009).
232. Kisielow, M., Kisielow, J., Capoferri-Sollami, G. & Karjalainen, K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur. J. Immunol.* 35, 2081-2088 (2005).
233. Kouo, T. *et al.* Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunol. Res.* 3, 412-423 (2015).
234. Andrae, S., Piras, F., Burdin, N. & Triebel, F. Maturation and activation of dendritic cells induced by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J. Immunol.* 168, 3874-3880 (2002).
235. Huang, C. T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21, 503-513 (2004).
236. Sciacchitano, S. *et al.* Galectin-3: One Molecule for an Alphabet of Diseases, from A to Z. *Int. J. Mol. Sci.* 19, (2018).
237. Sanchez-Serna, J. *et al.* Galectina-3 as a biomarker of acute kidney injury risk in patients with decompensated heart failure. *Rev. Clin. Esp.* 219, 315-319 (2019).
238. Rheude, T. *et al.* Differential Prognostic Value of Galectin-3 According to Carbohydrate Antigen 125 Levels in Transcatheter Aortic Valve Implantation. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed).* 72, 907-915 (2019).
239. Suarez-Fuentetaja, N. *et al.* Circulating Galectin-3 Following Heart Transplant: Long-term Dynamics and Prognostic Value. *Rev. Esp. Cardiol. (Engl. Ed).* 72, 899-906 (2019).
240. Dong, R. *et al.* Galectin-3 as a novel biomarker for disease diagnosis and a target for therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* 41, 599-614 (2018).
241. Dominguez-Soto, A. *et al.* The DC-SIGN-related lectin LSEctin mediates antigen capture and pathogen binding by human myeloid cells. *Blood.* 109, 5337-5345 (2007).
242. Wang, J. *et al.* Fibrinogen-like Protein 1 Is a Major Immune Inhibitory Ligand of LAG-3. *Cell.* 176, 334-347 (2019).
243. Gridelli, C. & Sgambato, A. Elderly patients and PD-L1-positive advanced non-small cell lung cancer: is pembrolizumab monotherapy effective and safe? *Annals of translational medicine*, 7(Suppl 8), S282. (2019).
244. O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 151-167 (2019).

245. Kersh, A. E. Targeted Therapies: Immunologic Effects and Potential Applications Outside of Cancer. (2018).
246. Weinblatt, M. E. *et al.* Adalimumab, a fully human anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant methotrexate: the ARMADA trial. *Arthritis Rheum.* 48, 35-45 (2003).
247. Estey, E. H. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am. J. Hematol.* 89, 1063-1081 (2014).
248. Pagel, J. M. *et al.* 131I-anti-CD45 antibody plus busulfan and cyclophosphamide before allogeneic hematopoietic cell transplantation for treatment of acute myeloid leukemia in first remission. *Blood.* 107, 2184-2191 (2006).
249. Testa, U., Pelosi, E. & Frankel, A. CD 123 is a membrane biomarker and a therapeutic target in hematologic malignancies. *Biomark. Res.* 2, 4-2 (2014).
250. Kavanagh, S. *et al.* Emerging therapies for acute myeloid leukemia: translating biology into the clinic. *JCI Insight.* ;2(18): (2017).
251. Bill, M. *et al.* Revisiting CLEC12A as leukaemic stem cell marker in AML: highlighting the necessity of precision diagnostics in patients eligible for targeted therapy. *Br. J. Haematol.* 184, 769-781 (2019).
252. Laszlo, G. S., Estey, E. H. & Walter, R. B. The past and future of CD33 as therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 28, 143-153 (2014).
253. Rampal, R. & Figueroa, M. E. Wilms tumor 1 mutations in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 101, 672-679 (2016).
254. Ball, E. D. *et al.* Initial trial of bispecific antibody-mediated immunotherapy of CD15-bearing tumors: cytotoxicity of human tumor cells using a bispecific antibody comprised of anti-CD15 (MoAb PM81) and anti-CD64/Fc gamma RI (MoAb 32). *J. Hematother.* 1, 85-94 (1992).
255. Naik, J. *et al.* CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* ;104(3): (2019).
256. Ponce, L. P. *et al.* SIRPalpha-antibody fusion proteins stimulate phagocytosis and promote elimination of acute myeloid leukemia cells. *Oncotarget.* 8, 11284-11301 (2017).
257. Chu DT *et al.* An Update on Anti-CD137 Antibodies in Immunotherapies for Cancer. *Int J Mol Sci.* ;20(8):1822 (2019).
258. Krupka, C. *et al.* Targeting CD157 in AML using a novel, Fc-engineered antibody construct. *Oncotarget.* 8, 35707-35717 (2017).
259. Winnicka, B. *et al.* CD13 is dispensable for normal hematopoiesis and myeloid cell functions in the mouse. *J. Leukoc. Biol.* 88, 347-359 (2010).
260. Perez-Gracia, J. L., Labiano, S., Rodriguez-Ruiz, M., Sanmamed, M. F. & Melero, I. Orchestrating immune check-point blockade for cancer immunotherapy in combinations. *Curr. Opin. Immunol.* 27:89-97., (2014).

261. Lambie, A. J. & Lind, E. F. Targeting the Immune Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia: A Focus on T Cell Immunity. *Front Oncol.* 8:213., (2018).
262. Kronig, H. *et al.* Interferon-induced programmed death-ligand 1 (PD-L1/B7-H1) expression increases on human acute myeloid leukemia blast cells during treatment. *Eur. J. Haematol.* 92, 195-203 (2014).
263. Giannopoulos, K. Targeting Immune Signaling Checkpoints in Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Med.* 8, (2019).
264. Qin, S. *et al.* Novel immune checkpoint targets: moving beyond PD-1 and CTLA-4. *Mol. Cancer.* 18: (2019).
265. Yang, D., Zhang, X., Zhang, X. & Xu, Y. The progress and current status of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Ann. Hematol.* 96, 1965-1982 (2017).
266. Vey, N. *et al.* A phase 1 trial of the anti-inhibitory KIR mAb IPH2101 for AML in complete remission. *Blood.* 120, 4317-4323 (2012).
267. Xu, F. *et al.* Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol. Immunother.* 66, 1367-1375 (2017).
268. Dougall, W. C., Kurtulus, S., Smyth, M. J. & Anderson, A. C. TIGIT and CD96: new checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 276, 112-120 (2017).
269. Raneros, A. B. *et al.* Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition. *Oncotarget.* 8, 31959-31976 (2017).
270. Chretien, A. S. *et al.* NKp30 expression is a prognostic immune biomarker for stratification of patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 8, 49548-49563 (2017).
271. Folgiero, V. *et al.* TIM-3/Gal-9 interaction induces IFN γ -dependent IDO1 expression in acute myeloid leukemia blast cells. *J. Hematol. Oncol.* 8: 36-0134 (2015).
272. Labani-Motlagh, A., shja-Mahdavi, M. & Loskog, A. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol.* 11: (2020).
273. Maslak, P. G. *et al.* Phase 2 trial of a multivalent WT1 peptide vaccine (galinpepimut-S) in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 2, 224-234 (2018).
274. Rohaan, M. W., Wilgenhof, S. & Haanen, J. B. A. G. Adoptive cellular therapies: the current landscape. *Virchows Arch.* ;474(4):449-461 (2019).
275. Audehm, S. & Krackhardt, A. M. Specific Adoptive Cellular Immunotherapy in Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Oncol. Res. Treat.* 40, 691-696 (2017).
276. Tarazona, R. *et al.* Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* ;69(5):879-899. (2020).
277. Ruggeri, L. *et al.* Natural killer cell alloreactivity for leukemia therapy. *J Immunother.* ;28(3):175-82. (2005).

278. Grzywacz, B. *et al.* Natural Killer Cell Homing and Persistence in the Bone Marrow After Adoptive Immunotherapy Correlates With Better Leukemia Control. *J Immunother.* ;42(2):65-72. (2019).
279. Ardolino, M. *et al.* Cytokine therapy reverses NK cell anergy in MHC-deficient tumors. *J. Clin. Invest.* 124, 4781-4794 (2014).
280. Braun, S., Gerhartz, H. H. & Schmetzer, H. M. Lymphokine-activated killer (LAK) cells and cytokines synergize to kill clonal cells in acute myeloid leukemia (AML) in vitro. *Haematologia (Budap.)*. 30, 271-288 (2000).
281. Ni, J., Miller, M. F., Stojanovic, A. F. & Cerwenka, A. Toward the next generation of NK cell-based adoptive cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*, 2(4) (2013).
282. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine-induced killer cells with potent antitumor cell activity. *J. Exp. Med.* 174, 139-149 (1991).
283. Pievani, A. *et al.* Dual-functional capability of CD3+CD56+ CIK cells, a T-cell subset that acquires NK function and retains TCR-mediated specific cytotoxicity. *Blood*. 118, 3301-3310 (2011).
284. Przespolewski, A., Szeles, A. & Wang, E. S. Advances in immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Future Oncology* 14, 963-978 (2018).
285. Zhang, X. *et al.* 5 years of clinical DC-CIK/NK cells immunotherapy for acute myeloid leukemia-summary. *Immunotherapy.* ;12(1):63-74. (2020).
286. Coscia, M. *et al.* Adoptive immunotherapy with CAR modified T cells in cancer: current landscape and future perspectives. *Front Biosci* ;24:1284-1315 (2019).
287. Tang, X. *et al.* First-in-man clinical trial of CAR NK-92 cells: safety test of CD33-CAR NK-92 cells in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *American journal of cancer research*, 8(6), 1083-1089. (2018).
288. Mensali, N. *et al.* NK cells specifically TCR-dressed to kill cancer cells. *EBioMedicine*. 40:106-17., (2019).
289. Marin, V. *et al.* Cytokine-induced killer cells for cell therapy of acute myeloid leukemia: improvement of their immune activity by expression of CD33-specific chimeric receptors. *Haematologica*. 95, 2144-2152 (2010).
290. Bollino, D. & Webb, T. J. Chimeric antigen receptor-engineered natural killer and natural killer T cells for cancer immunotherapy. *Transl. Res.* 187:32-43., (2017).
291. Jafarzadeh, L., Masoumi, E., Fallah-Mehrjardi, K., Mirzaei, H. R. & Hadjati, J. Prolonged Persistence of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cell in Adoptive Cancer Immunotherapy: Challenges and Ways Forward. *Frontiers in Immunology* 11, 702 (2020).
292. Repetto, L. Greater risks of chemotherapy toxicity in elderly patients with cancer. *The journal of supportive oncology* 18-24 (2003).
293. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9, 503-510 (2008).

294. Assarsson, E. *et al.* CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 165, 3673-3679 (2000).
295. Winer, E. S. & Stone RM Novel therapy in Acute myeloid leukemia (AML): moving toward targeted approaches. *Ther Adv Hematol.* ;10: (2019).
296. Park, Y. *et al.* The prognostic impact of lymphocyte subsets in newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood Res.* ;53(3):198-204. (2018).
297. Silzle, T. *et al.* Lymphopenia at diagnosis is highly prevalent in myelodysplastic syndromes and has an independent negative prognostic value in IPSS-R-low-risk patients. *Blood Cancer Journal* 9, 63 (2019).
298. Ménétrier-Caux, C., Ray-Coquard, I., Blay, J. Y. & Caux, C. Lymphopenia in Cancer Patients and its Effects on Response to Immunotherapy: an opportunity for combination with Cytokines? *Journal for ImmunoTherapy of Cancer* 7, 85 (2019).
299. Fridman, W. H., Pages, F., Sautess-Fridman, C. & Galon, J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* ;12(4):298-306 (2012).
300. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet.* 356, 1795-1799 (2000).
301. Farnault, L., Sanchez, C., Baier, C., Le Treut, T. & Costello, R. T. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: mechanisms and therapeutic implications. *Clin Dev Immunol.* 2012:421702. (2012).
302. Cichocki, F. *et al.* The Past, Present, and Future of NK Cells in Hematopoietic Cell Transplantation and Adoptive Transfer. *Curr Top Microbiol Immunol.* ;395:225-43. (2016).
303. Hsu, K. C. *et al.* Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood.* ;105(12):4878-84. (2005).
304. Zaghi, E., Calvi, M., Di Vito, C. & Mavilio, D. Innate Immune Responses in the Outcome of Haploidentical Hematopoietic Stem Cell Transplantation to Cure Hematologic Malignancies. *Frontiers in Immunology* 10, 2794 (2019).
305. Minculescu, L. *et al.* Early Natural Killer Cell Reconstitution Predicts Overall Survival in T Cell-Replete Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* ;22(12):2187-2193. (2016).
306. Carlsten, M. & Järås M. Natural Killer Cells in Myeloid Malignancies: Immune Surveillance, NK Cell Dysfunction, and Pharmacological Opportunities to Bolster the Endogenous NK Cells. *Front Immunol.* ;10:2357 (2019).
307. Del, Z. G. *et al.* Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* ;92(2):100-114. (2017).
308. Freud, A. G., Mundy-Bosse, B. L., Yu, J. & Caligiuri, M. A. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity.* ;47(5):820-833. (2017).

309. Solana, R., Pawelec, G. & Tarazona, R. Aging and innate immunity. *Immunity*. 24, 491-494 (2006).
310. Campos, C. *et al.* Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *Gerontol.* 54 130-137 (2014).
311. Cichocki, F., Grzywacz, B. & Miller, J. S. Human NK Cell Development: One Road or Many. *Front Immunol.* ;10:2078 (2019).
312. Horowitz, A. *et al.* Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med.* ;5(208):208ra145. (2013).
313. Sanchez-Correa, B. *et al.* Natural killer cell immunosenescence in acute myeloid leukaemia patients: new targets for immunotherapeutic strategies? *Cancer Immunol. Immunother.* 65, 453-463 (2016).
314. Peron, J. *et al.* CD4 lymphopenia to identify end-of-life metastatic cancer patients. *Eur J Cancer.* ;49(5):1080-9. (2013).
315. Uzhachenko, R. V. & Shanker, A. CD8+ T Lymphocyte and NK Cell Network: Circuitry in the Cytotoxic Domain of Immunity. *Front Immunol.* 10, (2019).
316. Wang, M. *et al.* CD8(+)T cells expressing both PD-1 and TIGIT but not CD226 are dysfunctional in acute myeloid leukemia (AML) patients. *Clin Immunol.* ;190:64-73. (2018).
317. Vidriales, M. B. *et al.* Lymphoid subsets in acute myeloid leukemias: increased number of cells with NK phenotype and normal T-cell distribution. *Ann Hematol.* ;67(5):217-22. (1993).
318. Solana, R., Campos, C., Pera, A. & Tarazona, R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* 29:56-61., (2014).
319. Pera, A. *et al.* CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4+ T cell subset coexpressing CD57 and CD154. *J Leukoc Biol.* ;101(2):555-566. (2017).
320. Solana, R. *et al.* CMV and Immunosenescence: from basics to clinics. *Immun. Ageing.* 9, 23-29 (2012).
321. Zhou, J. *et al.* An NK Cell Population Lacking FcR γ Is Expanded in Chronically Infected HIV Patients. *J Immunol.* ;194(10):4688-97. (2015).
322. Kaifu, T. & Nakamura, A. Polymorphisms of immunoglobulin receptors and the effects on clinical outcome in cancer immunotherapy and other immune diseases: a general review. *Int Immunol.* ;29(7):319-325 (2017).
323. Gleason, M. K. *et al.* CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33+ targets. *Blood.* ;123(19):3016-26. (2014).
324. Sivori, S. *et al.* NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol.* ;29(5):1656-66. (1999).
325. Hudspeth, K., Silva-Santos, B. & Mavilio, D. Natural Cytotoxicity Receptors: Broader Expression Patterns and Functions in Innate and Adaptive Immune Cells. *Front Immunol.* 20;4: (2013).

326. Costello, R. T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 99, 3661-3667 (2002).
327. Fauriat, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*. 109, 323-330 (2007).
328. Sanchez-Correa, B. *et al.* Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 1195-1205 (2011).
329. Sanchez-Correa, B. *et al.* In Vitro Culture with Interleukin-15 Leads to Expression of Activating Receptors and Recovery of Natural Killer Cell Function in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Front Immunol.* 8:931., (2017).
330. Ferlazzo, G. & Morandi, B. Cross-Talks between Natural Killer Cells and Distinct Subsets of Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology* 5, 159 (2014).
331. Nowbakht, P. *et al.* Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*. 105, 3615-3622 (2005).
332. Martner, A. *et al.* NK cell expression of natural cytotoxicity receptors may determine relapse risk in older AML patients undergoing immunotherapy for remission maintenance. *Oncotarget*. 6, 42569-42574 (2015).
333. Verheyden, S., Bernier, M. & Demanet, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia*. 18, 2002-2007 (2004).
334. Neuss, S. *et al.* Cellular Mechanisms Controlling Surfacing of AICL Glycoproteins, Cognate Ligands of the Activating NK Receptor NKp80. *J Immunol.* ;201(4):1275-1286 (2018).
335. Peipp, M. *et al.* HER2-specific immunoligands engaging NKp30 or NKp80 trigger NK-cell-mediated lysis of tumor cells and enhance antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Oncotarget.* ;6(31):32075-88. (2015).
336. Deng, G. *et al.* Generation and Preclinical Characterization of an NKp80-Fc Fusion Protein for Redirected Cytolysis of Natural Killer (NK) Cells against Leukemia*. *J. Biol. Chem.* 290, 22474-22484 (2015).
337. Thomas, M. *et al.* Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 1656-1661 (2008).
338. Jamieson, A. M. *et al.* The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity*. 17, 19-29 (2002).
339. Van Belle, T. L. & von Herrath, M. G. The role of the activating receptor NKG2D in autoimmunity. *Mol. Immunol.* 47, 8-11 (2009).
340. Bauer, S. *et al.* Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285 727-729 (1999).

341. Liu, H. *et al.* Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res.* ;9(10):2064-2078 (2019).
342. Morgado, S. *et al.* NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *J Innate Immun.* ;3(4):365-73. (2011).
343. Knaus, H. A. *et al.* Signatures of CD8+ T cell dysfunction in AML patients and their reversibility with response to chemotherapy. *JCI Insight.* ;3(21):e120974. (2018).
344. Kaminski, R. *et al.* Inhibition of trans-endothelial migration of HIV-1 infected myeloid cells using virus expression dependent anti-ALCAM CRISPR-Cas9. *J. Immunol.* 204, 220 (2020).
345. Strassberger, V. *et al.* A comprehensive surface proteome analysis of myeloid leukemia cell lines for therapeutic antibody development. *J. Proteomics.* 99:138-51., (2014).
346. Veillette, A. SLAM-Family Receptors: Immune Regulators with or without SAP-Family Adaptors. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, (2010).
347. Clarkson, N. G. & Brown, M. H. Inhibition and Activation by CD244 Depends on CD2 and Phospholipase C-1. *J. Biol. Chem.* 284, 24725-24734 (2009).
348. Tarazona, R. *et al.* Human prostasomes express CD48 and interfere with NK cell function. *Immunobiology.* ;216(1-2):41-6. (2011).
349. Wetzler, M. *et al.* HLA class I antigen cell surface expression is preserved on acute myeloid leukemia blasts at diagnosis and at relapse.
350. Shimizu, K. *et al.* NK and NKT Cell-Mediated Immune Surveillance against Hematological Malignancies. *Cancers* ;12(4):817. (2020).
351. Lupo, K. B. & Matosevic S Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy. *Cancers* ;11(6):769. (2019).
352. Li, C., Houser, B. L., Nicotra, M. L. & Strominger, J. L. HLA-G homodimer-induced cytokine secretion through HLA-G receptors on human decidual macrophages and natural killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 5767-5772 (2009).
353. Zheng, J. *et al.* Inhibitory receptors bind Angptls and support blood stem cells and leukemia development. *Nature.* 485, 656-660 (2012).
354. Sanchez-Correa, B. *et al.* Modulation of NK cells with checkpoint inhibitors in the context of cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* ;68(5):861-870. (2019).
355. Merino, A. *et al.* Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J Clin Invest.* ;129(9):3770-3785. (2019).
356. Stringaris, K. *et al.* Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 99, 836-847 (2014).
357. Sun, C. *et al.* High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology.* ;6(1):e1264562 (2016).

358. Salik, B., Smyth, M. J. & Nakamura, K. Targeting immune checkpoints in hematological malignancies. *Journal of Hematology & Oncology* 13, 111 (2020).
359. Stanietzky, N. *et al.* The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 20;106, 17858-17863 (2009).
360. Yu, X. *et al.* The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 48-57 (2009).
361. Lepletier, A. *et al.* The immune checkpoint CD96 defines a distinct lymphocyte phenotype and is highly expressed on tumor-infiltrating T-cells. *Immunol Cell Biol.* ;97(2):152-164 (2019).
362. Sanchez-Correa, B. *et al.* Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol. Cell Biol.* 90, 109-115 (2012).
363. Stannard, K. A. *et al.* Human peripheral blood DNAM-1(neg) NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions. *Blood advances*, 3(11), 1681-1694. (2019).
364. Peng, L. S. *et al.* Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget.* ;7(34):55222-55230. (2016).
365. Kong, Y. *et al.* T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clin Cancer Res.* ;22(12):3057-66 (2016).
366. Hattori, N. *et al.* Monitoring TIGIT/DNAM-1 and PVR/PVRL2 Immune Checkpoint Expression Levels in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant.* ;25(5):861-867. (2019).
367. Sun, H. *et al.* Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology.* 2019 Jul;70(1):168-183. (2019).
368. Mittal, D. *et al.* CD96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8 + T-cell Antitumor Function. *Cancer Immunology Research* 7, (2019).
369. Valhondo, I. *et al.* Characterization of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE Axis on Circulating NK, NKT-Like and T Cell Subsets in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Cancers (Basel).* 12(8):2171 (2020).
370. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557-567 (2003).
371. Stein, N., Tsukerman, P. & Mandelboim, O. The paired receptors TIGIT and DNAM-1 as targets for therapeutic antibodies. *Hum. Antibodies.* 25, 111-119 (2017).
372. Wang, Y. *et al.* NK cells play a significant role in immunosurveillance at the early stage of MLL-AF9 acute myeloid leukemia via CD226/CD155 interactions. *Sci. China Life Sci.* 58, 1288-1298 (2015).
373. Carlsten, M. *et al.* Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J Immunol.* ;183(8):4921-30 (2009).
374. Okumura, G. *et al.* Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells. *The Journal of experimental medicine* 217, (2020).

375. Johnston, R. J. *et al.* The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* 26, 923-937 (2014).
376. Bennett, F. *et al.* Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J. Immunol.* 170, 711-718 (2003).
377. Annunziato, F. *et al.* Expression and release of LAG-3-encoded protein by human CD4+ T cells are associated with IFN-gamma production. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.* 10. 769-776 (1996).
378. Cook, K. D. & Whitmire, J. K. LAG-3 Confers a Competitive Disadvantage upon Antiviral CD8+ T Cell Responses. *J. Immunol.* 197, 119-127 (2016).
379. Byun, H. J. *et al.* Proliferation of activated CD1d-restricted NKT cells is down-modulated by lymphocyte activation gene-3 signaling via cell cycle arrest in S phase. *Cell Biol Int.* ;31(3):257-62. (2007).
380. Huard, B., Tournier, M. & Triebel, F. LAG-3 does not define a specific mode of natural killing in human. *Immunol. Lett.* 61, 109-112 (1998).
381. Miyazaki, T., Dierich, A. F., Benoist, C. F. & Mathis, D. Independent modes of natural killing distinguished in mice lacking Lag3. *Science.* ;272(5260):405-8. (1996).
382. Long, L. *et al.* The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer.* 9, 176-189 (2018).
383. Prigent, P., El Mir S, Dréano M & Triebel F Lymphocyte activation gene-3 induces tumor regression and antitumor immune responses. *Eur J Immunol.* 29(12):3867-76. (1999).
384. Li, N., Jilishan, B., Wang, W., Tang, Y. & Keyoumu, S. Soluble LAG3 acts as a potential prognostic marker of gastric cancer and its positive correlation with CD8+T cell frequency and secretion of IL-12 and INF-gamma in peripheral blood. *Cancer Biomark.* 23, 341-351 (2018).
385. Xu, F. *et al.* LSEctin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res.* ;74(13):3418-28. d (2014).
386. Hastings, W. D. *et al.* TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol.* ;39(9):2492-501 (2009).
387. Ferris, R. L., Lu, B. & Kane, L. P. Too much of a good thing? Tim-3 and TCR signaling in T cell exhaustion. *J. Immunol.* 193, 1525-1530 (2014).
388. Ndhlovu, L. C. *et al.* Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood.* 19;119, 3734-3743 (2012).
389. Li, Y., Li, D. & Du, M. TIM-3: a crucial regulator of NK cells in pregnancy. *Cell Mol. Immunol.* cmi201785 (2017).
390. Xu, L. *et al.* Increased Tim-3 expression in peripheral NK cells predicts a poorer prognosis and Tim-3 blockade improves NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma. *Int. Immunopharmacol.* 29, 635-641 (2015).

391. Gleason, M. K. *et al.* Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood*. 119, 3064-3072 (2012).
392. Jayaraman, P. *et al.* Tim3 binding to galectin-9 stimulates antimicrobial immunity. *J. Exp. Med.* 207, 2343-2354 (2010).
393. Yu, Q. *et al.* CEACAM1 (CD66a) promotes human monocyte survival via a phosphatidylinositol 3-kinase- and AKT-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 281, 39179-39193 (2006).
394. Xu, J. *et al.* Characterizing the Tumor Suppressor Role of CEACAM1 in Multiple Myeloma. *Cell Physiol Biochem.* 45, 1631-1640 (2018).
395. Zaghoul, A., Morsi, H., Ismail, M., Teama, S. & Abdulateef, N. Soluble carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1,6 and 8 in acute myeloid leukemia: their relation to survival and prognosis. *Life Science Journal* 15, 11 (2018).
396. Patsoukis, N. *et al.* Interaction of SHP-2 SH2 domains with PD-1 ITSM induces PD-1 dimerization and SHP-2 activation. *Commun. Biol.* 3: (2020).
397. Wherry, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*. 27, 670-684 (2007).
398. Tan, J. *et al.* Increased PD-1+Tim-3+ exhausted T cells in bone marrow may influence the clinical outcome of patients with AML. *Biomarker research*, 8, 6. (2020).
399. Kim, N. & Kim, H. S. Targeting Checkpoint Receptors and Molecules for Therapeutic Modulation of Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 9:2041., (2018).
400. Pesce, S. *et al.* Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A-phenotypic and functional characterization. *Allergy Clin Immunol.* ;139(1):335-346. (2017).
401. Della, C. M. *et al.* Features of Memory-Like and PD-1+ Human NK Cell Subsets. *Front Immunol.* 7, (2016).
402. Benson, D. M., Jr. *et al.* The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody.
403. Shen, X. & Zhao, B. Efficacy of PD-1 or PD-L1 inhibitors and PD-L1 expression status in cancer: Meta-analysis. *BMJ* 362, 3529 (2018).
404. Bardhan, K., Anagnostou, T. & Boussiotis, V. A. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol.* 12:7:550 (2016).
405. Fife, B. T. *et al.* Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.* 10, 1185-1192 (2009).
406. Chen, R. *et al.* Phase II Study of the Efficacy and Safety of Pembrolizumab for Relapsed/Refractory Classic Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* ;35(19):2125-2132. (2017).
407. Lichtenegger, F. S. *et al.* Targeting LAG-3 and PD-1 to Enhance T Cell Activation by Antigen-Presenting Cells. *Front Immunol.* 9:385., (2018).

408. Kikushige, Y. *et al.* TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell.* 7, 708-717 (2010).
409. Asayama, T. *et al.* Functional expression of Tim-3 on blasts and clinical impact of its ligand galectin-9 in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget.* 8, 88904-88917 (2017).
410. Zhang, Y. *et al.* Tim-3 negatively regulates IL-12 expression by monocytes in HCV infection. *PLoS. One.* 6, e19664 (2011).

Anexos

a) Índice de figuras

Introducción

Figura 1.- *Proceso de Hematopoyesis*

Figura 2.- *Clases moleculares de LMA y mutaciones genéticas concurrentes*

Figura 3.- *Cambios moleculares y de fenotipo celular asociados a la edad*

Figura 4.- *Cambios asociados a la edad como impulsores de la progresión tumoral*

Figura 5.- *Microambiente Tumoral (Equilibrio entre las respuestas Th1 y Th2)*

Figura 6.- *Células linfoides Innatas (ILC)*

Figura 7.- *Receptores activadores e inhibidores y sus ligandos*

Figura 8.- *Estructura de los dominios de los NCR: NKp44, NKp46 y NKp30*

Figura 9.- *Ligandos de los receptores NCR*

Figura 10.- *Señalización intracelular de NKG2D*

Figura 11.- *Señalización intracelular de CD6*

Figura 12.- *Señalización intracelular de CD244*

Figura 13.- *Interacción molecular de receptores de HLA-I con sus ligandos*

Figura 14.- *Los receptores DNAM-1/TIGIT/PVRIG/TACTILE y sus ligandos CD155 y CD112*

Figura 15.- *Señales intracelulares de activación e inhibición*

Figura 16.- *Interacción de los blastos de LMA con el Sistema Inmunitario*

Figura 17.- *Anticuerpos conjugados con toxinas y BITE (anticuerpos biespecíficos)*

Figura 18.- *Anticuerpos dirigidos a bloquear proteínas de superficie*

Figura 19.- *Ventajas de la inmunoterapia basada en la terapia adoptiva de células TCR-NK*

Materiales y métodos

Figura 20.- *Estrategia de análisis para la selección de la población total de linfocitos*

Figura 21.- *Estrategia de análisis para subpoblaciones de linfocitos*

Resultados

Figura 22.- *Análisis de poblaciones linfocitarias en sangre periférica*

Figura 23.- *Análisis de poblaciones: células NK, NK CD56dim y CD56bright*

Figura 24.- *Análisis de subpoblaciones de células NK: CD56+16-, CD56+16+ y CD56-16+*

Figura 25.- *Análisis de células NK CD8+*

Figura 26.- *Análisis de poblaciones: células NKT-like y células T*

Figura 27.- *Curvas de Supervivencia: Población de linfocitos*

Figura 28.- *Curvas de Supervivencia: Subpoblaciones linfocitarias*

Figura 29.- *Análisis de poblaciones CD57+*

- Figura 30.-** *Análisis de CD16*
- Figura 31.-** *Curvas de Supervivencia: CD16*
- Figura 32.-** *Análisis de los receptores NCRs en las células NK, NKT-like (b) y células T*
- Figura 33.-** *Análisis de la coexpresión de los receptores NCRs en células NK*
- Figura 34.-** *Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56+CD16-*
- Figura 35.-** *Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56+CD16+*
- Figura 36.-** *Coexpresión de los NCRs en las células NK CD56-CD16+*
- Figura 37.-** *Análisis de Supervivencia: NKp46, NKp30 y NKp44*
- Figura 38.-** *Análisis de Supervivencia: coexpresión de NKp46, NKp30 y NKp44 en células NK*
- Figura 39.-** *Análisis de la expresión de NKp80 en las células NK, NKT-like y T*
- Figura 40.-** *Análisis de la expresión de NKp80 en las células NKT-like CD4+ y T CD4*
- Figura 41.-** *Análisis de Supervivencia: NKp80*
- Figura 42.-** *Análisis de la expresión de NKG2D en células NK, NKT-like y T*
- Figura 43.-** *Análisis del ligando MICA en los blastos de LMA*
- Figura 44.-** *Correlación entre el porcentaje de expresión de MICA/B y el porcentaje de blastos*
- Figura 45.-** *Análisis de Supervivencia: NKG2D*
- Figura 46.-** *Análisis de la expresión de CD6 en células NK, NKT-like y T*
- Figura 47.-** *Análisis de Supervivencia: CD6*
- Figura 48.-** *Análisis de la expresión de CD244*
- Figura 49.-** *Análisis del ligando CD48 en los blastos de LMA*
- Figura 50.-** *Análisis de Supervivencia: CD244*
- Figura 51.-** *Análisis de la expresión de KIR en células NK, NKT-like y T*
- Figura 52.-** *Análisis de Supervivencia: KIR*
- Figura 53.-** *Análisis de la expresión de CD85j en células NK, NKT-like y T*
- Figura 54.-** *Análisis de la expresión de CD85j en células CD8+*
- Figura 55.-** *Análisis de Supervivencia: CD85j*
- Figura 56.-** *Análisis de la expresión de NKG2C/A en células NK, NKT-like y T*
- Figura 57.-** *Análisis de Supervivencia: NKG2C*
- Figura 58.-** *Análisis de Supervivencia: NKG2A*
- Figura 59.-** *Análisis del ligando HLA-I en los blastos de LMA.*
- Figura 60.-** *Análisis de Correlación: NKG2A-HLA-I*
- Figura 61.-** *Análisis de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NK.*
- Figura 62.-** *Análisis de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células NKT-like.*

- Figura 63.-** *Análisis de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las células T.*
- Figura 64.-** *Análisis de correlación: DNAM-1-TIGIT-TACTILE*
- Figura 65.-** *Análisis de la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE*
- Figura 66.-** *Análisis de la coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE en las subpoblaciones de células T y NKT-like definidas en función de la expresión de CD4 y CD8*
- Figura 67.-** *Análisis de la coexpresión de CD155 y CD112 en blastos de LMA*
- Figura 68.-** *Análisis de correlación entre la expresión de CD155 y sus receptores*
- Figura 69.-** *Análisis de supervivencia: DNAM-1, TIGIT y TACTILE*
- Figura 70.-** *Análisis de supervivencia: coexpresión de DNAM-1, TIGIT y TACTILE*
- Figura 71.-** *Análisis de la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NK*
- Figura 72.-** *Análisis de la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NKT-like*
- Figura 73.-** *Análisis de la expresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células T*
- Figura 74.-** *Análisis de la coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en células NK, NKT-like y T*
- Figura 75.-** *Análisis de la coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en linfocitos T CD4+, CD8+ y CD4-CD8 -*
- Figura 76.-** *Análisis de coexpresión de los ligandos de PD-1 en blastos de LMA*
- Figura 77.-** *Análisis de correlación: células NKT-like PD-1+ y blastos de AML CD273+*
- Figura 78.-** *Análisis de los ligandos L-SECTIN y CEACAM-1 en blastos de LMA*
- Figura 79.-** *Análisis de supervivencia: LAG3, TIM3 y PD-1 en células NK, NKT-like y T*
- Figura 80.-** *Análisis de supervivencia: coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células NK*
- Figura 81.-** *Análisis de supervivencia: coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en células NKT-like*
- Figura 82.-** *Análisis de supervivencia: coexpresión de LAG3, TIM3 y PD-1 en las células*
- Figura 83.-** *Matriz de correlación entre variables de células NK (heatmap)*
- Figura 84.-** *Matriz de correlación entre variables de células NKT-like (heatmap)*
- Figura 85.-** *Matriz de correlación entre variables en las células T (heatmap)*
- Figura 86.-** *Análisis de las poblaciones linfocitarias en la Médula Ósea y Sangre Periférica de los pacientes de LM*
- Figura 87.-** *Análisis de subpoblaciones de células NK, NKT-like y linfocitos T en la Médula Ósea y Sangre Periférica de los pacientes de LMA*
- Figura 88.-** *Análisis de receptores de células NK de médula ósea vs sangre periférica*
- Figura 89.-** *Análisis de receptores de células NKT-like de médula ósea vs sangre periférica*
- Figura 90.-** *Análisis de receptores de células T de médula ósea vs sangre periférica*
- Figura 91.-** *Análisis de la expresión de ligandos en blastos de LMA*
- Figura 92.-** *Matriz de correlación: ligandos expresados en blastos de LMA*
- Figura 93.-** *Análisis de supervivencia: ligandos expresados en blastos leucémicos*

Figura 94.- *Contenido intracelular de Perforina, Granulisina y Granzima B en las células NK*

Figura 95.- *Contenido intracelular de Perforina, Granulisina y Granzima B en las células NKT-like*

Figura 96.- *Contenido intracelular de Perforina, Granulisina y Granzima B en las células T*

Figura 97.- *Análisis de correlaciones: proteínas citotóxicas intracelulares-receptores de superficie en las células NK*

Figura 98.- *Análisis de correlaciones: proteínas citotóxicas intracelulares-receptores de superficie en las células NKT-like*

Figura 99.- *Análisis de correlaciones: proteínas citotóxicas intracelulares-receptores de superficie en las células T*

Figura 100.- *Análisis de Supervivencia: Perforina, Granulisina y Granzima B en células NK, NKT-like y T*

b) Índice de Tablas

Introducción

Tabla I.- *Clasificación de la LMA según FAB*

Tabla II.- *Clasificación de la LMA según la OMS*

Tabla III.- *Clasificación del riesgo citogenético de la LMA (ELN 2017)*

Tabla IV.- *Ensayos Clínicos basados en el bloqueo de Checkpoints en LMA*

Tabla V.- *Ensayos Clínicos basados en terapia adoptiva de células NK en pacientes de LMA*

Materiales y método

Tabla VI. - *Características clínicas de los pacientes de LMA*

Tabla VII.- *Listado de anticuerpos por casas comerciales*

Tabla VIII.- *Controles isotípicos*

Tabla IX.- *Panel de análisis de marcadores de superficie de linfocitos*

Tabla X.- *Panel de análisis de marcadores de superficie de blastos de LMA*

Tabla XI.- *Panel de análisis de proteínas citotóxicas intracelulares*

Resultados

Tabla XII.- *Subpoblaciones de células NKT-like y células T*

Tabla XIII.- *Receptores de HLA-I: correlaciones*




c) Abreviaturas

ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ATRA: Ácido trans retinoico
CD: cluster of differentiation, grupo de diferenciación
CHM: Complejo Mayor de Histocompatibilidad
DC: Células dendríticas
EICH: Enfermedad de injerto contra el huesped
FAB: Franco-Americana-Británica
Fas-L: Ligando de Fas
Fc: Fracción cristalizada
GM-CSF: Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
GVL: Injerto contra leucemia (graft-versus-leukemia)
HCMV: Virus del citomegalovirus humano
HDAC: Actividad histona deacetil-transferasa
HSC: Trasplante de progenitores hematopoyéticos
iDC: Células dendríticas inmaduras
IFN: Interferón
Ig: Inmunoglobulina
IL: Interleuquina
ITAM: Motivo activador del inmunorreceptor basado en tirosinas
ITIM: Motivo inhibidor del inmunorreceptor basado en tirosinas
KIR: Killer immunoglobulin like Receptor
LAK: Células asesinas activadas por citoquinas
LMA: Leucemia Mieloide Aguda
LPA: Leucemia promielocítica aguda
mDC: Células dendríticas maduras
MDCS: Célula supresora derivada de mieloide
MDR: Resistencia a multidroga
MIP: Proteínas inflamatorias del macrófago
NCAM: Molécula de adhesión de células nerviosas
NCR: Receptores citotóxicos naturales
NK: Células Natural Killer o asesinas naturales
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBMCs: Células Mononucleadas de Sangre Periférica
PML-RAR α : Promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha
PVR: Receptor del poliovirus
RC: Remisión Completa
SG: Supervivencia General
SMD: Síndrome Mielodisplásico
SSC: Side Scatter
TCR: Receptor de células T
TGF: Factor de crecimiento tumoral
Th1: Células T colaboradoras (helper) de tipo 1
Th2: Células T colaboradoras (helper) de tipo 2
TNF: Factor de necrosis tumoral
Treg: Células T reguladoras
VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

d) Publicaciones

Review

DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy

Beatriz Sanchez-Correa ^{1,†}, Isabel Valhondo ^{1,†}, Fakhri Hassouneh ^{1,†}, Nelson Lopez-Sejas ¹, Alejandra Pera ^{2,3} , Juan M. Bergua ⁴, Maria Jose Arcos ⁴, Helena Bañas ⁴, Ignacio Casas-Avilés ⁴, Esther Durán ⁵, Corona Alonso ^{2,6}, Rafael Solana ^{2,3,6,*}  and Raquel Tarazona ^{1,*} 

¹ Immunology Unit, Department of Physiology, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; beatrizsanchezcorrea@gmail.com (B.S.-C.); ivalhondog@gmail.com (I.V.); hassounehfakhri@yahoo.com (F.H.); nelsonj836@hotmail.com (N.L.-S.)

² Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), 14004 Córdoba, Spain; alejandrapera@gmail.com (A.P.); corona_alonso@hotmail.com (C.A.)

³ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Córdoba, 14004 Córdoba, Spain

⁴ Department of Hematology, Hospital San Pedro de Alcántara, 10003 Cáceres, Spain; jmbergua@icloud.com (J.M.B.); mjarcar@yahoo.es (M.J.A.); cromacita@gmail.com (H.B.); nachocasas@hotmail.com (I.C.-A.)

⁵ Histology and Pathology Unit, Faculty of Veterinary, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; esther@unex.es

⁶ Reina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain

* Correspondence: rsolana@uco.es (R.S.); rtarazon@unex.es (R.T.); Tel.: +34-927257000 (ext. 51322) (R.T.)

† These authors contributed equally to this manuscript.

Received: 19 May 2019; Accepted: 21 June 2019; Published: 23 June 2019



Abstract: Natural killer (NK) cells are lymphocytes of the innate immune response characterized by their role in the destruction of tumor cells. Activation of NK cells depend on a fine balance between activating and inhibitory signals mediated by different receptors. In recent years, a family of paired receptors that interact with ligands of the Nectin/Nectin-like (Necl) family has attracted great interest. Two of these ligands, Necl-5 (usually termed CD155 or PVR) and Nectin-2 (CD112), frequently expressed on different types of tumor cells, are recognized by a group of receptors expressed on T and NK cells that exert opposite functions after interacting with their ligands. These receptors include DNAM-1 (CD226), TIGIT, TACTILE (CD96) and the recently described PVRIG. Whereas activation through DNAM-1 after recognition of CD155 or CD112 enhances NK cell-mediated cytotoxicity against a wide range of tumor cells, TIGIT recognition of these ligands exerts an inhibitory effect on NK cells by diminishing IFN- γ production, as well as NK cell-mediated cytotoxicity. PVRIG has also been identified as an inhibitory receptor that recognizes CD112 but not CD155. However, little is known about the role of TACTILE as modulator of immune responses in humans. TACTILE control of tumor growth and metastases has been reported in murine models, and it has been suggested that it negatively regulates the anti-tumor functions mediated by DNAM-1. In NK cells from patients with solid cancer and leukemia, it has been observed a decreased expression of DNAM-1 that may shift the balance in favor to the inhibitory receptors TIGIT or PVRIG, further contributing to the diminished NK cell-mediated cytotoxic capacity observed in these patients. Analysis of DNAM-1, TIGIT, TACTILE and PVRIG on human NK cells from solid cancer or leukemia patients will clarify the role of these receptors in cancer surveillance. Overall, it can be speculated that in cancer patients the TIGIT/PVRIG pathways are upregulated and represent novel targets for checkpoint blockade immunotherapy.

Keywords: NK cells; cancer immunotherapy; CD155; CD112; DNAM-1; PVRIG; TACTILE; TIGIT

1. Introduction

The immune system response to pathogens is controlled by different regulatory mechanisms to maintain tolerance to self and protect tissue integrity. Several signaling pathways mediated by inhibitory receptors have been described to contribute to immune homeostasis while defending against infected and transformed cells. Among these inhibitory receptors, cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) and programmed cell death protein 1 (PD-1) have been well characterized in T cells and have been shown to play an important role in regulating T cell activation and effector functions, particularly in the context of cancer immunology [1]. The use of monoclonal antibodies (mAbs) targeting CTLA-4 or PD-1 checkpoint pathways have been approved for clinical use leading to durable clinical responses in various cancer types [2–4]. CTLA-4 is a co-inhibitory receptor that shares the same ligands (B7 family that includes CD80 and CD86) with CD28, the main T cell co-stimulatory signal, constituting the first evidence for paired activating-inhibitory receptors on T cells interacting with the same ligands expressed on other cell types [5]. Thus, inhibitory signals provided by an ample array of receptors are essential for immune homeostasis and tolerance of both T cells and natural killer (NK) cells. However, inhibitory signals also contribute to the immunosuppressive microenvironment in cancer and are preferred targets for cancer immunotherapy since checkpoint blockade therapy has been particularly successful in some cancer settings such as melanoma.

CD28 and CTLA-4 are paired receptors that, by interacting with B7 family ligands, regulate T cell activation but are not involved in the regulation of human NK cell function. Other two major families of paired co-stimulatory and inhibitory receptors that regulate NK cell function have been defined in humans. (i) The MHC class I-specific receptors such as Killer Immunoglobulin-like receptors (KIR) and NKG2 families [6] that include activating and inhibitory forms, and (ii) a group of receptors that interact with molecules of the Nectins and Nectin-like (Necls) family [7] and that include the activating receptor DNAM-1 (DNAX-associated molecule 1) and the inhibitory receptors TIGIT (T-cell immunoglobulin and ITIM domain), PVRIG (PVR-related Ig domain) and TACTILE (T cell activation, increased late expression), that constitute the TIGIT/PVRIG/TACTILE inhibitory axis involved in the control of NK cell function.

NK cells are innate lymphoid cells (ILC) playing major roles in the defense against tumors and virus-infected cells. NK cell constitutive expression of lytic proteins makes them ready-to-lyse target cells. NK cells recognize transformed cells that have lost the expression of major histocompatibility complex (MHC) antigens. In humans, peripheral blood NK cells can be classified into different subsets according to their surface receptor expression and functionality [8,9]. In addition, activated NK cells release interferon (IFN)- γ and tumor necrosis factor (TNF)- α that are involved in the destruction of target cells and promote inflammatory responses [10]. NK cell ability to lyse transformed cells without antigen-specificity makes them unique candidates for cancer treatment. NK cell function depends on a complex balance between signals transmitted through activating receptors and inhibitory receptors.

The major NK cell inhibitory receptors KIR and NKG2A recognize human leukocyte antigens (HLA) class I molecules and prevent NK cell-mediated lysis of healthy cells [11]. HLA class I loss is a frequent event on tumor-transformed cells and virus-infected cells that increases their susceptibility to NK cell-mediated lysis, whereas cancer cells expressing HLA class I molecules are resistant to NK cell-mediated lysis. The anti-leukemia role of NK cells is supported by studies on haemopoietic stem cell transplantation showing that alloreactive NK cells (KIR mismatched) derived from haploidentical donors kill leukemia blasts preventing leukemia relapse [12,13]. NK cells are the first lymphocytes to appear after haemopoietic stem cell transplantation but frequently are dysfunctional compared to NK cells from healthy donors. Different strategies have been designed for NK cell manipulation including the use of checkpoint inhibitors [14]. Many studies have reported downregulation of activating receptors in peripheral blood NK cells from patients with hematological malignancies and solid cancers that correlated with disease progression. Despite the NK cells limited ability to infiltrate solid tumors and reduced cytotoxicity, accumulated evidence shows a role for NK cells in the control

of metastasis [15,16]. However, little is known concerning infiltrating NK cells in solid tumor and the immunotherapeutic approaches designed to enhance NK cell activity in solid tumors [17].

Indeed, NK cell-mediated anti-tumor responses are also governed by other inhibitory receptors expressed on different immune cells including NK cells, such as T-cell Ig and mucin-containing domain-3 (Tim-3) [18], Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3) [19] and PD-1 [20] whose ligands are non-MHC class I related molecules (Figure 1). NK cell inhibitory receptors act as immune checkpoints controlling NK cell activation and effector function via engagement of these checkpoints by their ligands on target cells. In the last decade, blockade of these checkpoints offers novel opportunities for cancer immunotherapy [21,22].

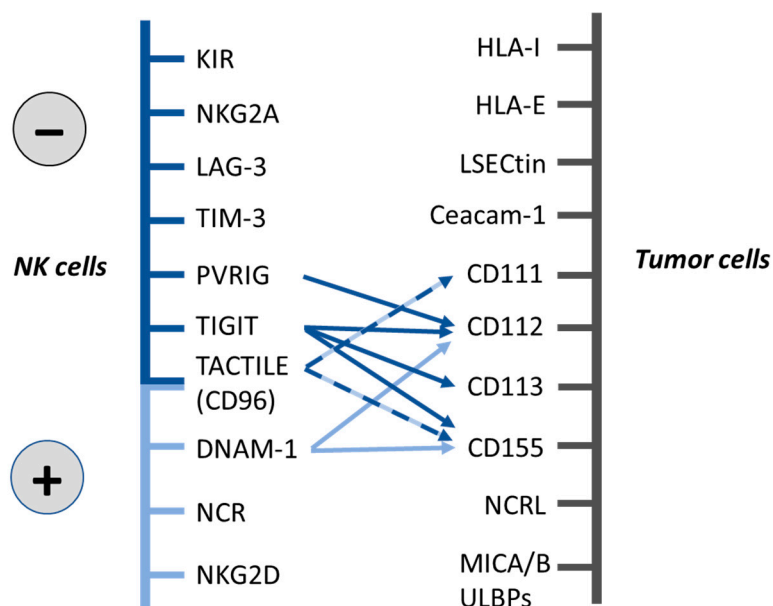


Figure 1. Natural killer (NK) cell activating and inhibitory receptors and their ligands on tumor cells. Inhibitory receptors are indicated in dark blue and activating receptors in light blue. While mouse TACTILE expresses only intracytoplasmic inhibitory motifs, human TACTILE expresses both inhibitory and activating motifs (indicated with dotted dark blue-light blue arrows).

Recently, another family of paired receptors that interact with ligands of the family of Nectins and Nectin-like molecules (Necls) has attracted great interest [23,24]. Thus, DNAM-1 (also known as CD226) [25], TACTILE (also known as CD96) [24,26], TIGIT [24,27], and PVRIG [28,29] are receptors that share the same ligands, CD155 (Necl-5) and/or CD112 (Nectin-2), that are also known to exert opposite functions on T and NK cells functions. Whereas DNAM-1 is an activating/co-stimulatory receptor [30] involved in recognition and lysis of tumor cells, TIGIT [27] and PVRIG [28] engagement inhibit NK cell function.

Advances in NK cell-based immunotherapy against cancer rely on the studies of NK cell phenotype (e.g., expression of inhibitory and activating receptors) and lytic capacity (balance between activating and inhibitory signals) that can be regulated by cytokines and on the studies of checkpoint blockade with mAb. In this context, the analysis of the activating receptor DNAM-1 and its paired receptors TIGIT, PVRIG and TACTILE opens new therapeutic possibilities.

2. Nectin and Nectin-Like Protein: Expression on Tumor Cells and Their Recognition by NK Cells

Nectins and nectin-like molecules (Necls) are a family of cell adhesion molecules that belong to the immunoglobulin superfamily. They are expressed in many different cell types and mediate both homotypic and heterotypic cell-cell adhesion. Besides their role in cell adhesion, it has been shown that several members of this family can serve as virus receptors (herpesvirus 1 or poliovirus).

In addition, some Nectins or Necls can be expressed on cells of the immune system playing an immunoregulatory function by interacting with receptors expressed at the cell surface of other immune cells [31]. As indicated above, some members of this Nectins and Necls family (Nectin-2 and Necl-5) have attracted great interest for their potential use as cancer biomarkers, as they are overexpressed on a variety of tumor cells from different origins, and as potential targets in cancer immunotherapy as they can be recognized by activating and inhibitory paired-receptors expressed on NK cells [23,32–34].

2.1. CD155 or Necl-5

CD155, also referred as Necl-5, as it belongs to the Necls molecule family, was originally identified as a poliovirus receptor (PVR). It is an immunoglobulin (Ig)-like adhesion molecule, with an important role in cell migration and proliferation [31,35,36]. In the field of tumor immunology, CD155 has gained an importance as it is overexpressed in various human malignancies and is involved in mediating tumor cell invasion and migration [37,38]. As it will be reviewed below, CD155 has an important immunoregulatory functions through its interactions with both co-stimulatory receptor DNAM-1 (CD226) and co-inhibitory receptor TIGIT and TACTILE (CD96) on NK and T cells [39–41].

2.2. CD112 or Nectin-2

Another member of the Nectin-family molecules is CD112, also termed Nectin-2 or poliovirus receptor-related 2 protein (PVRL2). It is an adhesion molecule that belongs to the Ig gene superfamily and it is involved in the formation of cell junctions [42]. CD112 is closely connected to tumorigenesis, being overexpressed in different types of cancers such as acute myeloid leukemia, multiple myeloma and epithelial cancers [43–45]. Besides, it has been reported that CD112 expression is associated with aggressiveness and poor prognosis of gallbladder cancer [46]. CD112 is a ligand for human DNAM-1, and its interaction along with other triggering NK receptors triggers human NK cell-mediated cytotoxicity [39,47]. However, it has been reported that the inhibitory receptors TIGIT and PVRIG also recognize and interact with CD112 leading to inhibition of NK cell-mediated cytotoxicity [29,41].

2.3. CD111 (Nectin-1) and CD113 (Nectin-3)

In addition to CD112 and CD155, other Nectins have been recently identified as ligands for TACTILE and TIGIT. Thus, CD111 (Nectin-1 or PVRL1) that was previously described as a receptor for herpes viruses [48] is also a ligand for TACTILE [49], and CD113 (Nectin-3 or PVRL3), that originally was described as a member of Ig-like cell adhesion molecules [50], has recently been identified as a ligand for TIGIT [51].

3. Paired Receptors for Nectin and Nectin-Like Proteins

DNAM-1, TIGIT, PVRIG and TACTILE (CD96), constitute a group of Ig superfamily receptors that share the same ligands but show opposite functions. The DNAM-1 activating receptor and the TIGIT/PVRIG/TACTILE inhibitory axis have been shown to be key regulators of anti-tumor immune responses.

3.1. DNAM-1

DNAM-1 (also known as CD226) was first discovered as a costimulatory receptor in cytotoxic T cells that was named TLiSA1 for human T lineage-specific activation antigen [52,53]. DNAM-1 is also expressed by NK cells and other immune cells such as monocytes. The extracellular portion of DNAM-1 contains two Ig-like domains and its cytoplasmic tail contains three tyrosine residues. NK cell cytotoxicity is triggered by DNAM-1 cross-linking resulting in Fyn mediated tyrosine phosphorylation [53]. DNAM-1 ligands were identified as PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) [39,54]. DNAM-1 is associated with NK cell education [55]. Thus, according to the expression of DNAM-1 two distinct NK cell subsets have been described in mice, the DNAM1⁺ and DNAM-1⁻ subsets, with

different functions. Specifically, DNAM-1⁺ NK cells express high levels of inflammatory cytokines and high proliferative capacity whereas DNAM-1⁻ NK cells produce high levels of chemokines and have greater expression of NK cell receptor genes. DNAM-1⁻ cells differentiate from DNAM-1⁺ NK cells, suggesting that DNAM-1 expression distinguishes the NK cell maturation program status. DNAM-1 expression decreases during NK cells differentiation and the DNAM-1⁺/DNAM-1⁻ NK cells ratio diminishes from birth [30]. Nevertheless, it is not clear if this model of NK cell maturation applies also to human NK cells. Unlike the mouse, most human NK cells express DNAM-1 and its expression, together with LFA-1, has been linked to NK cell education [56,57]. However, differences in DNAM-1 expression level can represent different maturation status of human NK cells [55]. Down-regulation of DNAM-1 expression on human NK cells has been reported in healthy ageing and in several diseases including cancer [58–61].

The recognition of CD155 by DNAM-1 potentiates the cytotoxicity of NK cells against a range of tumor cells and has been shown to be critical for tumor immunosurveillance in several murine models [62–64], although its significance in immunosurveillance has been controversial as, in some experimental circumstances, the antitumoral effect of DNAM-1 was significant only when the antitumoral response induced by cytokines was analyzed [65].

Cancer cells frequently express high levels of DNAM-1's ligands and DNAM-1 activation is involved in the killing of cancer cells [33,43,44,47,66]. Indeed, NK cell-mediated lysis of cancer cells was associated with the expression of CD155 in tumor cells from neuroblastoma [67] and ovarian cancer patients [68,69]. Furthermore, the expression of DNAM-1 was decreased in NK cells from acute myeloid leukemia patients and it was negatively correlated with the expression of CD112 in blasts [43] supporting that DNAM-1 downregulation on NK cells in patients with cancer, is a consequence of the tumor burden. Increased expression of DNAM-1's ligands are induced on multiple myeloma cells after chemotherapy, increasing their susceptibility to NK cell-mediated lysis [70]. NK cells in myelodysplastic syndrome patients show reduced levels of DNAM-1 and NKG2D that correlated with bone marrow blast counts [61]. DNAM-1's ligands, CD155 and CD112, can be also expressed in some immune cells [71,72]. DNAM-1 cooperates with NKp30 in the lysis of immature dendritic cells expressing DNAM-1 ligands [71]. Activated T cells upregulate CD155 and became susceptible to NK cell-mediated killing, a process that requires the cooperation between DNAM-1 and NKG2D [72].

In the last decade, different experimental models have demonstrated the existence of NK cells with adaptive capacities to remember previous encounters with pathogens such as CMV and to mediate more effective protection against pathogens [73]. It has been shown that DNAM-1 is involved in the generation of NK cells displaying these memory-like functions [74].

The studies of the expression of DNAM-1 in NK cells supports that its interaction with its ligands on tumor cells plays an important role against different types of cancer. However, the discovery in recent years that these ligands are also recognized by inhibitory receptors makes it difficult to interpret the prognostic value of the expression of CD155 and CD112 in tumor cells.

3.2. TIGIT

TIGIT, also called VSig9, Vstm3, or WUCAM, was first identified in 2009 as a novel member of the Ig superfamily [41,51,75,76]. TIGIT is an inhibitory receptor that is expressed on immune cells such as effector and memory T cells, regulatory T cells, follicular T cells and NK cells [41,75–80]. The cytoplasmic tail contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) and an immunoglobulin tail tyrosine (ITT)-like motif, which are highly conserved between mouse and human [41,51,75,76]. Similar to DNAM-1, TIGIT binds to CD112 and CD155. TIGIT also binds to CD113, another member of the Nectin family (Figure 1) [23,51,81].

It has been suggested that the combined effects of TIGIT signaling through these pathways inhibit cytotoxicity, granule polarization and cytokine secretion in NK cells [41,82,83]. On T cells, the inhibitory effect of TIGIT was initially thought to be indirectly mediated by the induction of tolerogenic dendritic cells [51]. It was later shown that TIGIT can also directly inhibit T cell activation, proliferation and

acquisition of effector functions by targeting molecules in the TCR signaling pathway such as CD3 ϵ and PLC γ [75,78].

3.3. TACTILE

Human TACTILE, also known as CD96, was discovered in 1992 [84] and it has been investigated to a lesser extent compared to DNAM-1 or TIGIT. It is a member of the Ig superfamily whose expression is almost restricted to T and NK cells [84]. Both human and mouse TACTILE contains an ITIM-like domain in its cytoplasmic portion that mediates inhibitory signaling after engagement with its ligand. Human TACTILE also contains a YXXM motif similar to that of several activating receptors such as NKG2D, however its functional relevance is poorly understood [26]. TACTILE is constitutively expressed on resting human and murine NK cells and mediates NK cell-target cell adhesion by interacting with CD155 [40]. In addition, it has been shown that TACTILE also binds to CD111 [23,49,85] (Figure 1).

In mice, TACTILE binding to CD155 inhibits IFN- γ production [64]. In contrast, human TACTILE seems to have an enhancing effect in NK cell-mediated cytotoxicity [40]. However, Staniestsky et al. failed to confirm these results [41] and in vitro blocking experiments did not demonstrate a role of human TACTILE in NK cell killing of ovarian carcinoma cells [68] or myeloma cell lines [45]. Furthermore, no evidence of a role of TACTILE in the lysis of different tumor cells was found in mice [85].

Despite the results obtained in preclinical models, the role of TACTILE in the modulation of the effector function of human NK cells remains unclear and discrepant results have been reported. The functional discrepancies between human and murine TACTILE relate to the structural differences. The presence of the activating YXXM motif in human but not in mouse TACTILE may result in functional divergences that require further analysis. It has been suggested that human TACTILE exerts inhibitory or activating functions depending on the cell type [26]. Split variants of the second domain of human TACTILE have been described with different binding affinity to CD155 that may also have significant functional relevance [86]. In mouse models, TACTILE acts as a negative regulator of NK cell function and blockade of TACTILE with antibodies, alone or in combination with anti-CTLA-4 or anti-PD-1, promoted antitumor responses [40,64,87]. However, in humans, the role of TACTILE in controlling the activity of NK cells is unclear, since this receptor has motifs of activation and inhibition that could mediate both positive and negative signals in these cells. Additional studies are required to characterize the role of TACTILE in the activation of human NK cells to use it as a checkpoint.

3.4. PVRIG

PVRIG, also termed as CD112R, was identified in 2016 [29] as a new inhibitory receptor adding more complexity to this network. PVRIG interacts with CD112 but not with CD155 and represents a novel checkpoint for human T cells [29] and NK cells [28]. PVRIG binds with high affinity to its ligand CD112 on target cells suppressing lymphocyte cytotoxic function. It has been demonstrated that PVRIG and TIGIT are nonredundant inhibitory receptors on CD8⁺ T cells and targeting both pathways enhances antitumor responses in vitro [88].

4. DNAM-1 and TIGIT/ PVRIG/TACTILE Axis in the Recognition of Tumor Cells by NK Cells: Blockade of TIGIT and PVRIG Checkpoints in Cancer Immunotherapy

The regulation of NK cells, and also of T cells, by DNAM-1, TIGIT, PVRIG and TACTILE receptors is achieved by complex interactions with their ligands in tumor cells that, depending on the number of inhibitory receptors involved and their binding affinity for CD155 and CD112 on the target cells, will counteract or not the activation signals mediated through the DNAM-1 receptor.

The axis of DNAM-1 and TIGIT/PVRIG/TACTILE, in which shared ligands and different receptor-ligands affinities regulate the immune response, represents a novel checkpoint for improving immune responses against cancer. This balance between inhibitory and activating signals is mediated through cell signaling after the recognition of their ligands that are usually upregulated in tumor

cells [24,54,89]. CD155 interacts with DNAM-1, TIGIT and TACTILE and CD112 with DNAM-1, TIGIT and PVRIG. This axis represents a promising target for cancer immunotherapy, but its regulation remains largely unknown.

Studies on the affinity of these receptors for their ligands (Figure 2a) showed that TIGIT has a higher affinity than DNAM-1 for CD155 and competes for binding to CD155, which interrupts the activation mediated by DNAM-1 and delivers an inhibitory signal to T cells [51]. TACTILE also binds to CD155 with greater affinity than DNAM-1 but lower than TIGIT [87]. In addition, it has been proposed that TIGIT can disrupt DNAM-1 mediated co-stimulation of T cells by interfering with cis-homodimerization of DNAM-1 [90]. Thus, various mechanisms are involved in TIGIT mediated inhibition of T cells [24].

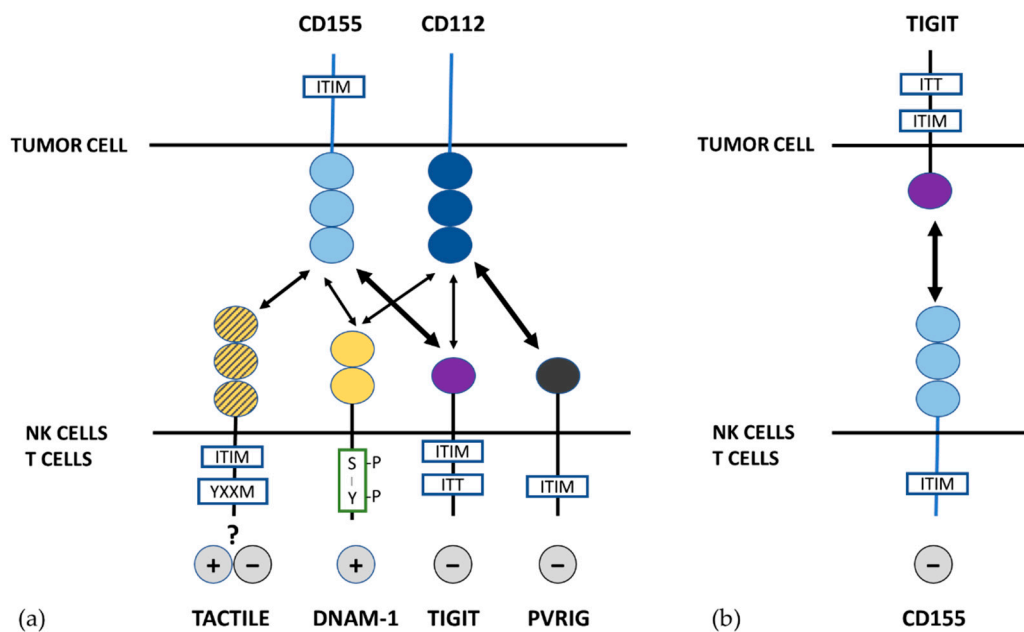


Figure 2. DNAM-1/TIGIT/PVRIG/TACTILE network and its ligands CD155 and CD112. (a) DNAM-1, TACTILE, TIGIT and PVRIG on NK and T cells interact with their ligands on tumor cells with different affinities and mediate activating and inhibitory signaling on cytotoxic cells. (b) TIGIT expressed on tumor cells may inhibit NK and T cells by interaction with CD155.

Recently, it has been described the expression of TIGIT in different murine tumor cell lines (colon cancer, breast cancer, melanoma and lung carcinoma) and human colorectal cancer that delivers inhibitory signals to CD8⁺ T cells and NK cells by engaging with CD155 expressed on these immune cells. These results suggest a new pathway for TIGIT-mediated inhibition throughout the interaction of TIGIT expressed in tumor cells with CD155 expressed in immune cells (Figure 2b). These findings support a role of tumor intrinsic TIGIT, helping tumor escape by suppressing the function of NK and CD8⁺ T cells. Interestingly, TIGIT or CD155 blockade with antibodies restores NK and CD8⁺ T cell function further supporting that targeting TIGIT-CD155 interaction could be useful for immunotherapy of cancer [91].

The effect of immunotherapy with checkpoint blockade has been shown to induce long-lasting responses in some patients with solid and hematological tumors. However, blocking a single receptor as monotherapy will unlikely elicit an effective immune response whereas combinatorial approaches should be tested to improve immune responses against cancer (Figure 3). In a similar way the recognition of CD112 on tumor cells by PVRIG expressed on T and NK cell is considered as a novel checkpoint [29]. On the contrary, although TACTILE has one intracellular inhibitory motif and transmit inhibitory signals in some experimental conditions, it also has an YxxM activating motif. Therefore, this receptor has not been considered as a therapeutic target in the immunotherapy of cancer in humans

and until now anti-TACTILE antibodies have not been considered for evaluation in clinical trials. NK cell-based immunotherapies will also benefit from approaches that reverse the immunosuppressive tumor microenvironment. In addition, chimeric antigen receptor (CAR) technology can also be used to generate novel CAR-NK cells for adoptive therapies in order to overcome the NK cell suppression by inhibitory receptors [92]. CAR engineered NK cell lines against several antigens for solid tumors that specifically lyse target cells in vitro and with efficiency in preclinical studies have been generated, as reviewed by Nayyar et al. [93].

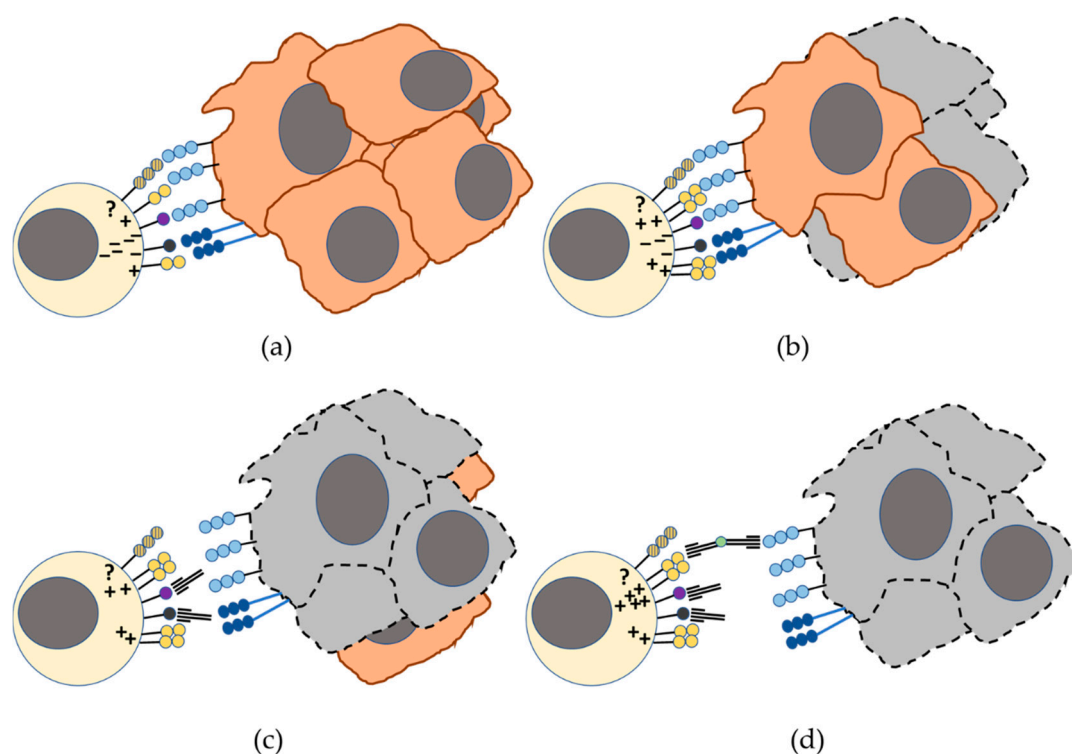


Figure 3. DNAM-1/TIGIT/ PVRIG/TACTILE axis in the recognition of tumor cells by NK cells. (a) The activation signals mediated by DNAM-1 (represented in yellow) recognition of its ligands, CD155 (represented in light blue) and CD112 (represented in dark blue), can be counteracted by inhibitory signaling through TIGIT and PVRIG inhibitory receptors (represented in purple and dark grey). In humans, the role of TACTILE (represented in shaded-yellow) in this balance requires a more detailed analysis. (b) Overexpression of DNAM-1 can induce lysis of some tumor cells but fails to eliminate the tumor. (c) TIGIT or PVRIG checkpoint blockade improves the responses mediated by DNAM-1 contributing to tumor elimination. (d) The combination of one or two checkpoint mAbs with co-stimulatory bispecific mAb (e.g., anti-DNAM-1 × anti-CD155) may result in better antitumor immune responses by increasing the interaction of DNAM-1 with its ligands. Cells surrounded by dotted lines represent dead cells.

4.1. Anti-TIGIT mAbs in Clinical Trials for Checkpoint Cancer Immunotherapy

TIGIT has emerged as a novel inhibitory receptor that can be targeted by mAb and represents a new checkpoint for the development of immunotherapy strategies against cancer. In mouse models, TIGIT in combination with PD-1 blockade has been shown to act synergistically to enhance CD8⁺ T cell function [90]. TIGIT blockade has been shown to enhance NK cell functional capacity [27]. Anti-TIGIT mAb with different isotypes and mutant forms designed to eliminate Fc-FcγR interactions, that have been shown to be deleterious in blocking PD-1 [94], have been developed for their potential as checkpoint inhibitors. Many of the clinical trials designed to analyze the significance of anti-TIGIT antibodies in cancer immunotherapy use them in combination with antibodies blocking other checkpoints, in particular PD-1/PD-1L interactions. Expression of PD-1 in NK cells is restricted to a subset of

functionally exhausted NK cells characterized for being CD56dim NKG2A–KIR+CD57+ [20]. In a recent study in murine solid tumors, the presence of NK cells was shown to be critical for the therapeutic effects of blockade of TIGIT checkpoints or the combined blockade of TIGIT and PD-1/PD-1L checkpoints [27], supporting the relevance of the TIGIT signaling pathway in the immune escape of tumor cells. In addition, these results also support that targeting different pathways by using combined anti-tumor immunotherapy strategies can be critical to revert NK cell defective capacity to eliminate cancer cells (reviewed in [93]).

The characteristics of phase 1 or phase 2 clinical trials using anti-TIGIT mAbs alone or in combination with different anti-PD-1/PD-1L mAbs, including the recruitment status (as in April 2019) and the estimated completion date, are summarized below and in Table 1.

Table 1. Clinical trials based on checkpoint blockade using mAbs against TIGIT.

Clinical Trial Identifier	Condition or Disease	α -TIGIT mAb	Intervention	Phase	Recruitment Status April 2019	Estimated Study Completion Date
NCT03119428	Advanced Cancer, Metastatic Cancer	Etiligimab (OMP-313M32)	OMP-313M32; OMP-313M32 + Nivolumab	1	Active, not recruiting	October, 2019
NCT03563716	Non-small Cell Lung Cancer	Tiragolumab (MTIG7192A)	MTIG7192A Atezolizumab; Placebo + Atezolizumab	2	Active, not recruiting	February, 2021
NCT03628677	Advanced solid tumors	AB154	AB154; AB154 + anti-PD1 (AB122)	1	Recruiting	February, 2020
NCT02964013	Advanced solid tumors	MK-7684	MK-7684; MK-7684+ Pembrolizumab	1	Recruiting	June, 2022
NCT02913313	Advanced solid tumors	BMS-986207	BMS-986207; BMS-986207 + anti-PD1	1/2	Recruiting	December, 2022
NCT03260322	Advanced solid tumors	ASP8374	ASP8374; ASP8374+ Pembrolizumab	1	Recruiting	July, 2021
NCT03945253	Advanced solid tumors	ASP8374	ASP8374	1	Not yet recruiting	December, 2022

Etiligimab (OMP-313M32) is an anti-TIGIT IgG1 mAb developed by OncoMed Pharmaceuticals. It is under study in a phase 1 clinical trial (NCT031119428) in solid tumors as monotherapy or in combination with Nivolumab (anti-PD-1).

Tiragolumab (also known as MTIG7192A and RG6058), is an anti-TIGIT mAb developed by Genentech/Roche, is a fully human IgG1 antibody that binds to human TIGIT. A phase 2 clinical trial (NCT03563716) is evaluating its use alone or in combination with Atezolizumab (anti-PD-1L) in chemotherapy-naïve patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer.

AB154, an IgG4 anti-TIGIT mAb developed by Arcus Bioscience, is included in a phase 1 clinical trial (NCT03628677) to evaluate the safety, pharmacokinetics, pharmacodynamics and preliminary efficacy in advanced solid tumors as monotherapy or combined with AB122 (anti-PD-1).

MK-7684 (IgG1) anti-TIGIT mAb was developed by Merck Sharp & Dohme and it is being evaluated in phase 1 in patients with advanced solid tumors either as monotherapy or in combination with Pembrolizumab (anti-PD-1).

In addition, two mAbs with mutated Fc to avoid binding to Fc γ R are under study:

BMS-986207 (anti-TIGIT IgG1, Fc γ R-null) from Bristol-Myers Squibb is evaluated in a phase 1/2 clinical trial (NCT02913313), as monotherapy or in combination with Nivolumab (anti-PD-1) in advanced solid tumors.

ASP8374 (anti-TIGIT IgG1, FcγR-null) developed by Astellas Pharma; Potenza Therapeutics. It leads to the activation of cytotoxic T-lymphocyte CTL mediated response against cancer cells. There are currently two clinical trials with participants with locally advanced (unresectable) or metastatic solid tumor malignancies, a phase 1 clinical trial (NCT03260322) evaluating the tolerability and safety profile of ASP8374 when administered as a single agent and in combination with Pembrolizumab and a phase 1 study (NCT03945253) to evaluate the tolerability and safety profile and to characterize the pharmacokinetic profile of ASP8374.

4.2. PVRIG as a Novel Checkpoint for Cancer Immunotherapy

PVRIG is a recently identified inhibitory receptor that interacts with CD112 competing with DNAM-1. Blocking PVRIG interaction with CD112 with antibodies enhanced T cell stimulation [29]. In humans, blockade of PVRIG and TIGIT has been shown to enhance trastuzumab-mediated NK cell response against breast cancer [28]. Antibody dependent cell cytotoxicity (ADCC) mediated by NK cells is one of the major mechanisms of action for trastuzumab against Her2 positive breast cancer. It has been shown that, among the possible strategies to enhance trastuzumab-mediated ADCC by NK cells, blockade of PVRIG enhances trastuzumab-triggered anti-breast cancer response [28], therefore supporting that this receptor plays a suppressive function on NK cells. Based on these evidences, PVRIG can be considered a therapeutic target and its blockade in vivo could imply a novel approach to improve trastuzumab efficacy in human breast cancer. Up to now there is only one anti-PVRIG antibody used in a clinical trial for cancer immunotherapy, COM701, that is being tested in a phase 1 clinical trial (NCT03667716) to evaluate its safety, tolerability and preliminary clinical activity, as monotherapy or in combination with Nivolumab, in patients with advanced solid tumors including non-small cell lung cancer, ovarian, breast and endometrial cancer.

5. Conclusions

Considering the importance of the immune regulatory network mediated by DNAM-1, TIGIT, TACTILE and PVRIG that involve Nectin and Nectin-like ligands, it is of interest to understand the mechanisms governing this axis and the factors contributing to the inhibitory/activating outcome after engagement. NK cells are now being considered a promising therapeutic target for cancer immunotherapy, due to its peculiar ability to kill diverse tumor cells. Thus, understanding of the input of immune checkpoints in the regulation of NK cell functions and determining the contribution of NK cells to the clinical interest of blockade of these checkpoints will open the door for the discovery of new therapies for different types of cancers.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities, grant number SAF2017-87538-R (to R.T.); the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, grant number PI16/01615 (to C.A.); Regional funds from Junta de Extremadura, Spain, grant number IB16164 (to R.T.). The APC was funded by Junta de Extremadura (Spain), grant number GR18085 to INPATT research group (CTS040). All grants were cofinanced by European Regional Development Funds “Una manera de hacer Europa”.

Acknowledgments: The authors apologize to those researchers whose work could not be cited.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Ribas, A.; Wolchok, J.D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **2018**, *359*, 1350–1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.; Hwu, W.J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2455–2465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; Gettinger, S.N.; Smith, D.C.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Carvajal, R.D.; Sosman, J.A.; Atkins, M.B.; et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2443–2454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Hodi, F.S.; O'Day, S.J.; McDermott, D.F.; Weber, R.W.; Sosman, J.A.; Haanen, J.B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J.C.; et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2010**, *363*, 711–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Zang, X.; Allison, J.P. The B7 family and cancer therapy: Costimulation and coinhibition. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 5271–5279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Borrego, F.; Kabat, J.; Kim, D.K.; Lieto, L.; Maasho, K.; Pena, J.; Solana, R.; Coligan, J.E. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Mol. Immunol.* **2002**, *38*, 637–660. [[CrossRef](#)]
7. Pende, D.; Spaggiari, G.M.; Marcenaro, S.; Martini, S.; Rivera, P.; Capobianco, A.; Falco, M.; Lanino, E.; Pierri, I.; Zambello, R.; et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: Evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* **2005**, *105*, 2066–2073. [[CrossRef](#)]
8. Juelke, K.; Killig, M.; Luetke-Eversloh, M.; Parente, E.; Gruen, J.; Morandi, B.; Ferlazzo, G.; Thiel, A.; Schmitt-Knosalla, I.; Romagnani, C. CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells. *Blood* **2010**, *116*, 1299–1307. [[CrossRef](#)]
9. Freud, A.G.; Mundy-Bosse, B.L.; Yu, J.; Caligiuri, M.A. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity* **2017**, *47*, 820–833. [[CrossRef](#)]
10. Sivori, S.; Vacca, P.; Del, Z.G.; Munari, E.; Mingari, M.C.; Moretta, L. Human NK cells: Surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell. Mol. Immunol.* **2019**, *16*, 430–441. [[CrossRef](#)]
11. Barrow, A.D.; Colonna, M. Exploiting NK Cell Surveillance Pathways for Cancer Therapy. *Cancers* **2019**, *11*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ruggeri, L.; Capanni, M.; Urbani, E.; Perruccio, K.; Shlomchik, W.D.; Tosti, A.; Posati, S.; Rogaia, D.; Frassoni, F.; Aversa, F.; et al. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* **2002**, *295*, 2097–2100. [[CrossRef](#)]
13. Ruggeri, L.; Mancusi, A.; Burchielli, E.; Capanni, M.; Carotti, A.; Aloisi, T.; Aversa, F.; Martelli, M.F.; Velardi, A. NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells Mol. Dis.* **2008**, *40*, 84–90. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Cooley, S.; Parham, P.; Miller, J.S. Strategies to activate NK cells to prevent relapse and induce remission following hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **2018**, *131*, 1053–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Lorenzo-Herrero, S.; Lopez-Soto, A.; Sordo-Bahamonde, C.; Gonzalez-Rodriguez, A.P.; Vitale, M.; Gonzalez, S. NK Cell-Based Immunotherapy in Cancer Metastasis. *Cancers* **2018**, *11*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Lopez-Soto, A.; Gonzalez, S.; Smyth, M.J.; Galluzzi, L. Control of Metastasis by NK Cells. *Cancer Cell* **2017**, *32*, 135–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Habif, G.; Crinier, A.; Andre, P.; Vivier, E.; Narni-Mancinelli, E. Targeting natural killer cells in solid tumors. *Cell. Mol. Immunol.* **2019**, *16*, 415–422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Ndhlovu, L.C.; Lopez-Verges, S.; Barbour, J.D.; Jones, R.B.; Jha, A.R.; Long, B.R.; Schoeffler, E.C.; Fujita, T.; Nixon, D.F.; Lanier, L.L. Tim-3 marks human natural killer cell maturation and suppresses cell-mediated cytotoxicity. *Blood* **2012**, *119*, 3734–3743. [[CrossRef](#)]
19. Sun, H.; Sun, C.; Xiao, W. Expression regulation of co-inhibitory molecules on human natural killer cells in response to cytokine stimulations. *Cytokine* **2014**, *65*, 33–41. [[CrossRef](#)]
20. Pesce, S.; Greppi, M.; Tabellini, G.; Rampinelli, F.; Parolini, S.; Olive, D.; Moretta, L.; Moretta, A.; Marcenaro, E. Identification of a subset of human natural killer cells expressing high levels of programmed death 1: A phenotypic and functional characterization. *J. Allergy Clin. Immunol.* **2017**, *139*, 335–346. [[CrossRef](#)]
21. Beldi-Ferchiou, A.; Caillat-Zucman, S. Control of NK Cell Activation by Immune Checkpoint Molecules. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 2129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kim, N.; Kim, H.S. Targeting Checkpoint Receptors and Molecules for Therapeutic Modulation of Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Martinet, L.; Smyth, M.J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 243–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Dougall, W.C.; Kurtulus, S.; Smyth, M.J.; Anderson, A.C. TIGIT and CD96: New checkpoint receptor targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* **2017**, *276*, 112–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. de Andrade, L.F.; Smyth, M.J.; Martinet, L. DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol. Cell Biol.* **2014**, *92*, 237–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Georgiev, H.; Ravens, I.; Papadogianni, G.; Bernhardt, G. Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zhang, Q.; Bi, J.; Zheng, X.; Chen, Y.; Wang, H.; Wu, W.; Wang, Z.; Wu, Q.; Peng, H.; Wei, H.; et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat. Immunol.* **2018**, *19*, 723–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Xu, F.; Sunderland, A.; Zhou, Y.; Schulick, R.D.; Edil, B.H.; Zhu, Y. Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 1367–1375. [[CrossRef](#)]
29. Zhu, Y.; Paniccia, A.; Schulick, A.C.; Chen, W.; Koenig, M.R.; Byers, J.T.; Yao, S.; Bevers, S.; Edil, B.H. Identification of CD112R as a novel checkpoint for human T cells. *J. Exp. Med.* **2016**, *213*, 167–176. [[CrossRef](#)]
30. Martinet, L.; Ferrari De, A.L.; Guillerey, C.; Lee, J.S.; Liu, J.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Hutchinson, D.S.; Kolesnik, T.B.; Nicholson, S.E.; Huntington, N.D.; et al. DNAM-1 expression marks an alternative program of NK cell maturation. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 85–97. [[CrossRef](#)]
31. Takai, Y.; Irie, K.; Shimizu, K.; Sakisaka, T.; Ikeda, W. Nectins and nectin-like molecules: Roles in cell adhesion, migration, and polarization. *Cancer Sci.* **2003**, *94*, 655–667. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Fuchs, A.; Colonna, M. The role of NK cell recognition of nectin and nectin-like proteins in tumor immunosurveillance. *Semin. Cancer Biol.* **2006**, *16*, 359–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Chan, C.J.; Andrews, D.M.; Smyth, M.J. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 246–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stanietsky, N.; Mandelboim, O. Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity. *FEBS Lett.* **2010**, *584*, 4895–4900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Mendelsohn, C.L.; Wimmer, E.; Racaniello, V.R. Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* **1989**, *56*, 855–865. [[CrossRef](#)]
36. He, Y.; Bowman, V.D.; Mueller, S.; Bator, C.M.; Bella, J.; Peng, X.; Baker, T.S.; Wimmer, E.; Kuhn, R.J.; Rossmann, M.G. Interaction of the poliovirus receptor with poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 79–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Sloan, K.E.; Eustace, B.K.; Stewart, J.K.; Zehetmeier, C.; Torella, C.; Simeone, M.; Roy, J.E.; Unger, C.; Louis, D.N.; Ilag, L.L.; et al. CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* **2004**, *4*, 73–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Gao, J.; Zheng, Q.; Xin, N.; Wang, W.; Zhao, C. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 1934–1938. [[CrossRef](#)]
39. Tahara-Hanaoka, S.; Shibuya, K.; Onoda, Y.; Zhang, H.; Yamazaki, S.; Miyamoto, A.; Honda, S.; Lanier, L.L.; Shibuya, A. Functional characterization of DNAM-1 (CD226) interaction with its ligands PVR (CD155) and nectin-2 (PRR-2/CD112). *Int. Immunol.* **2004**, *16*, 533–538. [[CrossRef](#)]
40. Fuchs, A.; Cella, M.; Giurisato, E.; Shaw, A.S.; Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3994–3998. [[CrossRef](#)]
41. Stanietsky, N.; Simic, H.; Arapovic, J.; Toporik, A.; Levy, O.; Novik, A.; Levine, Z.; Beiman, M.; Dassa, L.; Achdout, H.; et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 17858–17863. [[CrossRef](#)]
42. Lopez, M.; Aoubala, M.; Jordier, F.; Isnardon, D.; Gomez, S.; Dubreuil, P. The human poliovirus receptor related 2 protein is a new hematopoietic/endothelial homophilic adhesion molecule. *Blood* **1998**, *92*, 4602–4611. [[PubMed](#)]
43. Sanchez-Correa, B.; Gayoso, I.; Bergua, J.M.; Casado, J.G.; Morgado, S.; Solana, R.; Tarazona, R. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol. Cell Biol.* **2012**, *90*, 109–115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Casado, J.G.; Pawelec, G.; Morgado, S.; Sanchez-Correa, B.; Delgado, E.; Gayoso, I.; Duran, E.; Solana, R.; Tarazona, R. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 1517–1526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. El-Sherbiny, Y.M.; Meade, J.L.; Holmes, T.D.; McGonagle, D.; Mackie, S.L.; Morgan, A.W.; Cook, G.; Feyler, S.; Richards, S.J.; Davies, F.E.; et al. The requirement for DNAM-1, NKG2D, and NKp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 8444–8449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Miao, X.; Yang, Z.L.; Xiong, L.; Zou, Q.; Yuan, Y.; Li, J.; Liang, L.; Chen, M.; Chen, S. Nectin-2 and DDX3 are biomarkers for metastasis and poor prognosis of squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinoma of gallbladder. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2013**, *6*, 179–190. [[PubMed](#)]
47. Pende, D.; Bottino, C.; Castriconi, R.; Cantoni, C.; Marcenaro, S.; Rivera, P.; Spaggiari, G.M.; Dondero, A.; Carnemolla, B.; Reymond, N.; et al. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: Involvement in tumor cell lysis. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 463–469. [[CrossRef](#)]
48. Geraghty, R.J.; Krummenacher, C.; Cohen, G.H.; Eisenberg, R.J.; Spear, P.G. Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* **1998**, *280*, 1618–1620. [[CrossRef](#)]
49. Holmes, V.M.; Maluquer de, M.C.; Richards, P.T.; Roldan, J.; Bhargava, A.K.; Orange, J.S.; Krummenacher, C. Interaction between nectin-1 and the human natural killer cell receptor CD96. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0212443. [[CrossRef](#)]
50. Satoh-Horikawa, K.; Nakanishi, H.; Takahashi, K.; Miyahara, M.; Nishimura, M.; Tachibana, K.; Mizoguchi, A.; Takai, Y. Nectin-3, a new member of immunoglobulin-like cell adhesion molecules that shows homophilic and heterophilic cell-cell adhesion activities. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 10291–10299. [[CrossRef](#)]
51. Yu, X.; Harden, K.; Gonzalez, L.C.; Francesco, M.; Chiang, E.; Irving, B.; Tom, I.; Ivelja, S.; Refino, C.J.; Clark, H.; et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 48–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Burns, G.F.; Triglia, T.; Werkmeister, J.A.; Begley, C.G.; Boyd, A.W. TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J. Exp. Med.* **1985**, *161*, 1063–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shibuya, A.; Campbell, D.; Hannum, C.; Yssel, H.; Franz-Bacon, K.; McClanahan, T.; Kitamura, T.; Nicholl, J.; Sutherland, G.R.; Lanier, L.L.; et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **1996**, *4*, 573–581. [[CrossRef](#)]
54. Bottino, C.; Castriconi, R.; Pende, D.; Rivera, P.; Nanni, M.; Carnemolla, B.; Cantoni, C.; Grassi, J.; Marcenaro, S.; Reymond, N.; et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 557–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wagner, A.K.; Kadri, N.; Snall, J.; Brodin, P.; Gilfillan, S.; Colonna, M.; Bernhardt, G.; Hoglund, P.; Karre, K.; Chambers, B.J. Expression of CD226 is associated to but not required for NK cell education. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15627. [[CrossRef](#)]
56. Shibuya, K.; Lanier, L.L.; Phillips, J.H.; Ochs, H.D.; Shimizu, K.; Nakayama, E.; Nakauchi, H.; Shibuya, A. Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity* **1999**, *11*, 615–623. [[CrossRef](#)]
57. Enqvist, M.; Ask, E.H.; Forslund, E.; Carlsten, M.; Abrahamsen, G.; Beziat, V.; Andersson, S.; Schaffer, M.; Spurkland, A.; Bryceson, Y.; et al. Coordinated expression of DNAM-1 and LFA-1 in educated NK cells. *J. Immunol.* **2015**, *194*, 4518–4527. [[CrossRef](#)]
58. Campos, C.; Lopez, N.; Pera, A.; Gordillo, J.J.; Hassouneh, F.; Tarazona, R.; Solana, R. Expression of NKp30, NKp46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age. *Biogerontology* **2015**, *16*, 671–683. [[CrossRef](#)]
59. Solana, R.; Campos, C.; Pera, A.; Tarazona, R. Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr. Opin. Immunol.* **2014**, *29*, 56–61. [[CrossRef](#)]
60. Han, B.; Mao, F.Y.; Zhao, Y.L.; Lv, Y.P.; Teng, Y.S.; Duan, M.; Chen, W.; Cheng, P.; Wang, T.T.; Liang, Z.Y.; et al. Altered NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 Expression on Circulating NK Cells Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *J. Immunol. Res.* **2018**, *2018*, 6248590. [[CrossRef](#)]
61. Carlsten, M.; Baumann, B.C.; Simonsson, M.; Jadersten, M.; Forsblom, A.M.; Hammarstedt, C.; Bryceson, Y.T.; Ljunggren, H.G.; Hellstrom-Lindberg, E.; Malmberg, K.J. Reduced DNAM-1 expression on bone marrow NK cells associated with impaired killing of CD34+ blasts in myelodysplastic syndrome. *Leukemia* **2010**, *24*, 1607–1616. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]




62. Iguchi-Manaka, A.; Kai, H.; Yamashita, Y.; Shibata, K.; Tahara-Hanaoka, S.; Honda, S.; Yasui, T.; Kikutani, H.; Shibuya, K.; Shibuya, A. Accelerated tumor growth in mice deficient in DNAM-1 receptor. *J. Exp. Med.* **2008**, *205*, 2959–2964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Lakshmikanth, T.; Burke, S.; Ali, T.H.; Kimpfler, S.; Ursini, F.; Ruggeri, L.; Capanni, M.; Umansky, V.; Paschen, A.; Sucker, A.; et al. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 1251–1263. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Chan, C.J.; Martinet, L.; Gilfillan, S.; Souza-Fonseca-Guimaraes, F.; Chow, M.T.; Town, L.; Ritchie, D.S.; Colonna, M.; Andrews, D.M.; Smyth, M.J. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 431–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chan, C.J.; Andrews, D.M.; McLaughlin, N.M.; Yagita, H.; Gilfillan, S.; Colonna, M.; Smyth, M.J. DNAM-1/CD155 interactions promote cytokine and NK cell-mediated suppression of poorly immunogenic melanoma metastases. *J. Immunol.* **2010**, *184*, 902–911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Sanchez-Correa, B.; Morgado, S.; Gayoso, I.; Bergua, J.M.; Casado, J.G.; Arcos, M.J.; Bengochea, M.L.; Duran, E.; Solana, R.; Tarazona, R. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: Analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1195–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Castriconi, R.; Dondero, A.; Corrias, M.V.; Lanino, E.; Pende, D.; Moretta, L.; Bottino, C.; Moretta, A. Natural killer cell-mediated killing of freshly isolated neuroblastoma cells: Critical role of DNAX accessory molecule-1-poliovirus receptor interaction. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 9180–9184. [[CrossRef](#)]
68. Carlsten, M.; Bjorkstrom, N.K.; Norell, H.; Bryceson, Y.; van, H.T.; Baumann, B.C.; Hanson, M.; Schedvins, K.; Kiessling, R.; Ljunggren, H.G.; et al. DNAX accessory molecule-1 mediated recognition of freshly isolated ovarian carcinoma by resting natural killer cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1317–1325. [[CrossRef](#)]
69. Carlsten, M.; Norell, H.; Bryceson, Y.T.; Poschke, I.; Schedvins, K.; Ljunggren, H.G.; Kiessling, R.; Malmberg, K.J. Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 4921–4930. [[CrossRef](#)]
70. Soriani, A.; Zingoni, A.; Cerboni, C.; Iannitto, M.L.; Ricciardi, M.R.; Di Gialleonardo, V.; Cippitelli, M.; Fionda, C.; Petrucci, M.T.; Guarini, A.; et al. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* **2009**, *113*, 3503–3511. [[CrossRef](#)]
71. Pende, D.; Castriconi, R.; Romagnani, P.; Spaggiari, G.M.; Marcenaro, S.; Dondero, A.; Lazzeri, E.; Lasagni, L.; Martini, S.; Rivera, P.; et al. Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: Relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* **2006**, *107*, 2030–2036. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Ardolino, M.; Zingoni, A.; Cerboni, C.; Cecere, F.; Soriani, A.; Iannitto, M.L.; Santoni, A. DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: Relevance for NK-T cell interaction. *Blood* **2011**, *117*, 4778–4786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Sun, J.C.; Beilke, J.N.; Lanier, L.L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **2009**, *457*, 557–561. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Nabekura, T.; Kanaya, M.; Shibuya, A.; Fu, G.; Gascoigne, N.R.; Lanier, L.L. Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity* **2014**, *40*, 225–234. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Levin, S.D.; Taft, D.W.; Brandt, C.S.; Bucher, C.; Howard, E.D.; Chadwick, E.M.; Johnston, J.; Hammond, A.; Bontadelli, K.; Ardourel, D.; et al. Vstm3 is a member of the CD28 family and an important modulator of T-cell function. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 902–915. [[CrossRef](#)]
76. Boles, K.S.; Vermi, W.; Facchetti, F.; Fuchs, A.; Wilson, T.J.; Diacovo, T.G.; Cella, M.; Colonna, M. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 695–703. [[CrossRef](#)]
77. Joller, N.; Lozano, E.; Burkett, P.R.; Patel, B.; Xiao, S.; Zhu, C.; Xia, J.; Tan, T.G.; Sefik, E.; Yajnik, V.; et al. Treg cells expressing the coinhibitory molecule TIGIT selectively inhibit proinflammatory Th1 and Th17 cell responses. *Immunity* **2014**, *40*, 569–581. [[CrossRef](#)]
78. Joller, N.; Hafler, J.P.; Brynedal, B.; Kassam, N.; Spoerl, S.; Levin, S.D.; Sharpe, A.H.; Kuchroo, V.K. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 1338–1342. [[CrossRef](#)]

79. Joller, N.; Kuchroo, V.K. Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *410*, 127–156. [[CrossRef](#)]
80. Anderson, A.C.; Joller, N.; Kuchroo, V.K. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* **2016**, *44*, 989–1004. [[CrossRef](#)]
81. Stanietsky, N.; Rovis, T.L.; Glasner, A.; Seidel, E.; Tsukerman, P.; Yamin, R.; Enk, J.; Jonjic, S.; Mandelboim, O. Mouse TIGIT inhibits NK-cell cytotoxicity upon interaction with PVR. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43*, 2138–2150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Li, M.; Xia, P.; Du, Y.; Liu, S.; Huang, G.; Chen, J.; Zhang, H.; Hou, N.; Cheng, X.; Zhou, L.; et al. T-cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT) receptor/poliovirus receptor (PVR) ligand engagement suppresses interferon-gamma production of natural killer cells via beta-arrestin 2-mediated negative signaling. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 17647–17657. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Liu, S.; Zhang, H.; Li, M.; Hu, D.; Li, C.; Ge, B.; Jin, B.; Fan, Z. Recruitment of Grb2 and SHIP1 by the ITT-like motif of TIGIT suppresses granule polarization and cytotoxicity of NK cells. *Cell Death. Differ.* **2013**, *20*, 456–464. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wang, P.L.; O’Farrell, S.; Clayberger, C.; Krensky, A.M. Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily. *J. Immunol.* **1992**, *148*, 2600–2608. [[PubMed](#)]
85. Seth, S.; Maier, M.K.; Qiu, Q.; Ravens, I.; Kremmer, E.; Forster, R.; Bernhardt, G. The murine pan T cell marker CD96 is an adhesion receptor for CD155 and nectin-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2007**, *364*, 959–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Meyer, D.; Seth, S.; Albrecht, J.; Maier, M.K.; Du, P.L.; Ravens, I.; Dreyer, L.; Burger, R.; Gramatzki, M.; Schwinzer, R.; et al. CD96 interaction with CD155 via its first Ig-like domain is modulated by alternative splicing or mutations in distal Ig-like domains. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2235–2244. [[CrossRef](#)]
87. Blake, S.J.; Dougall, W.C.; Miles, J.J.; Teng, M.W.; Smyth, M.J. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5183–5188. [[CrossRef](#)]
88. Whelan, S.; Ophir, E.; Kotturi, M.F.; Levy, O.; Ganguly, S.; Leung, L.; Vaknin, I.; Kumar, S.; Dassa, L.; Hansen, K.; et al. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8(+) T-cell Function. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 257–268. [[CrossRef](#)]
89. Stein, N.; Tsukerman, P.; Mandelboim, O. The paired receptors TIGIT and DNAM-1 as targets for therapeutic antibodies. *Hum. Antibodies* **2017**, *25*, 111–119. [[CrossRef](#)]
90. Johnston, R.J.; Comps-Agrar, L.; Hackney, J.; Yu, X.; Huseni, M.; Yang, Y.; Park, S.; Javinal, V.; Chiu, H.; Irving, B.; et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 923–937. [[CrossRef](#)]
91. Zhou, X.M.; Li, W.Q.; Wu, Y.H.; Han, L.; Cao, X.G.; Yang, X.M.; Wang, H.F.; Zhao, W.S.; Zhai, W.J.; Qi, Y.M.; et al. Intrinsic Expression of Immune Checkpoint Molecule TIGIT Could Help Tumor Growth in vivo by Suppressing the Function of NK and CD8(+) T Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2821. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Barrow, A.D.; Colonna, M. Tailoring Natural Killer cell immunotherapy to the tumour microenvironment. *Semin. Immunol.* **2017**, *31*, 30–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Nayyar, G.; Chu, Y.; Cairo, M.S. Overcoming Resistance to Natural Killer Cell Based Immunotherapies for Solid Tumors. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Dahan, R.; Segal, E.; Engelhardt, J.; Selby, M.; Korman, A.J.; Ravetch, J.V. FcγR3 Modulate the Anti-tumor Activity of Antibodies Targeting the PD-1/PD-L1 Axis. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 285–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Article

Characterization of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE Axis on Circulating NK, NKT-Like and T Cell Subsets in Patients with Acute Myeloid Leukemia

Isabel Valhondo ¹, Fakhri Hassouneh ¹, Nelson Lopez-Sejas ¹, Alejandra Pera ² ,
Beatriz Sanchez-Correa ¹, Beatriz Guerrero ¹, Juan M. Bergua ³, Maria Jose Arcos ³, Helena Bañas ³,
Ignacio Casas-Avilés ³, Joaquin Sanchez-Garcia ⁴, Josefina Serrano ⁴, Carmen Martin ⁴,
Esther Duran ⁵, Corona Alonso ^{2,6,*}, Rafael Solana ^{2,6,7,*}  and Raquel Tarazona ¹ 

- ¹ Immunology Unit, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; ivalhondog@gmail.com (I.V.); hassounehfakhri@yahoo.com (F.H.); nelsonj836@hotmail.com (N.L.-S.); beatrizsanchezcorrea@gmail.com (B.S.-C.); beatrizguerrerosimon@gmail.com (B.G.); rtarazon@unex.es (R.T.)
- ² Department of Immunology and Allergy, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), 14004 Cordoba, Spain; alejandrapera@gmail.com
- ³ Department of Hematology, Hospital San Pedro de Alcantara, 10003 Caceres, Spain; jmberguaburg@gmail.com (J.M.B.); mjarcar@yahoo.es (M.J.A.); cromacita@gmail.com (H.B.); nachocasas@hotmail.com (I.C.-A.)
- ⁴ Department of Hematology, Reina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain; joaquin.sanchez@cheerful.com (J.S.-G.); josefina.serrano@iname.com (J.S.); carmen.martin.calvo.sspa@juntadeandalucia.es (C.M.)
- ⁵ Histology and Pathology Unit, Faculty of Veterinary, University of Extremadura, 10003 Cáceres, Spain; esther@unex.es
- ⁶ Department of Immunology and Allergology, Reina Sofia University Hospital, 14004 Córdoba, Spain
- ⁷ Department of Cell Biology, Physiology and Immunology, University of Cordoba, 14004 Córdoba, Spain
- * Correspondence: corona_alonso@hotmail.com (C.A.); fi1solar@uco.es (R.S.); Tel.: +34-957-011-536 (C.A. & R.S.)

Received: 11 June 2020; Accepted: 31 July 2020; Published: 5 August 2020



Abstract: *Background:* Acute myeloid leukemia (AML) remains a major clinical challenge due to poor overall survival, which is even more dramatic in elderly patients. TIGIT, an inhibitory receptor that interacts with CD155 and CD112 molecules, is considered as a checkpoint in T and NK cell activation. This receptor shares ligands with the co-stimulatory receptor DNAM-1 and with TACTILE. The aim of this work was to analyze the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in NK cells and T cell subsets in AML patients. *Methods:* We have studied 36 patients at the time of diagnosis of AML and 20 healthy volunteers. The expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in NK cells and T cells, according to the expression of CD3 and CD56, was performed by flow cytometry. *Results:* NK cells, CD56⁻ T cells and CD56⁺ T (NKT-like) cells from AML patients presented a reduced expression of DNAM-1 compared with healthy volunteers. An increased expression of TIGIT was observed in mainstream CD56⁻ T cells. No differences were observed in the expression of TACTILE. Simplified presentation of incredibly complex evaluations (SPICE) analysis of the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE showed an increase in NK and T cells lacking DNAM-1 and co-expressing TIGIT and TACTILE. Low percentages of DNAM-1⁻TIGIT⁺TACTILE⁺ NK cells and DNAM-1⁻TIGIT⁺TACTILE⁺ CD56⁻ T cells were associated with a better survival of AML patients. *Conclusions:* The expression of DNAM-1 is reduced in NK cells and in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from AML patients compared with those from healthy volunteers. An increased percentage of NK and T cells lacking DNAM-1 and co-expressing TIGIT and TACTILE is associated with patient survival, supporting the role of TIGIT as a novel candidate for checkpoint blockade.

Keywords: acute myeloid leukemia; DNAM-1; NK cells; NKT-like cells; TACTILE; T cells; TIGIT

1. Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a hematopoietic malignancy characterized by a clonal expansion of low differentiated hematopoietic precursors that infiltrate the bone marrow and limit normal hematopoiesis. Although AML occurs in all ages, it appears predominantly in older people (>60 years of age). AML is characterized by a poor prognosis and management difficulties, which is even more difficult in elderly patients who frequently have other pathologies associated with age [1].

The capacity of the immune system to control tumor growth and metastasis has focused attention in order to develop new strategies to treat cancer directed to stimulate the patient immune system such as checkpoint blockade or using engineered immune cells to attack cancer as it is currently used in CAR-T therapies. Thus, novel cancer immunotherapies have emerged in the last decade that are being analyzed in clinical trials in patients with hematologic and solid cancer [2–4].

The analysis of the patient immune system represents a central point for the design of personalized immunotherapies. Several alterations have been described in T and NK cells in AML patients that limit tumor control by the immune system [2,5,6].

Nectin and nectin-like molecules can represent biomarkers for cancer diagnosis, players in immune responses and targets for cancer immunotherapy [7–11]. DNAM-1 (also known as CD226) was first discovered as a costimulatory receptor expressed on cytotoxic T cells [12]. DNAM-1 is also expressed by NK cells and is involved in T cell- and NK cell-mediated cytotoxicity [13]. CD112 (Nectin-2) and CD155 (Nectin-5) were identified as ligands for the DNAM-1 receptor [11]. DNAM-1 crosslinking induces Akt phosphorylation, and its co-engagement with CD244 (also termed 2B4), induces the phosphorylation of Erk, phosphorylation of p65 and NF- κ B activation [14]. We have previously shown a reduced expression of DNAM-1 on NK cells from AML patients that correlates with CD112 expression on AML blasts. In vitro experiments demonstrated that DNAM-1 is downregulated after contact with leukemic blasts positive for DNAM-1 ligands (CD112 and CD155) [5,6]. A decreased expression of DNAM-1 has also been reported in T cells from AML patients that also correlated with CD112 expression on leukemic blasts [15,16].

In the last decade, one of the major advances in cancer immunotherapy was the use of monoclonal antibodies (mAbs) to block inhibitory immune checkpoints such as PD-1 and CTLA-4. Recently, the landscape of checkpoint blockade therapies has incorporated novel checkpoints that contribute, at least in part, to the immunosuppressive milieu that is frequently observed in cancer patients. One of these inhibitory receptors is TIGIT, that is expressed in different immune cells such as T cells, regulatory T cells, follicular T cells and NK cells [17–19]. TIGIT shares the same ligands, CD155 and CD112, with the activating/co-stimulatory receptor DNAM-1 and shows higher affinity than DNAM-1 for CD155 [20,21].

TACTILE (also known as CD96) shares the CD155 ligand with TIGIT and DNAM-1. TACTILE is expressed in T and NK cells. In mouse, TACTILE acts as an inhibitory receptor. Conversely, in humans TACTILE possesses both inhibitory and activating motives, and its implication in the regulation of lymphocyte activation is not fully understood [22].

Considering that DNAM-1, TIGIT and TACTILE constitute an axis of paired receptors with opposite functions on NK and T cells, that are key regulators of immune surveillance after recognition of their ligands on tumor cells, (for review see [21]) and that antibodies to TIGIT are now included in clinical trials in cancer patients, a better knowledge of the expression of these receptors on T and NK lymphocytes in healthy individuals and AML patients is required for a better understanding of the mechanisms involved in cancer escape from immune effector cells. Thus, the aim of this study was to analyze the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in AML patients compared with healthy volunteers. We have analyzed the expression of these receptors in a cohort of AML patients in NK

cells, conventional T cells (CD3+CD56−) and NKT-like (CD3+CD56+) cells. Boolean analysis of the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE phenotypes was performed using simplified presentation of incredibly complex evaluations (SPICE) analysis.

2. Results

2.1. Peripheral Blood Distribution of NK and T Cells in AML Patients at Diagnostic

The analysis of NK cell percentage showed a significant decrease in AML patients when compared with healthy donors ($p = 0.003$) (Table 1). In contrast, no statistically significant differences were observed in the percentage of T cells independently of CD56 expression (Table 1).

Table 1. Percentage of NK cells and T cell subsets in healthy donors (HD) and acute myeloid leukemia (AML) patients.

Cell Subset	HD	AML	<i>p</i>
% NK cells (CD3− CD56+) *	26.3 ± 14.3	14.7 ± 13.9	0.003
% Conventional T cells (CD3+CD56−) *	44.3 ± 17.2	50.3 ± 17.2	0.53
CD4+ T cells **	53.4 ± 16.9	54.1 ± 15.4	0.89
CD8+ T cells **	35.9 ± 13.5	35.4 ± 13.3	0.90
DN T cells **	7.1 ± 4.4	7.7 ± 4.4	0.63
DP T cells **	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.4	0.62
% NKT-like cells (CD3+CD56+) *	2.7 ± 3.1	4.7 ± 5.1	0.13
CD4+ T cells **	15.6 ± 14.5	8.3 ± 12.4	0.08
CD8+ T cells **	59.9 ± 17.8	62.1 ± 20.6	0.71
DN T cells **	17.0 ± 11.0	22.3 ± 15.6	0.21
DP T cells **	1.0 ± 1.1	0.8 ± 1.3	0.58

* Referred to lymphocyte gate. ** Referred to the corresponding subset. HD: $n = 20$. AML: $n = 36$; analysis of CD4, CD8 on AML $n = 23$. DP: CD4+CD8+ double positive; DN: CD4−CD8− double negative.

2.2. Expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE Receptors in NK and T Cells

DNAM-1 was expressed in both NK and T cells, with NK cells being the population with the highest percentage of expression of this receptor (Figure 1). The comparison between AML patients and healthy donors showed a significant decrease ($p < 0.001$) in the percentage of DNAM-1+ NK cells in AML patients (AML: $76.8 \pm 20.4\%$; HD: $93.9 \pm 5.9\%$) (Figure 1a). AML patients also showed a significant decrease in the expression of DNAM-1 in conventional CD56− T cells ($56 \pm 11.8\%$ in AML vs. 71.7 ± 9.7 in healthy donors; $p < 0.001$) and CD56+ NKT-like cells ($65.9 \pm 20.6\%$ in AML vs. 79 ± 13.8 in healthy donors; $p = 0.02$) (Figure 1b,c).

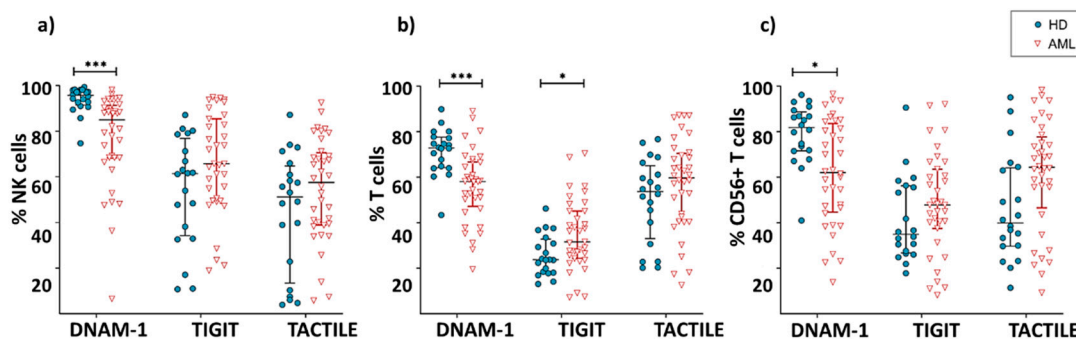


Figure 1. Expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE. Percentage of NK cells (a), conventional CD56− T cells (b) and CD56+ NKT-like cells (c) expressing DNAM-1, TIGIT and TACTILE in AML patients ($n = 36$) and HD ($n = 20$). Vertical lines indicate interquartile ranges from the 25th to the 75th percentile. The horizontal lines represent the median values. Results were considered significant at * $p = 0.02$ and *** $p < 0.001$. HD: healthy donors, AML: acute myeloid leukemia patients.

The inhibitory receptor TIGIT was expressed in a high percentage of NK cells. In T cells, the percentage of TIGIT+ cells was higher within T cells expressing CD56 than in their CD56-counterpart (Figure 1). When comparing TIGIT expression between AML patients and healthy donors, no significant differences were found within NK cells ($61.2 \pm 19.9\%$ vs. $50.4 \pm 24.6\%$, respectively) or CD56+ T cells ($45.1 \pm 21.1\%$ vs. $36.9 \pm 19.9\%$, respectively). Conversely, the percentage of TIGIT+ CD56- T cells was significantly higher ($p = 0.02$) in AML patients ($32.3 \pm 14.9\%$) than in healthy donors ($23.3 \pm 8.9\%$).

When the expression of TACTILE was analyzed on AML and healthy donors, no significant differences were found in NK ($48.4 \pm 22.6\%$ vs. $46.3 \pm 26.7\%$, respectively), conventional T cells ($48.3 \pm 20.8\%$ vs. $51.1 \pm 17.1\%$) or CD56+ NKT-like cells ($55.7 \pm 25.8\%$ vs. $45.4 \pm 22.3\%$) (Figure 1).

2.3. Boolean Analysis of the Co-Expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in NK and T Cells

The co-expression patterns of DNAM-1, TIGIT and TACTILE receptors in NK cells, conventional CD56- T cells and CD56+ NKT-like cells from healthy individuals and AML patients gated using Boolean analysis as indicated in Materials and Methods are shown in Figure 2. Eight different possible phenotype combinations were analyzed, and phenotype profiles were analyzed by the SPICE software.

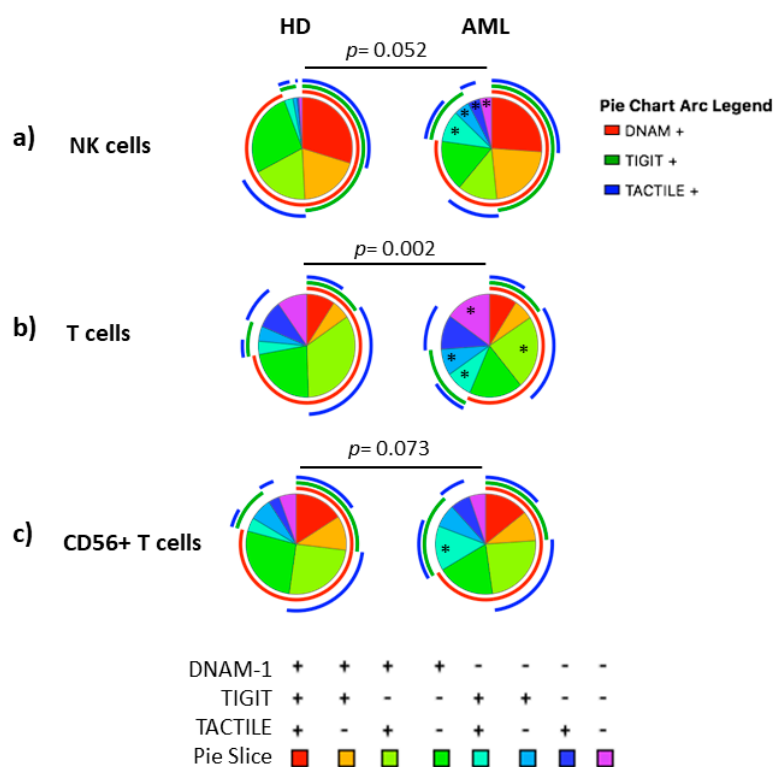


Figure 2. Co-expression patterns (pie charts) of DNAM-1, TIGIT and TACTILE analyzed in (a) NK cells, (b) conventional CD56- T cells and (c) CD56+ NKT-like cells from healthy individuals ($n = 20$) and AML patients ($n = 30$). Positive and negative expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE were combined by Boolean gating to generate all possible subsets. Each color in the pie corresponds to specific combination of antigens indicated in the bottom part of the figure. The asterisk (*) within the slices refers to statistically significant differences between AML patients and healthy donors for the indicated subsets ($p < 0.05$). HD: healthy donors, AML: acute myeloid leukemia patients.

No statistically significant differences ($p = 0.052$) were found when comparing the receptor expression profiles in NK cells from AML patients and healthy donors (pie charts) (Figure 2a). Nevertheless, when each combination was analyzed independently, AML patients showed a significantly higher percentage of DNAM-1-TIGIT+TACTILE+ ($p = 0.02$), DNAM-1-TIGIT+TACTILE-

($p = 0.001$), DNAM-1–TIGIT–TACTILE+ ($p = 0.003$) and DNAM-1–TIGIT–TACTILE– ($p = 0.001$) NK cell subsets, compared to healthy donors (Figures 2a and 3a).

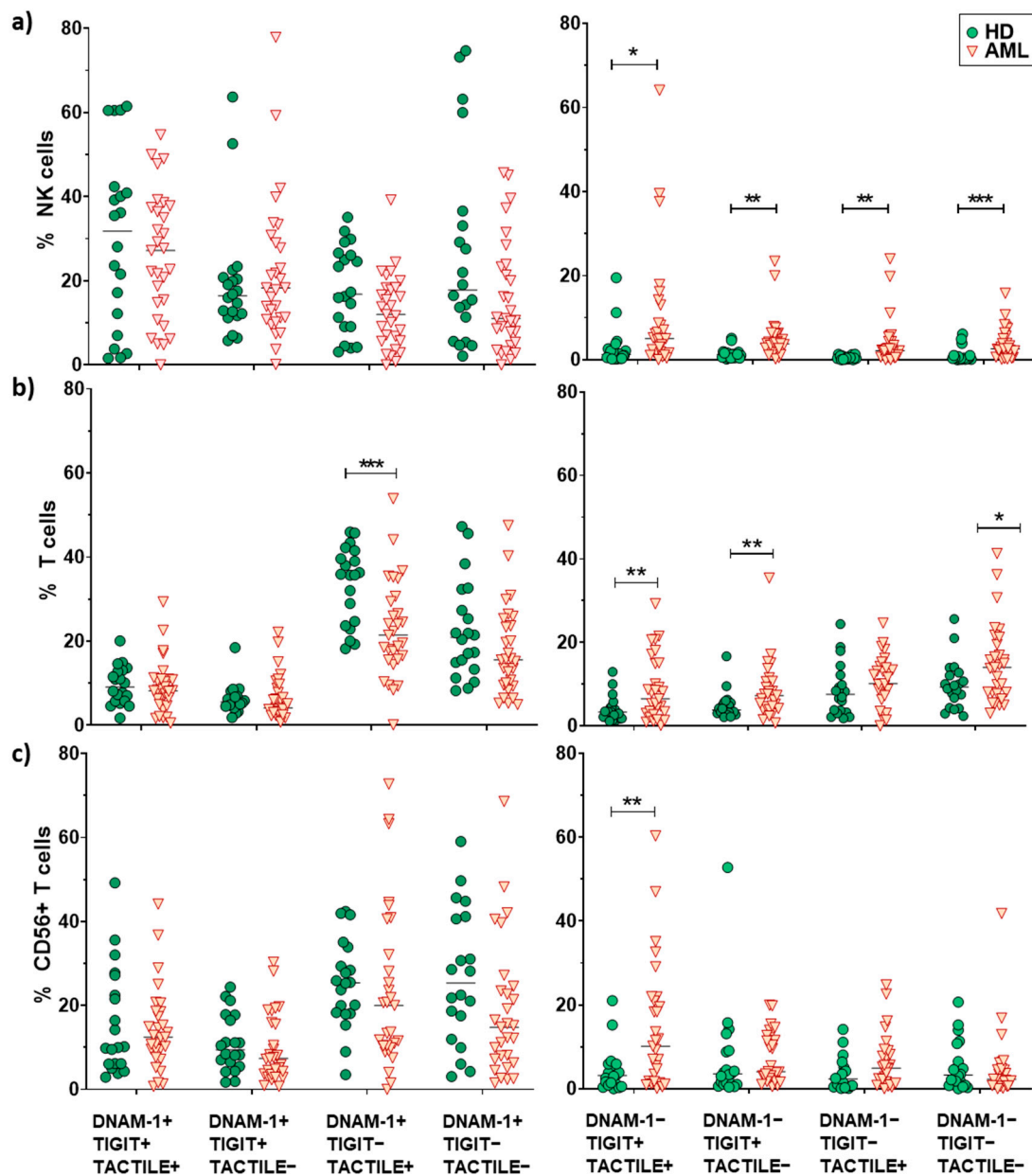


Figure 3. Analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE co-expression. Eight different subpopulations can be observed according to the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE. The distribution of these subsets in NK cells (a), CD56– T cells (b) and CD56+ T cells (c) is shown. The median values are indicated by a horizontal black line. Results were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

The co-expression profile of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on conventional CD56– T cells from AML patients was significantly different than the profile observed on healthy donors ($p = 0.002$), (Figure 2b). The analysis of the specific subsets showed that AML patients had a significant decrease in the percentage of DNAM-1+TIGIT–TACTILE+ T cells ($p = 0.001$) and an increase in the percentage of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ ($p = 0.004$), DNAM-1–TIGIT+TACTILE– ($p = 0.02$) and DNAM-1–TIGIT– TACTILE– ($p = 0.02$) T cells (Figures 2b and 3b).

The analysis of CD56+ NKT-like cells did not show statistically significant differences in the pattern distribution in the pie chart in AML patients compared with healthy donors (Figure 2c). When comparing each combination independently, the only significant difference observed was an increase in the percentage of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ NKT-like cells ($p = 0.002$) in AML patients (Figures 2c and 3c).

When comparing the expression profiles among subsets, significant differences were observed between NK cells and T cells ($p < 0.0001$ in both healthy donors and AML patients) and between NK cells and CD56+ NKT-like cells ($p = 0.001$ in healthy donors and $p = 0.03$ in AML patients). The distribution of the pie chart also differed between T cells and CD56+ T cells ($p = 0.01$ in both healthy donors and AML patients) (Figure S1).

2.4. Expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on CD4 and CD8 T Cell Subsets

We also investigated whether the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE differed among conventional CD56- T cells and CD56+ NKT-like cells subsets defined by CD4 and CD8 expression (Table 1, Figure 4). As the percentage of double positive (DP) CD4+CD8+ T cells was very low, both in AML patients and healthy donors, these cells were excluded in further analyses. In both healthy donors and AML patients, double negative (DN) CD4-CD8- T cells showed the lowest percentages of DNAM-1+ cells independently of CD56 expression and CD4+CD56+ T cells the highest expression.

When comparing between AML patients and healthy donors, the results show that the percentage of CD4+ and CD8+ T cells expressing DNAM-1+ was significantly reduced in AML patients, whereas the percentages of TACTILE+ cells and TIGIT+ cells were preserved (Figure 4a–d). The percentages of TACTILE+ DN T cells (Figure 4e) and DNAM-1+ CD56+ DN T cells (Figure 4f) were increased in AML patients.

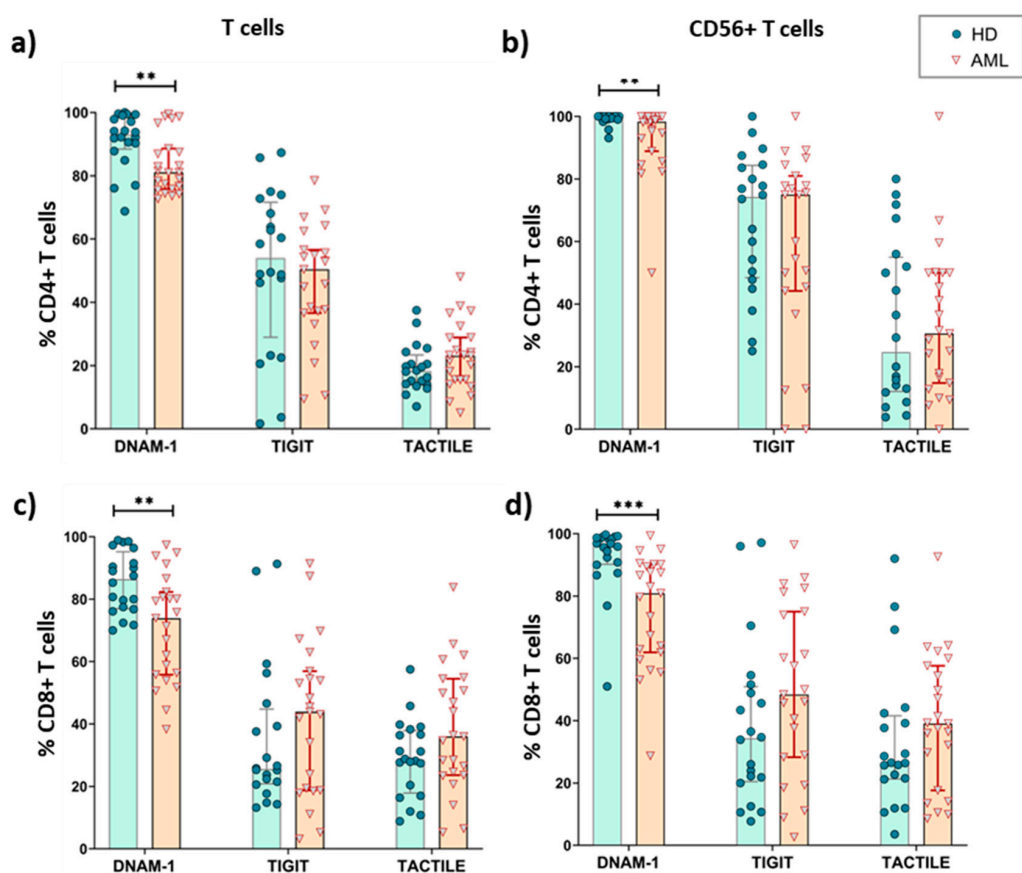


Figure 4. Cont.

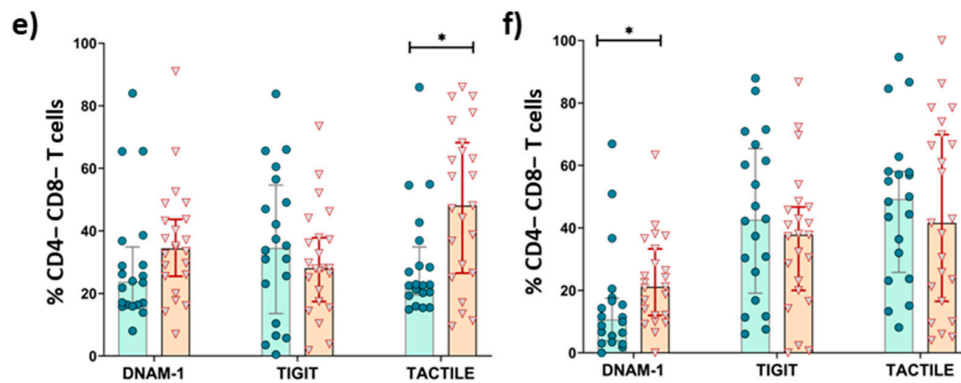


Figure 4. Expression of DNAM-1, TACTILE and TIGIT in T cells subsets from AML patients and healthy donors. The percentages of CD4+ (a,b), CD8+ (c,d) and CD4–CD8– (e,f) T cells expressing DNAM-1, TACTILE and TIGIT were analyzed in conventional CD56– conventional T cells (a,c,e) and CD56+ NKT-like cells (b,d,f) in AML patients ($n = 23$) and HD ($n = 20$). Vertical lines indicate interquartile ranges, from the 25th to the 75th percentile. The horizontal lines represent the median values. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. HD: healthy donors, AML: acute myeloid leukemia.

2.5. Boolean Analysis of the Co-Expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on CD4 and CD8 T Cell Subsets

The co-expression patterns of DNAM-1, TIGIT and TACTILE receptors on CD4 and CD8 T cell subsets cells from healthy individuals and AML patients, gated using Boolean analysis as indicated in Materials and Methods, are shown in Figure 5. The study of CD4+ T cells pie distribution showed no significant differences between AML patients and healthy donors (Figure 5a, upper panel). However, when looking at each combination independently (pie slices), an increase in the percentage of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ cells ($p = 0.036$), DNAM-1–TIGIT+TACTILE–cells ($p = 0.002$) and DNAM-1–TIGIT–TACTILE– cells ($p = 0.002$) was observed in AML patients (Figure 5a, upper row and Figure 6a).

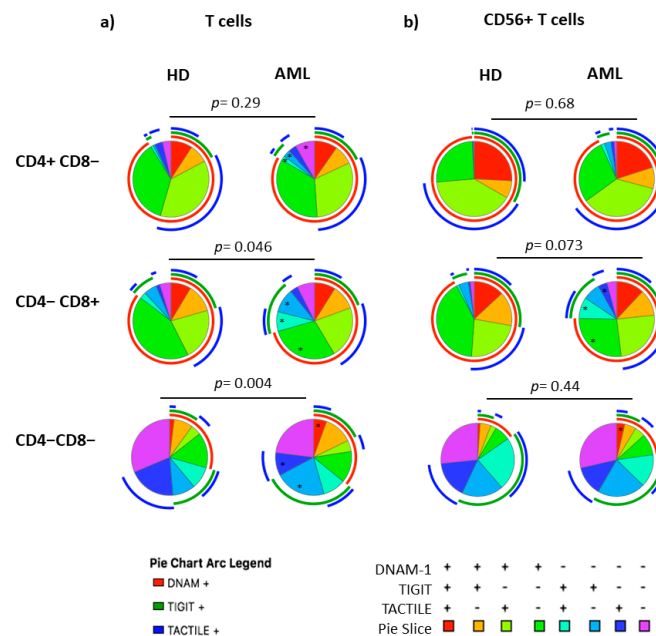


Figure 5. Co-expression patterns (pie charts) of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in CD4+, CD8+ and DN T cell subsets distributed according to CD56 expression: conventional CD56– T (a) and CD56+ NKT-like (b) cells from HD ($n = 20$) and AML patients ($n = 23$). The asterisk (*) within the slices refers to statistically significant differences between AML patients and healthy donors for the indicated subsets ($p < 0.05$). HD: healthy donors, AML: acute myeloid leukemia patients.

The analysis of CD8+ T cell subset pie distribution (Figure 5a, middle row) showed statistically significant differences between AML patients and healthy donors ($p = 0.046$). Specifically, DNAM-1+TIGIT–TACTILE– cells ($p = 0.023$) were reduced in AML patients, while DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ cells ($p = 0.014$) and DNAM-1–TIGIT+TACTILE– cells ($p = 0.01$) were increased (Figure 5a, middle row and Figure 6b).

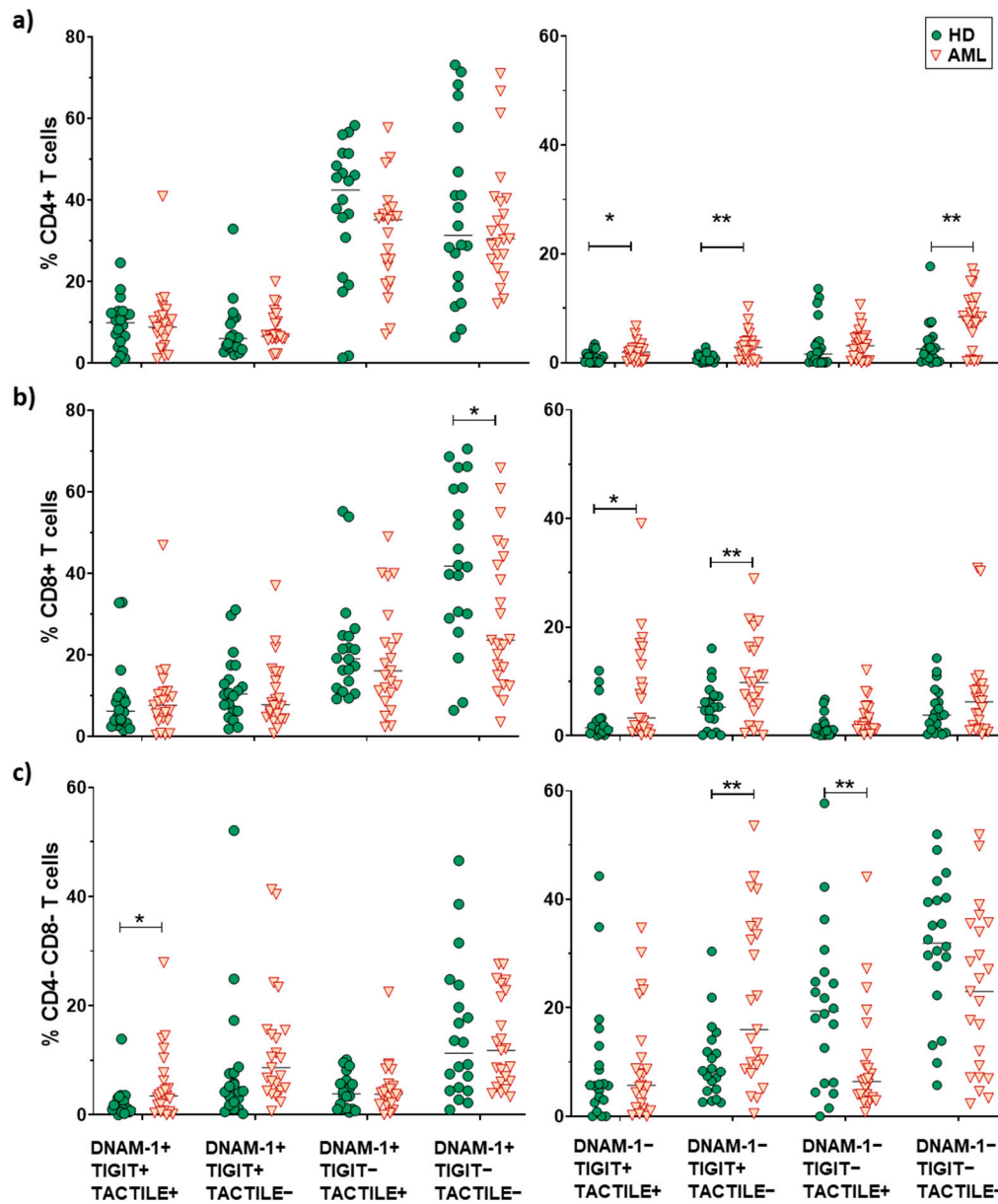


Figure 6. Analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE co-expression in CD4+, CD8+ and CD4–CD8– T cell subsets. Eight different subpopulations can be observed according to the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE. The distribution of these subsets in CD4+ T cells (a), CD8+ T cells (b) and CD4–CD8– T cells (c) in HD ($n = 20$) and AML patients ($n = 23$) is shown. The median values are indicated by a horizontal black line. Results were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

The analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE co-expression in DN T cell subset (Figure 5a, lower row) also showed statistically significant differences in the distribution of pie charts between AML patients and healthy donors ($p = 0.004$) (Figure 5a, lower row). In healthy donors, the percentage of DNAM-1+TIGIT+TACTILE+ DN T cells was negligible. An increase in DNAM-1+TIGIT+TACTILE+

($p < 0.05$) and DNAM-1–TIGIT+TACTILE– ($p < 0.01$) DN T cells and a decrease in DNAM-1– TIGIT–TACTILE+ ($p < 0.01$) DN T cells were observed in AML patients compared to healthy donors (Figure 6c).

No differences in pie profiles were found between AML and healthy donors in any of the CD56+ T cells subsets (CD4+, CD8+ and DN) (Figures 5b and 7). Nevertheless, in CD8+CD56+ T cells, DNAM-1+ TIGIT– TACTILE– cells were significantly reduced in AML patients compared with healthy donors ($p = 0.047$), whereas DNAM-1– TIGIT+ TACTILE+ cells ($p = 0.01$) and DNAM-1–TIGIT–TACTILE+ cells ($p = 0.003$) were increased (Figure 5b, middle panel, and Figure 7b). Finally, within the DN CD56+ T cell subset, we found an increase in the percentage of DNAM-1+TIGIT+TACTILE+ cells ($p < 0.05$) in AML patients compared with healthy donors (Figure 5b, lower row, and Figure 7c).

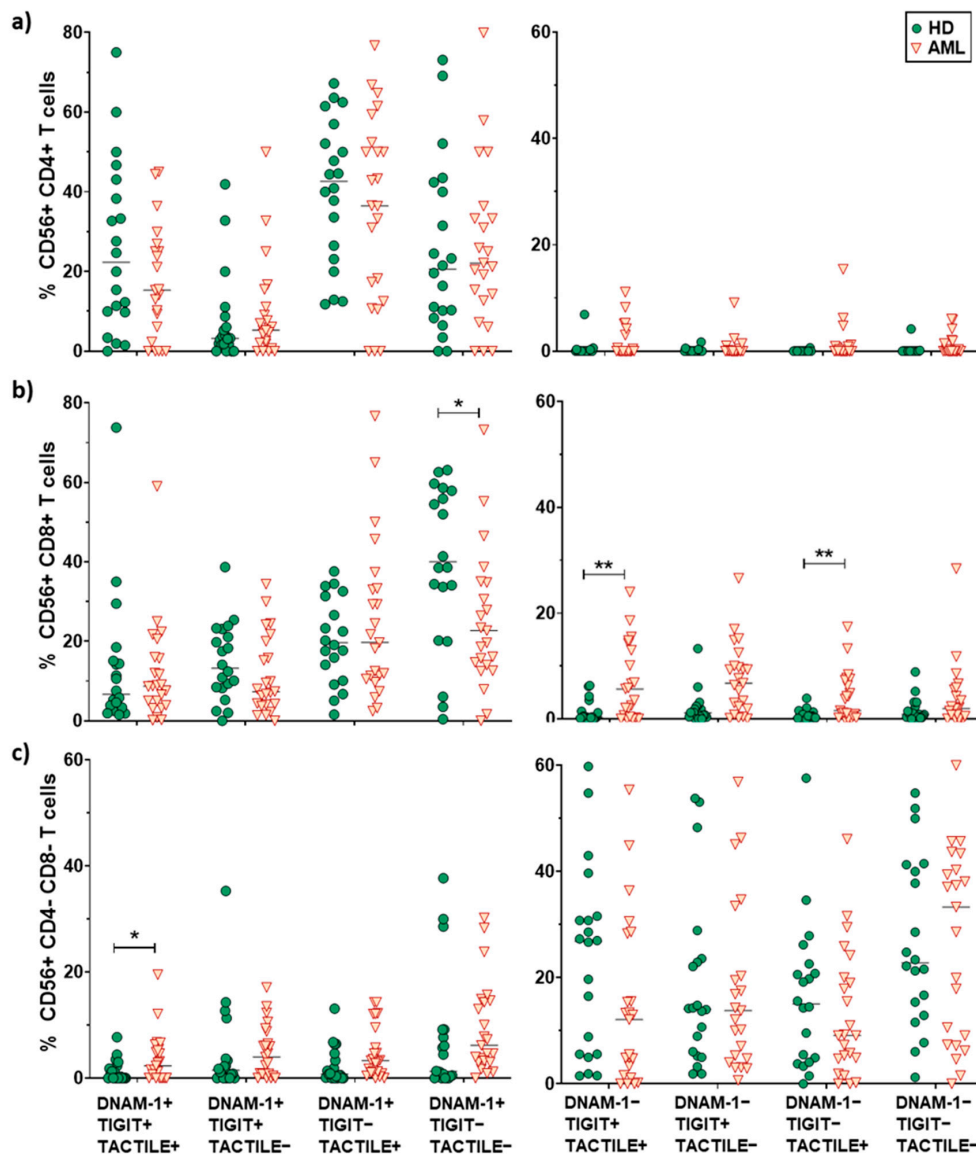


Figure 7. Analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE co-expression in CD56+ T cell subsets. Eight different subpopulations can be observed according to the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE. The distribution of these subsets in CD4+ T cells (a), CD8+ T cells (b) and CD4–CD8– T cells (c) in HD ($n = 20$) and AML patients ($n = 23$) is shown. The median values are indicated by a horizontal black line. Results were considered significant at * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

When comparing pie charts among subsets, significant differences were observed between CD4+ and CD8+ CD56– T cells both in healthy donors ($p = 0.04$) and in AML patients ($p = 0.03$). In CD56+ T

cells, a different pie chart distribution between CD4+ and CD8+ T cells was observed in healthy donors ($p = 0.004$) but not in AML patients ($p = 0.09$). The distribution of the pie chart also differed between DN T cells and CD4+ or CD8+ T cells regardless of CD56 expression ($p = 0.0001$ in both healthy donors and AML patients) (Figure S2).

2.6. Survival Analysis

We further analyzed the effect of the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on the survival of AML patients (Figure 8). No significant differences were observed when each receptor was analyzed separately in NK cells or T cells.

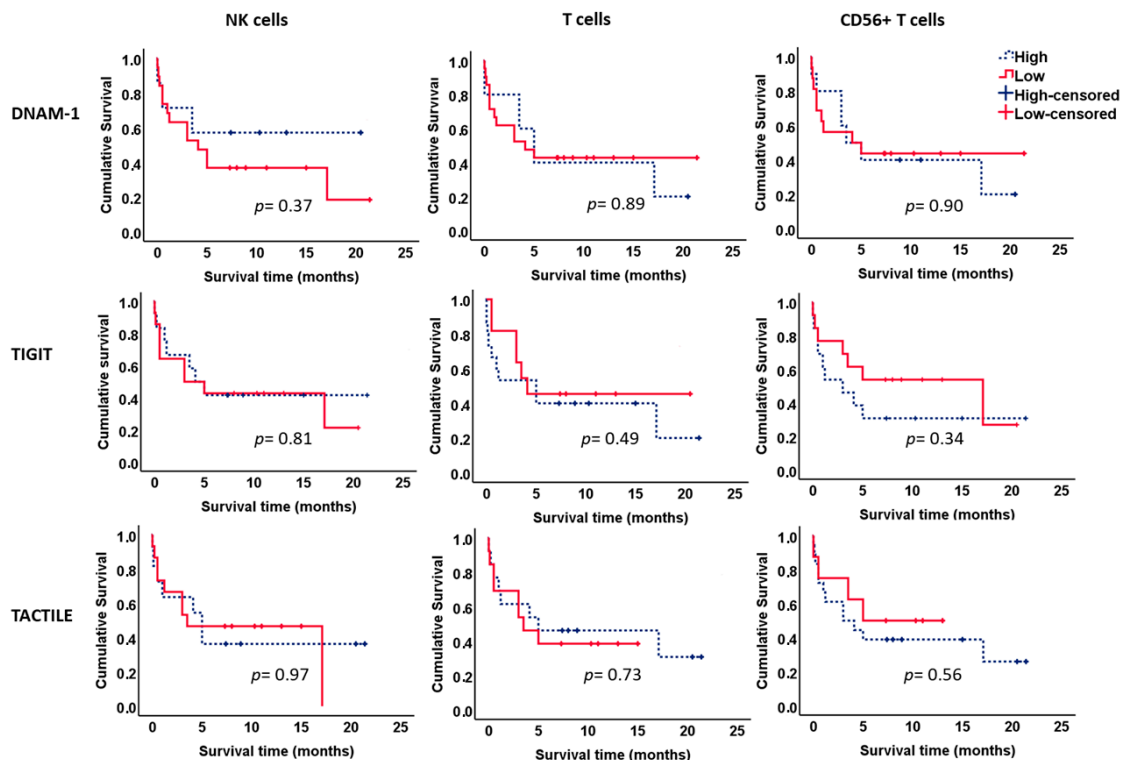


Figure 8. Kaplan–Meier survival analysis in AML patients. AML patients ($n = 26$) were stratified according to the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on NK cells, CD56– T cells and CD56+ T cells. ROC curves were used to calculate the optimal cut-off values. Blue dotted lines correspond to patients with high percentage of positive cells for the indicated receptor and red lines to patients with low percentage of positive cells. Censored patients are indicated as tick marks.

Interestingly, the analysis of the combined expression of these markers showed that patients with lower percentages of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ cells within the CD56– T cell subset had significantly longer survival than patients with higher percentages of T cells with this phenotype ($p = 0.031$, Figure 9a). Similarly, there was a trend for longer survival in those patients with lower percentages of NK cells co-expressing TIGIT and TACTILE in the absence of DNAM-1 ($p = 0.052$, Figure 9b). No significant differences were observed when the other receptor combinations were analyzed. No statistically significant relationships were found between the expression of the DNAM-1, TIGIT and TACTILE on NK or T cells, with other markers of poor prognosis such as the cytogenetic risk.

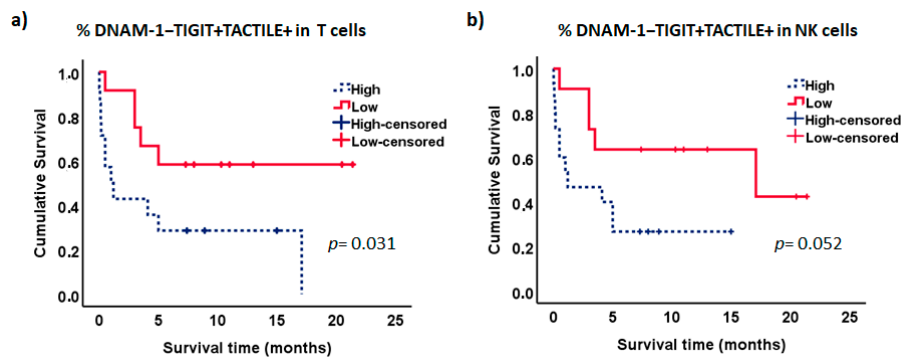


Figure 9. Kaplan–Meier survival analysis in AML patients. AML patients ($n = 26$) were stratified according to the co-expression of TIGIT and TACTILE on DNAM-1 negative CD56[−] T lymphocytes (a) and DNAM-1 negative NK cells (b). Blue dotted lines correspond to patients with high percentage of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ cells and red lines to patients with low percentage of DNAM-1–TIGIT+TACTILE+ cells. Censored patients are indicated as tick marks.

3. Discussion

The role in lymphocyte activation of pairwise receptors that share the same ligands has recently expanded due in part to the possibility to control inhibitory signaling by using blocking mAbs that regulate the immune response as it has been shown with the CD28/CTLA-4 axis in T cell activation. A novel candidate for checkpoint blockade is the inhibitory receptor TIGIT [21,23,24]. CD112 and CD155, members of the Nectin and Nectin-like families of molecules, respectively, are ligands for both inhibitory TIGIT and activating/costimulatory DNAM-1 receptors. Moreover, CD155 is also a ligand for the TACTILE receptor. Interestingly, CD112 and CD155 are frequently expressed in different types of cancer cells including myeloid leukemia blasts [9,21,23–27].

In this study, we firstly assessed the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in NK cells and T cells (CD4⁺, CD8⁺ and DN, stratified by the expression of CD56) in healthy donors and AML patients. In healthy individuals, our results show that DNAM-1 is expressed in most NK cells and CD4⁺ and CD8⁺ T cells (regardless of CD56 expression). We have also observed that TIGIT is present in a higher percentage of NK cells compared to T cells and that about half of NK and T cells express TACTILE. These results agree with previous data showing expression of these receptors in different lymphocytes subsets [13,28].

The role of DNAM-1 in recognition and lysis of AML leukemic blasts has been demonstrated in several models. Here, we have confirmed our previous results showing that NK cells from newly diagnosed AML patients have a reduced expression of DNAM-1 compared to healthy donors [5,6]. A decrease in the ratio DNAM-1⁺/DNAM-1[−] NK cells was also reported in patients diagnosed with Hodgkin lymphoma and diffuse large B-cell lymphoma, corresponding to low expression of DNAM-1 in NK cells with a terminally differentiated phenotype with reduced cytotoxic activity [29]. These results support that low expression of DNAM-1 on NK cells from AML patients contributes to the decreased NK cell cytotoxicity described in these patients. In the present study, we also show a downregulation of DNAM-1 expression on T cells in AML patients. The downregulation of DNAM-1 in AML patients is observed in both conventional CD56[−] T cells and CD56⁺ NKT-like cells. Our data on CD8⁺ T cells are consistent with previous findings showing a downregulation of DNAM-1 in CD8⁺ T cells in AML patients [15,16] as well as in metastatic melanoma [30]. Chronic exposure to DNAM-1 ligands has been proposed as a plausible mechanism involved in DNAM-1 downregulation [6,31]. Thus, the interaction of NK cells with AML blasts expressing DNAM-1 ligands, primarily CD112, results in the downregulation of DNAM-1 [5,6]. Similar results have been observed in CD8⁺ T cells from AML patients [15] and in NK cells after interaction with melanoma [32] or ovarian cell lines expressing CD155 [31]. On the contrary, the expression of TIGIT was not affected by coinubation of NK cells with target cells expressing CD112 or CD155 [33], whereas the expression of CD96 on the

NK92 cell line was down-regulated CD96 after conjugation with the CD155-transfected Daudi cell line [34]. Besides, it has been shown that soluble human CD155, that binds with higher affinity to DNAM-1 than to TIGIT and CD96, affects DNAM-1-mediated NK cell degranulation in vitro and, in a mouse model, interferes with the DNAM-1-mediated cytotoxic activity of NK cells, and promotes murine melanoma progression [35]. Taken together, these results, from different experimental models, support that a decreased expression of DNAM-1 on NK cells is associated with a limited functional capacity and a defective cytotoxicity of target cell lines expressing CD112 or CD155.

Interestingly, we observed a higher percentage of conventional T cells expressing the inhibitory receptor TIGIT in AML patients compared with healthy donors, while no differences were found within NK or CD56+ T cells. TIGIT has been described as a marker of CD8+ T cell exhaustion in AML patients. TIGIT+ CD8+ T cells exhibit low production of cytokines that can be recovered by TIGIT knockdown, suggesting a role for TIGIT in the suppression of T cell anti-tumor responses [16]. The impact of TIGIT expression, analyzed by PCR, was studied in bone marrow samples after allo-stem cell transplantation in AML patients. High expression of TIGIT associated with poor overall and progression-free survival [36]. It has been shown, in experimental models, that TIGIT engagement with its ligands has an impact on both CD4+ and CD8+ T cell priming, suppressing effector function of chronically stimulated CD8+ T cells, and that the co-blockade of TIGIT and PD-1 synergistically enhances CD8+ T cell effector function [37]. In addition, TIGIT has higher affinity than DNAM-1 for CD155 binding, further contributing to NK and T cells dysfunction. Furthermore, TIGIT can also impair DNAM-1 function by disrupting DNAM-1 homodimerization [37]. Our results showing a significant downregulation of DNAM-1 and a higher expression of TIGIT in AML patients suggest that these alterations may be, at least in part, involved in the decreased effector functions of cytotoxic cells in these patients [38].

The role of TACTILE (CD96) as an immune checkpoint remains elusive with discrepant results in different experimental models. In our study, the individual analysis of this molecule showed no differences in AML patients compared to healthy individuals. An increased expression of TACTILE has been described in TILs in colorectal cancer in comparison with PBMCs [28]. Mittal et al. [39] have demonstrated that this receptor is expressed in mouse and human tumor-infiltrating CD8+ T cells and that blocking TACTILE/CD155 interaction alone or in combination with anti-PD-1 or anti-TIGIT enhances CD8+ T cell function. Thus, this receptor can act as an inhibitory receptor, supporting the interest for its clinical evaluation as a strategy for cancer immunotherapy. On the contrary, recent work by Chiang et al. [40] suggested that TACTILE can act as a costimulatory molecule for CD8+ T cell activation in vitro. Further analysis of antibodies used in the different settings may open light to clarify the role of TACTILE not only on NK cells but also on T cells. The analysis of patients with hepatocellular carcinoma show that intra-tumoral NK cells expressing TACTILE are functionally exhausted and TACTILE binding to CD155 on tumor cells reduces NK cell cytotoxicity and cytokine production. In addition, patients with higher numbers of TACTILE+ NK cells exhibit poorer clinical outcomes, suggesting an inhibitory function of TACTILE that contributes to immune escape of hepatocellular carcinoma [41].

In patients with gastric cancer, it has been shown that lower frequencies of tumor-infiltrating CD56+ NKT-like T cells are associated with poor survival. These tumor-infiltrating cells present lower effector function than those in non-tumor tissues and a reduced expression of CD69, DNAM-1 and NKG2D [42]. In this regard, our results show that co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in CD56+ T cells is less affected by AML than their counterpart conventional CD56- T cells.

The double negative (CD4-CD8-) T cell subset represents a minor proportion of T cells, both in healthy donors and AML patients. Interestingly, the expression of DNAM-1 in DN T cells is significantly lower compared with the CD4+ and CD8+ T cell subsets both in healthy individuals and AML patients. Subsequently, all the DNAM-1+ subsets are diminished and DNAM-1- increased, irrespectively of the expression of TIGIT or TACTILE. Although it has been described that the DN T cell subset recognizes AML blasts preferentially in a TCR-independent manner that is, at least in part, mediated through

NKG2D and DNAM-1 activating receptors [43], our results do not support a major role of DNAM-1 in the activation and recognition of target cells by DN T cells. The analysis of *in vitro* expanded DN T cells from healthy individuals has shown that these cells are cytotoxic against non-small-cell lung cancer cell lines, *in vitro* and *in vivo* in xenograft models, and express innate receptors such as NKG2D and DNAM-1, which can be up-regulated by IL-15, that are involved in the lysis of target cells [44]. A clinical trial (NCT03027102) is undergoing to analyze the effect of adoptive transfer of CD4⁺CD8[−] T cells in patients with high-risk AML. Our results on DN T cells in AML patients in comparison with healthy donors demonstrate differences in pie chart distribution with an increase in cells co-expressing DNAM-1, TIGIT and TACTILE. In addition, an increase in the percentage of cells expressing TIGIT and lacking DNAM-1 and TACTILE was observed in DN CD56[−] T cells in AML patients. The relevance of these changes in the functionality of these cells in AML blasts lysis requires further analysis.

TIGIT expression has been associated with poor clinical outcome in AML patients, and TIGIT⁺CD8⁺ T cells represent exhausted cells with low production of cytokines that contribute to the functional T cell impairment observed in AML patients [16]. Wang et al. [15] also described the expansion in AML patients of a CD8⁺T cell subset expressing PD-1 and TIGIT and negative for DNAM-1 that was associated with poor prognosis such as failure to achieve remission after induction therapy or the presence of the FLT3-ITD mutation. Although we have not found statistically significant relationships between the expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE on NK or T cells with markers of poor prognosis such as the cytogenetic risk, the analysis of the NK and T cell subsets defined by the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE shows that the expansion of the DNAM-1[−]TIGIT⁺TACTILE⁺ T cell subset is associated with lower survival in AML patients. In NK cells, high percentages of DNAM-1[−] TIGIT⁺TACTILE⁺ cells also showed a tendency to be associated with reduced survival. Taken together, our results and those of others, support the hypothesis that the expansion of DNAM-1[−]TIGIT⁺ cells, in T and NK lymphocytes, contributes to the decreased recognition and lysis of AML blasts, previously observed in AML patients, that is also associated with poor patient survival.

A limitation of this work is the heterogeneity of the AML patients and the difficulties to get enough numbers of patients in the different groups when stratifying them according to biomarkers of prognosis. Although our study shows that the percentage of DNAM-1[−]TIGIT⁺TACTILE⁺ T cells might be considered a prognostic factor for survival in AML patients, other factors such as age, cytogenetic profile or treatment procedures used will also affect patient survival. Thus, further studies in larger cohorts of patients are required to confirm the possible clinical relevance of this subset expansion as a biomarker of poor prognosis in AML patients.

The analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE demonstrating a different pattern of expression in NK and T cell subsets supports that the regulation of this axis of activating and inhibitory receptors that recognize proteins of the Nectin and Nectin-like families, frequently overexpressed in cancer, represents a new strategy to overcome tumor-induced suppression of both NK and T cells. The possibility to modulate this axis by increasing the expression of DNAM-1, e.g., using cytokines, or blocking the function of TIGIT represents novel therapeutic approaches. Checkpoint blockade using anti-TIGIT mAbs, alone or in combination with other therapies, may represent a good strategy for cancer therapy in AML. TIGIT mAbs are now included in clinical trials in cancer patients (for review see [21]). The effects of TIGIT blockade in non-small-cell lung cancer in combination with anti-PD-L1 mAbs (NCT04294810; NCT04256421) and in advanced metastatic solid tumors in combination with anti-PD-1 mAbs (NCT03119428; NCT04047862) are being analyzed. Furthermore, another inhibitory receptor, PVRIG (CD112R), that recognizes CD112 has been identified [45] and monoclonal antibodies to PVRIG are under study in clinical trials [21]. The pattern of DNAM-1, TIGIT and TACTILE co-expression in AML patients may constitute a biomarker for checkpoint blockade directed at inhibitory receptors that interact with CD112 and CD155 proteins. Our results support that the modulation of the DNAM-1/TIGIT/TACTILE axis can be a novel approach of immunotherapy to enhance both NK and T cell function against AML blasts.

4. Materials and Methods

4.1. Patients and Samples

Thirty-six patients diagnosed with AML between 2017 and 2019 were included in the study and were followed up until the end of January 2020. The mean age of AML patients was 69.5 ± 16.5 (range 25–90) and 70% of AML patients were over 65 years old at the time of diagnosis. A total of 72.2% of AML patients were males and 27.8% were females (Table 1). Clinical characteristics of AML patients at the time of diagnosis are summarized in Table 2. Twenty healthy volunteers were also included in the analysis. The mean age of healthy volunteers was 59.8 ± 19 (range 18–91), 75% were males and 25% were females.

The study was approved by the Institutional Ethical Committees of the University of Extremadura and Hospital San Pedro de Alcántara (Project SAF2017-87538-R; Cáceres, Spain) and Hospital Reina Sofía (Project PI16/01615 Córdoba, Spain) and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. Blood samples from healthy volunteers and adult patients with AML were obtained after informed consent.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained after density gradient centrifugation on Lymphoprep (STEMCELL Technologies, VAN, Canada). PBMCs were used for flow cytometry analysis and the rest of the cells were cryopreserved.

Table 2. Clinical characteristics of patients with AML.

Characteristic	Value
No. Patients	36
Age	
Median (Range)	74.5 (25–90)
Mean (SD)	69.5 ± 16.5
Sex no. (%)	
Male	26 (72.2%)
Female	10 (27.8%)
FAB classification no. (%)	
M0	0%
M1	6 (16.7%)
M2	3 (8.3%)
M3	1 (2.8%)
M4	5 (13.9%)
M5	9 (25%)
M6	1 (2.8%)
M7	1 (2.8%)
Secondary AML no. (%)	6 (16.7%)
AML classification not available	4 (11.1%)
Cytogenetic risk no. (%)	
Favorable	4
Intermediate	17
Adverse	8
Not available	7

4.2. Antibodies

The following antibodies were used for flow cytometry analysis: anti-CD45 APC (Clone 2D1), anti-CD3-VioGreen (clone: REA613), anti-CD4-PE (Clone SK3BD) and anti-CD8-PerCP (Clone SK1BD) from BD Biosciences; anti-CD56-PE-Vio770, (clone: REA196), anti-CD4-VioBlue, (clone: VIT4), anti-DNAM-1 FITC (Clone DX11) and anti-CD96 (TACTILE)-APC (clone: REA195) from Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany) and anti-TIGIT-PE (MBSA43) from eBiosciences (San Diego, CA, USA).

4.3. Flow Cytometry

PBMCs were analyzed for the percentage of the different lymphocyte subsets by multiparametric flow cytometry. Samples were acquired in a MASCQuant (Miltenyi Biotec, (Bergisch Gladbach, Germany) flow cytometer and analyzed using FlowLogic (Inivai Technologies, Mentone, Victoria, Australia) and FlowJo (v10.0.7, TreeStar, Portland, OR, USA) software. Isotype-matched antibodies and fluorescence minus one (FMO) were used as controls. Lymphocytes were gated according to their expression of CD45, size and granularity (FSC vs. SSC). Within that gate, NK cells (CD3⁻ CD56⁺), NKT-like cells (CD3⁺ CD56⁺) and conventional T cells (CD3⁺ CD56⁻) were gated by confronting CD56 vs. CD3. Individual gates (set based on fluorescence minus one and isotype-matched antibodies controls) for DNAM-1⁺, TIGIT⁺ and TACTILE⁺ cells were defined on each of these populations. FlowJo's Boolean gating options were performed to analyze the co-expression of DNAM-1, TIGIT and TACTILE markers. The gating strategy is shown in Figure S3.

4.4. Statistical Analysis

For pie charts comparison we used SPICE permutation analysis [46]. SPICE stands for simplified presentation of incredibly complex evaluations and asks how often the difference observed between the samples represented in pie charts would happen simply by chance.

The statistical analysis was performed using SPSS (version 22.0 statistical package (SPSS, Chicago, IL, USA). The GraphPad Prism program (version 7.0) was used for scatter graphs. Descriptive analysis of variables and normality tests were used. Mean differences were evaluated by Student's *t* test and Mann–Whitney *U* test. Results were considered significant at *p* values < 0.05. The Kaplan–Meier estimator was used to perform the survival analysis. The differences were studied with the log-rank test.

5. Conclusions

This study confirms our previous results showing downregulation of DNAM-1 expression in NK cells from AML patients compared to healthy individuals. We also describe that this receptor is also decreased in conventional T cells and NKT-like CD56⁺ T cells. The reduced expression of DNAM-1 was associated with an increased percentage of DNAM-1⁻ cells expressing TIGIT and/or TACTILE. The subpopulations of T lymphocytes that undergo most of the changes are CD56⁻ T cells, predominantly CD8⁺ T cells. The subsets showing a reduction in DNAM-1 expression and an increase in TIGIT expressing cells are expanded in AML patients, supporting a shift in the balance to inhibition of lymphocyte function, limiting its ability to fight leukemia blasts. The role of TACTILE in NK and T cell activation remains elusive, but in the present study, TACTILE expression was not altered in NK cells and CD56⁺ T cells. A higher proportion of conventional CD56⁻ T cells and NK cells lacking DNAM-1 and co-expressing TIGIT and TACTILE is associated with poor survival in AML patients. In conclusion, our results reveal a differential expression profile of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in NK cells and T cell subsets in AML patients and highlight the importance of the combination of immunotherapeutic strategies aimed at improving lymphocyte activation by blockade of TIGIT checkpoint using anti-TIGIT mAbs in AML patients. The expansion of DNAM-1⁻TIGIT⁺TACTILE^{+/-} cells in AML patients may constitute a biomarker of bad prognosis and the study of these subsets should be considered for checkpoint blockade-based therapy.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/8/2171/s1>, Figure S1: Comparison of co-expression patterns of DNAM-1, TIGIT and TACTILE among NK cells, CD56⁻ and CD56⁺ T cell subsets, Figure S2: Comparison of co-expression patterns of DNAM-1, TIGIT and TACTILE in T cell subsets, Figure S3: Gating strategy used for the analysis of DNAM-1, TIGIT and TACTILE expression on NK cells, CD56⁻ T cells and CD56⁺ T cells.

Author Contributions: Conceptualization, B.S.-C., E.D., C.A., R.S. AND R.T.; data curation, I.V., F.H., N.L.-S. and A.P.; formal analysis, I.V., A.P. and R.T.; funding acquisition, C.A., R.S. and R.T.; investigation, I.V., F.H., N.L.-S., A.P. and E.D.; methodology, I.V., F.H., N.L.-S., B.S.-C. and B.G. project administration, R.T.; Resources, J.M.B., M.J.A., H.B., I.C.-A., J.S.-G., J.S. and C.M.; supervision, E.D., C.A., R.S. and R.T.; validation, F.H., N.L.-S. and A.P.; visualization, I.V., F.H., N.L.-S. and A.P.; writing—original draft, I.V., R.S. and R.T.; writing—review and editing,

F.H., A.P., J.M.B., J.S.-G., E.D., C.A., R.S. and R.T. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Spanish Ministry of Science, Innovation and Universities, grant number SAF2017-87538-R (to RT); the Spanish Instituto de Salud Carlos III, Ministry of Health, grant number PI16/01615 (to CA and RS); Regional funds from Junta de Extremadura, Spain, grant number IB16164 (to RT) and GR18085 to INPATT research group (CTS040). All grants were cofinanced by European Regional Development Funds “Una manera de hacer Europa”. TE-00039-18 (to BG) from Consejería de Educación y Empleo de la Junta de Extremadura cofinanced by European Social Fund, Youth Employment Initiative, “El FSE invierte en tu future”. Miguel Servet CP19/00008 type-I contract from Instituto de Salud Carlos III co-funded by ERDF/ESF, “A way to make Europe”/“Investing in your future” (to AP).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khwaja, A.; Bjorkholm, M.; Gale, R.E.; Levine, R.L.; Jordan, C.T.; Ehninger, G.; Bloomfield, C.D.; Estey, E.; Burnett, A.; Cornelissen, J.J.; et al. Acute myeloid leukaemia. *Nat. Rev. Dis. Primers.* **2016**, *2*, e16010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Barrett, A.J. Acute myeloid leukaemia and the immune system: Implications for immunotherapy. *Br. J. Haematol.* **2020**, *188*, 147–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Acheampong, D.O.; Adokoh, C.K.; Asante, D.B.; Asiamah, E.A.; Barnie, P.A.; Bonsu, D.O.M.; Kyei, F. Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): A potent alternative therapy. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *97*, 225–232. [[CrossRef](#)]
4. Winer, E.S.; Stone, R.M. Novel therapy in Acute myeloid leukemia (AML): Moving toward targeted approaches. *Ther. Adv. Hematol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Sanchez-Correa, B.; Morgado, S.; Gayoso, I.; Bergua, J.M.; Casado, J.G.; Arcos, M.J.; Bengochea, M.L.; Duran, E.; Solana, R.; Tarazona, R. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: Analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1195–1205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sanchez-Correa, B.; Gayoso, I.; Bergua, J.M.; Casado, J.G.; Morgado, S.; Solana, R.; Tarazona, R. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol. Cell Biol.* **2012**, *90*, 109–115. [[CrossRef](#)]
7. Gao, J.; Zheng, Q.; Xin, N.; Wang, W.; Zhao, C. CD155, an onco-immunologic molecule in human tumors. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 1934–1938. [[CrossRef](#)]
8. Martinet, L.; Smyth, M.J. Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 243–254. [[CrossRef](#)]
9. Chan, C.J.; Andrews, D.M.; Smyth, M.J. Receptors that interact with nectin and nectin-like proteins in the immunosurveillance and immunotherapy of cancer. *Curr. Opin. Immunol.* **2012**, *24*, 246–251. [[CrossRef](#)]
10. Pende, D.; Bottino, C.; Castriconi, R.; Cantoni, C.; Marcenaro, S.; Rivera, P.; Spaggiari, G.M.; Dondero, A.; Carnemolla, B.; Reymond, N.; et al. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: Involvement in tumor cell lysis. *Mol. Immunol.* **2005**, *42*, 463–469. [[CrossRef](#)]
11. Bottino, C.; Castriconi, R.; Pende, D.; Rivera, P.; Nanni, M.; Carnemolla, B.; Cantoni, C.; Grassi, J.; Marcenaro, S.; Reymond, N.; et al. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J. Exp. Med.* **2003**, *198*, 557–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Burns, G.F.; Triglia, T.; Werkmeister, J.A.; Begley, C.G.; Boyd, A.W. TLISA1, a human T lineage-specific activation antigen involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes and anomalous killer cells from their precursors. *J. Exp. Med.* **1985**, *161*, 1063–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Shibuya, A.; Campbell, D.; Hannum, C.; Yssel, H.; Franz-Bacon, K.; McClanahan, T.; Kitamura, T.; Nicholl, J.; Sutherland, G.R.; Lanier, L.L.; et al. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* **1996**, *4*, 573–581. [[CrossRef](#)]
14. Kwon, H.J.; Choi, G.E.; Ryu, S.; Kwon, S.J.; Kim, S.C.; Booth, C.; Nichols, K.E.; Kim, H.S. Stepwise phosphorylation of p65 promotes NF-kappaB activation and NK cell responses during target cell recognition. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, e11686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Wang, M.; Bu, J.; Zhou, M.; Sido, J.; Lin, Y.; Liu, G.; Lin, Q.; Xu, X.; Leavenworth, J.W.; Shen, E. CD8(+)T cells expressing both PD-1 and TIGIT but not CD226 are dysfunctional in acute myeloid leukemia (AML) patients. *Clin. Immunol.* **2018**, *190*, 64–73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Kong, Y.; Zhu, L.; Schell, T.D.; Zhang, J.; Claxton, D.F.; Ehmann, W.C.; Rybka, W.B.; George, M.R.; Zeng, H.; Zheng, H. T-Cell Immunoglobulin and ITIM Domain (TIGIT) Associates with CD8+ T-Cell Exhaustion and Poor Clinical Outcome in AML Patients. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 3057–3066. [[CrossRef](#)]
17. Boles, K.S.; Vermi, W.; Facchetti, F.; Fuchs, A.; Wilson, T.J.; Diacovo, T.G.; Cella, M.; Colonna, M. A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC. *Eur. J. Immunol.* **2009**, *39*, 695–703. [[CrossRef](#)]
18. Stanietsky, N.; Simic, H.; Arapovic, J.; Toporik, A.; Levy, O.; Novik, A.; Levine, Z.; Beiman, M.; Dassa, L.; Achdout, H.; et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2009**, *106*, 17858–17863. [[CrossRef](#)]
19. Joller, N.; Hafler, J.P.; Brynedal, B.; Kassam, N.; Spoerl, S.; Levin, S.D.; Sharpe, A.H.; Kuchroo, V.K. Cutting edge: TIGIT has T cell-intrinsic inhibitory functions. *J. Immunol.* **2011**, *186*, 1338–1342. [[CrossRef](#)]
20. Yu, X.; Harden, K.; Gonzalez, L.C.; Francesco, M.; Chiang, E.; Irving, B.; Tom, I.; Ivelja, S.; Refino, C.J.; Clark, H.; et al. The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2009**, *10*, 48–57. [[CrossRef](#)]
21. Sanchez-Correa, B.; Valhondo, I.; Hassouneh, F.; Lopez-Sejas, N.; Pera, A.; Bergua, J.M.; Arcos, M.J.; Banas, H.; Casas-Aviles, I.; Duran, E.; et al. DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE Axis: Novel Immune Checkpoints for Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy. *Cancers* **2019**, *11*, 877. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Georgiev, H.; Ravens, I.; Papadogianni, G.; Bernhardt, G. Coming of Age: CD96 Emerges as Modulator of Immune Responses. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, e1072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Stein, N.; Tsukerman, P.; Mandelboim, O. The paired receptors TIGIT and DNAM-1 as targets for therapeutic antibodies. *Hum. Antibodies.* **2017**, *25*, 111–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Stamm, H.; Wellbrock, J.; Fiedler, W. Interaction of PVR/PVRL2 with TIGIT/DNAM-1 as a novel immune checkpoint axis and therapeutic target in cancer. *Mamm. Genome.* **2018**, *29*, 694–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kim, N.; Kim, H.S. Targeting Checkpoint Receptors and Molecules for Therapeutic Modulation of Natural Killer Cells. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, e2041. [[CrossRef](#)]
26. Solomon, B.L.; Garrido-Laguna, I. TIGIT: A novel immunotherapy target moving from bench to bedside. *Cancer Immunol. Immunother.* **2018**, *67*, 1659–1667. [[CrossRef](#)]
27. Blake, S.J.; Dougall, W.C.; Miles, J.J.; Teng, M.W.; Smyth, M.J. Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5183–5188. [[CrossRef](#)]
28. Lepletier, A.; Lutzky, V.P.; Mittal, D.; Stannard, K.; Watkins, T.S.; Ratnatunga, C.N.; Smith, C.; McGuire, H.M.; Kemp, R.A.; Mukhopadhyay, P.; et al. The immune checkpoint CD96 defines a distinct lymphocyte phenotype and is highly expressed on tumor-infiltrating T cells. *Immunol. Cell Biol.* **2019**, *97*, 152–164. [[CrossRef](#)]
29. Stannard, K.A.; Lemoine, S.; Waterhouse, N.J.; Vari, F.; Chatenoud, L.; Gandhi, M.K.; Martinet, L.; Smyth, M.J.; Guillerey, C. Human peripheral blood DNAM-1(neg) NK cells are a terminally differentiated subset with limited effector functions. *Blood Adv.* **2019**, *3*, 1681–1694. [[CrossRef](#)]
30. Chauvin, J.M.; Pagliano, O.; Fourcade, J.; Sun, Z.; Wang, H.; Sander, C.; Kirkwood, J.M.; Chen, T.H.; Maurer, M.; Korman, A.J.; et al. TIGIT and PD-1 impair tumor antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma patients. *J. Clin. Investig.* **2015**, *125*, 2046–2058. [[CrossRef](#)]
31. Carlsten, M.; Norell, H.; Bryceson, Y.T.; Poschke, I.; Schedvins, K.; Ljunggren, H.G.; Kiessling, R.; Malmberg, K.J. Primary human tumor cells expressing CD155 impair tumor targeting by down-regulating DNAM-1 on NK cells. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 4921–4930. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chauvin, J.M.; Ka, M.; Pagliano, O.; Menna, C.; Ding, Q.; DeBlasio, R.; Sander, C.; Hou, J.; Li, X.Y.; Ferrone, S.; et al. IL-15 stimulation with TIGIT blockade reverses CD155-mediated NK cell dysfunction in melanoma. *Clin. Cancer Res.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Soto, M.; Tarazona, R. (University of Extremadura, Caceres, Spain). Personal observation, 2019.
34. Fuchs, A.; Cella, M.; Giurisato, E.; Shaw, A.S.; Colonna, M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J. Immunol.* **2004**, *172*, 3994–3998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

35. Okumura, G.; Iguchi-Manaka, A.; Murata, R.; Yamashita-Kanemaru, Y.; Shibuya, A.; Shibuya, K. Tumor-derived soluble CD155 inhibits DNAM-1-mediated antitumor activity of natural killer cells. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e1. [[CrossRef](#)]
36. Hattori, N.; Kawaguchi, Y.; Sasaki, Y.; Shimada, S.; Murai, S.; Abe, M.; Baba, Y.; Watanuki, M.; Fujiwara, S.; Arai, N.; et al. Monitoring TIGIT/DNAM-1 and PVR/PVRL2 Immune Checkpoint Expression Levels in Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2019**, *25*, 861–867. [[CrossRef](#)]
37. Johnston, R.J.; Comps-Agrar, L.; Hackney, J.; Yu, X.; Huseni, M.; Yang, Y.; Park, S.; Javinal, V.; Chiu, H.; Irving, B.; et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell.* **2014**, *26*, 923–937. [[CrossRef](#)]
38. Sanchez-Correa, B.; Bergua, J.M.; Pera, A.; Campos, C.; Arcos, M.J.; Banas, H.; Duran, E.; Solana, R.; Tarazona, R. In Vitro Culture with Interleukin-15 Leads to Expression of Activating Receptors and Recovery of Natural Killer Cell Function in Acute Myeloid Leukemia Patients. *Front Immunol.* **2017**, *8*, e931. [[CrossRef](#)]
39. Mittal, D.; Lepletier, A.; Madore, J.; Aguilera, A.R.; Stannard, K.; Blake, S.J.; Whitehall, V.L.J.; Liu, C.; Bettington, M.L.; Takeda, K.; et al. CD96 Is an Immune Checkpoint That Regulates CD8(+) T-cell Antitumor Function. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 559–571. [[CrossRef](#)]
40. Chiang, E.Y.; de Almeida, P.E.; de Almeida Nagata, D.E.; Bowles, K.H.; Du, X.; Chitre, A.S.; Banta, K.L.; Kwon, Y.; McKenzie, B.; Mittman, S.; et al. CD96 functions as a co-stimulatory receptor to enhance CD8(+) T cell activation and effector responses. *Eur. J. Immunol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
41. Sun, H.; Huang, Q.; Huang, M.; Wen, H.; Lin, R.; Zheng, M.; Qu, K.; Li, K.; Wei, H.; Xiao, W.; et al. Human CD96 Correlates to Natural Killer Cell Exhaustion and Predicts the Prognosis of Human Hepatocellular Carcinoma. *Hepatology* **2019**. [[CrossRef](#)]
42. Peng, L.S.; Mao, F.Y.; Zhao, Y.L.; Wang, T.T.; Chen, N.; Zhang, J.Y.; Cheng, P.; Li, W.H.; Lv, Y.P.; Teng, Y.S.; et al. Altered phenotypic and functional characteristics of CD3+CD56+ NKT-like cells in human gastric cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 55222–55230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lee, J.; Minden, M.D.; Chen, W.C.; Streck, E.; Chen, B.; Kang, H.; Arruda, A.; Ly, D.; Der, S.D.; Kang, S.; et al. Allogeneic Human Double Negative T Cells as a Novel Immunotherapy for Acute Myeloid Leukemia and Its Underlying Mechanisms. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 370–382. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Yao, J.; Ly, D.; Dervovic, D.; Fang, L.; Lee, J.B.; Kang, H.; Wang, Y.H.; Pham, N.A.; Pan, H.; Tsao, M.S.; et al. Human double negative T cells target lung cancer via ligand-dependent mechanisms that can be enhanced by IL-15. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 17. [[CrossRef](#)]
45. Whelan, S.; Ophir, E.; Kotturi, M.F.; Levy, O.; Ganguly, S.; Leung, L.; Vaknin, I.; Kumar, S.; Dassa, L.; Hansen, K.; et al. PVRIG and PVRL2 Are Induced in Cancer and Inhibit CD8(+) T-cell Function. *Cancer Immunol. Res.* **2019**, *7*, 257–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Roederer, M.; Nozzi, J.L.; Nason, M.C. SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytom. Part A* **2011**, *79*, 167–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]





Current progress in NK cell biology and NK cell-based cancer immunotherapy

Raquel Tarazona¹ · Nelson Lopez-Sejas¹ · Beatriz Guerrero¹ · Fakhri Hassouneh¹ · Isabel Valhondo¹ · Alejandra Pera^{2,3} · Beatriz Sanchez-Correa¹ · Nieves Pastor⁵ · Esther Duran⁵ · Corona Alonso^{3,4,6} · Rafael Solana^{2,3,4,6}

Received: 15 September 2019 / Accepted: 21 February 2020 / Published online: 4 March 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

A better understanding of the complex interactions between the immune system and tumour cells from different origins has opened the possibility to design novel procedures of antitumoral immunotherapy. One of these novel approaches is based on the use of autologous or allogeneic natural killer (NK) cells to treat cancer. In the last decade, different strategies to activate NK cells and their use in adoptive NK cell-based therapy have been established. Although NK cells are often considered as a uniform cell population, several phenotypic and functionally distinct NK cells subsets exist in healthy individuals, that are differentially affected by ageing or by apparently innocuous viruses such as cytomegalovirus (CMV). In addition, further alterations in the expression of activating and inhibitory receptors are found in NK cells from cancer patients, likely because of their interaction with tumour cells. Thus, NK cells represent a promising strategy for adoptive immunotherapy of cancer already tested in phase 1/2 clinical trials. However, the existence of NK cell subpopulations expressing different patterns of activating and inhibitory receptors and different functional capacities, that can be found to be altered not only in cancer patients but also in healthy individuals stratified by age or CMV infection, makes necessary a personalized definition of the procedures used in the selection, expansion, and activation of the relevant NK cell subsets to be successfully used in NK cell-based immunotherapy.

Keywords Cancer · Immunosenescence · NK cell-based immunotherapy · Ageing · NK cells · PIVAC 19

Abbreviations

AML Acute myeloid leukaemia
ADCC Antibody-dependent cell cytotoxicity
Anti-TAA Anti-tumour-associated antigens
APCs Antigen-presenting cells
CAR Chimeric antigen receptor
CMV Cytomegalovirus

EGFR Epidermal growth factor receptor
GMP Good manufacturing practice
GvHD Graft-versus-host disease
HCMV Human cytomegalovirus
HLA Human leukocyte antigen
HSCT Hematopoietic stem cell transplantation
KIR Killer cell immunoglobulin-like receptors
LAG-3 Lymphocyte-activating gene 3
MHC Major histocompatibility complex
MCMV Murine cytomegalovirus
MM Multiple myeloma
NCRs Natural cytotoxicity receptors
NHL Non-Hodgkin lymphoma
NK Natural killer
PD-1 Programmed death-1
TAA Tumour-associated antigen
TIGIT T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains
TIM-3 T cell immunoglobulin and mucin domain 3

This paper is a Focussed Research Review based on a presentation given at the *Nineteenth International Conference on Progress in Vaccination against Cancer (PIVAC 19)*, held in Athens, Greece, 7–9 June 2019. It is part of a *Cancer Immunology, Immunotherapy* series of *PIVAC 19* papers.

✉ Raquel Tarazona
rtarazon@unex.es

✉ Corona Alonso
corona_alonso@hotmail.com

✉ Rafael Solana
rsolana@uco.es

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Since the discovery of murine and human natural cytotoxicity and natural killer (NK) cells in 1975, evidence supports that they play critical roles in the early control of viral infection and tumour immunosurveillance. In humans, low NK cytotoxicity correlates with increased risk for cancer as it was shown in an 11-year follow-up study [1]. The contribution of NK cells to cancer immunosurveillance is further supported by their role in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) inducing graft-versus-leukaemia effect. NK cells are the first lymphocytes to recover after HSCT [2], and besides their potent effect against leukaemic blasts, they exert a protective role against bacterial and viral infections. NK cells are the first lymphocyte population to reconstitute after HSCT. NK cell numbers usually reconstitute within the first 30 days, and they do not reach full functional competency until 6 months or more, depending on graft composition, immunosuppression, graft-versus-host disease (GvHD), or virus infections (in particular, CMV reactivation) [3, 4]. Early and robust NK cell recovery, over 150 cells/ μ l on day 30 post-HSCT, was associated with improved overall survival and less mortality related to transplantation, whereas low NK cell counts are associated with increased risk of human cytomegalovirus (HCMV) reactivation [5]. Selection of donor–recipient mismatches for killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) expressed by donor NK cells, and their ligands, human leukocyte antigens (HLA)-class I molecules, on the recipient, provide allogeneic anti-leukaemia effects that have been proven to be beneficial. Thus, an increase in survival and protection from relapse in acute myeloid leukaemia (AML) patients lacking HLA class I ligands for donor inhibitory KIR has been described in the course of allogeneic HSCT [6, 7].

Ageing is associated with an increased incidence of cancer including haematology malignancies. Indeed, age is the major factor that influences the health status and the immunosuppressed state of patients with cancer and has an impact on the selection of therapeutic procedures [8–10]. The use of older donors has increased consequently to the extension of allogeneic HSCT to older patients. Donor age ≥ 60 years has a significant negative impact on overall survival in patients receiving allografts for haematologic malignancies [11]. However, advanced donor age does not increase the risk of delayed engraftment or major long-term adverse effects [12].

In clinical trials, adoptive transfer of autologous NK cells to treat cancer has shown little benefits despite its lack of side effects [13]. Adoptive transfer of allogeneic NK cells has been demonstrated to be safe to treat solid and haematologic malignancies, and its use is being

analysed in several clinical trials [14]. Allogeneic NK cell adoptive immunotherapy benefits from the short persistence of NK cells compared to T cells and their allo-reactivity based on KIR-HLA mismatch [15]. In the last decade, different strategies to expand NK cells with high capacity to lyse tumour cells have been used. Harnessing NK cell activation represents a valuable strategy to be considered in cancer immunotherapy.

NK cell biology

Human NK cells are innate lymphoid cells characterized by the expression of CD56 and/or CD16. In peripheral blood, different subsets can be distinguished according to the expression of these markers (Fig. 1). CD56^{bright} CD16⁻ are considered immature cells that produce high levels of cytokines, whereas CD56^{dim} CD16⁺ subset represents mature NK cells with a high cytotoxic capacity, and CD56⁻CD16⁺ are considered a minor subset of dysfunctional NK cells expanded in several clinical conditions [16, 17]. The analysis of NK cells by mass cytometry using 28 markers [18] has shown an unexpectedly high degree of heterogeneity of NK cells and has helped to define two major separate clusters: a less mature cluster characterised by the expression of CD94 and NKG2A and a mature cluster defined by the expression of CD16 and CD57 markers. The development relationship between peripheral blood NK subsets is not fully established with evidence supporting either a linear model or a branched (nonlinear) model of NK cell differentiation (for review [19]).

Recognition and killing of target cells depend on a tune balance between NK inhibitory and activating receptors expressed on their surface that interact with their ligands on stressed cells (e.g. viral infected or malignant transformation) [20–22]. Among NK cell receptors, human NK cell function is principally regulated by KIR and NKG2A inhibitory receptors that interact with self HLA class I molecules. These receptors represent the major checkpoints of NK cell activation, although other non-HLA class I-specific inhibitory receptors have been identified on NK cells that also impact the final balance regulating NK cell cytotoxicity [23, 24]. These receptors include the T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT), PVR-related Ig domain (PVRIG, also termed as CD112R), lymphocyte-3 activation gene (Lag-3), T cell immunoglobulin and mucin domain containing-3 (Tim-3), Programmed death-1 (PD-1) and probably TACTILE (CD96). Activated CD4 and CD8 T cells and a subset of NK cells express Lag-3. In CD4 T cells, Lag-3 binds to Major Histocompatibility Complex (MHC) class II molecules on antigen-presenting cells (APCs), whereas in NK and CD8 T cells, Lag-3 binds to L-SECtin expressed in tumour cells. Tim-3 is expressed on

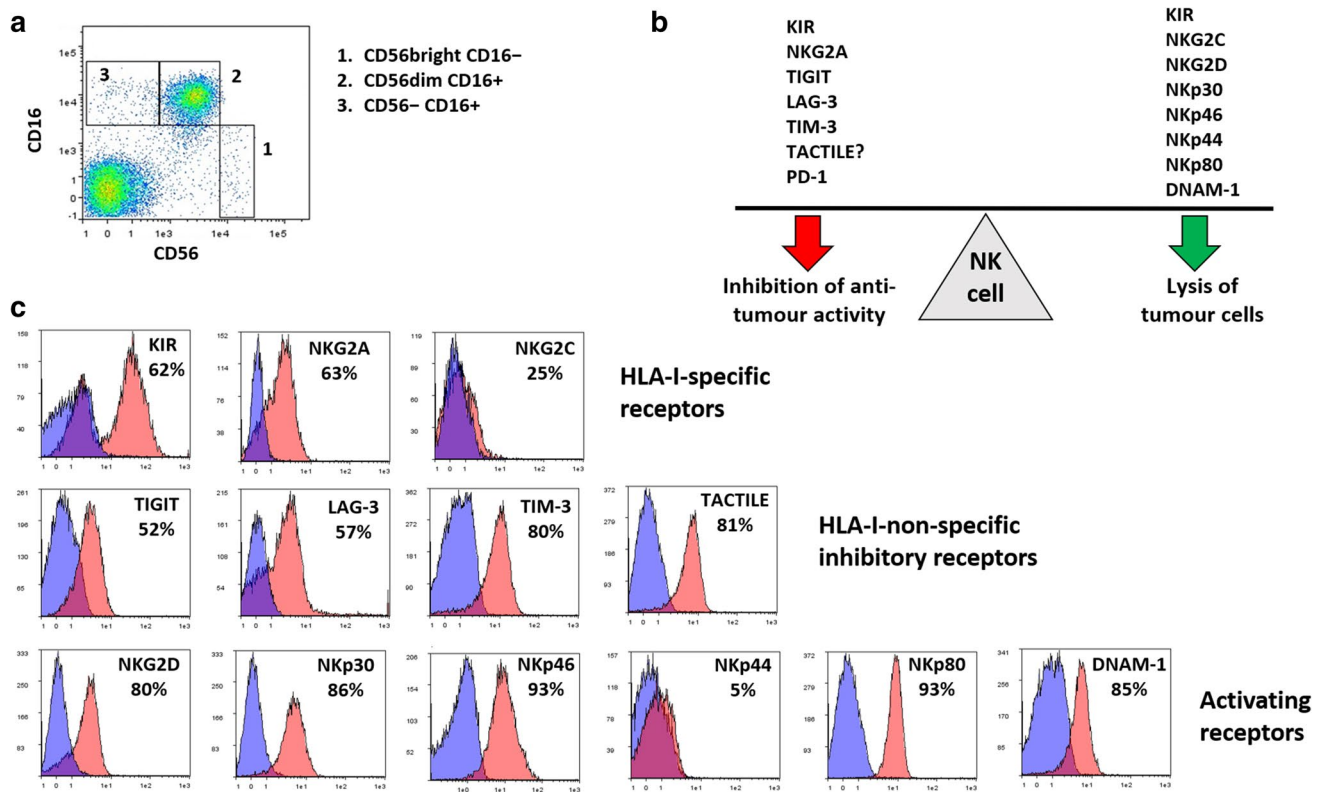


Fig. 1 Human NK cell subsets and receptors. **a** The expression of CD56 and CD16 defines 4 human NK cell subsets. **b** Human NK cells express a large panel of activating and inhibitory receptors. NK cell activation depends on the balance between inhibitory and activating receptors expressed on NK cell surface that interact with their ligands on tumour cells. The major inhibitory receptors recognize

as ligands HLA class I molecules. Several non-HLA class I-specific inhibitory receptors are highly expressed on NK cells (e.g. TIGIT; TIM-3, LAG-3) and may represent checkpoints for NK cell activation. **c** A representative cytometry of peripheral blood NK cells in a healthy donor is shown

T cells, NK cells, and some APCs and its ligands include soluble ligands (galectin-9 and HMGB1) and cell surface ligands (Ceacam-1 and Phosphatidylserine) [25, 26]. TIGIT, PVRIG and TACTILE inhibitory receptors, together with DNAM-1 activating receptor, are part of an intricate ligand/receptor network. These receptors interact with Nectin and Nectin-like molecules. TIGIT shares both ligands CD112 and CD155 with DNAM-1, TACTILE binds to CD155 and PVRIG to CD112. These ligands are found overexpressed on tumour cells [24–26]. Together with inhibitory receptors specific for HLA class I molecules, KIR and NKG2A, these non-HLA I-specific inhibitory receptors have emerged as novel checkpoints in NK cell activation [23, 24].

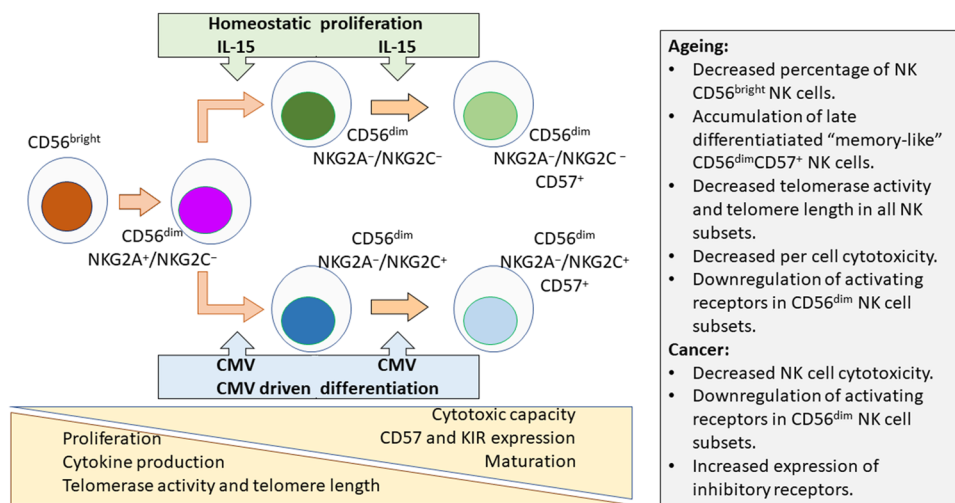
Concerning the panel of activating receptors expressed by NK cells that orchestrates NK cell triggering and cytotoxic activity, NKG2D [27], the NCRs (NKp46 [28], NKp30 [29] and NKp44 [30]) and DNAM-1 [31] have been extensively analysed and are considered responsible of NK cell activation against many types of tumours upon interaction with their ligands. MICA/B (NKG2D ligands) and CD112 and CD155 (DNAM-1 ligands) are frequently expressed on

tumour cells. We have previously shown that both NKG2D and DNAM-1 ligands are expressed in a high percentage of melanoma cell lines [32] and DNAM-1 ligands are frequently expressed on AML blasts [33]. Other NK cell receptors such as 2B4 (CD244), NKp80, NKG2C and activating isoforms of KIR may also contribute to NK cell activation against tumour cells [22].

NK cell subsets in healthy ageing

Healthy ageing is associated with a remodelling of NK cell subsets with different functional capacities (Fig. 2). Elderly individuals show a decrease in the percentage of CD56^{bright} immature NK cells and an increase in the percentage of CD56^{dim} NK cells expressing the CD57 marker [34]. It is well established that ageing is the major factor affecting the percentage of CD56^{bright} NK cells [35, 36], whereas the expansion of CD56^{dim} CD57⁺ NK cells is mainly associated with CMV seropositivity not only in old but also in young individuals [35]. According to the linear model of NK cell differentiation (reviewed in [17]), peripheral blood

Fig. 2 Model of peripheral blood NK cell differentiation in healthy individuals and the effect of CMV. Altered expression of NK activating and inhibitory receptors and decreased NK cell cytotoxicity is often observed in cancer patients. Both ageing and cancer are associated with decreased cytotoxicity. Ageing is associated with decreased telomerase activity and telomere length in all NK cell subsets



CD56^{bright} NK cells are immature NK cells that can be considered precursors of CD56^{dim} NK cells, that, after activation and maturation can express the differentiation-associated marker CD57. A recent study analysing telomere length and telomerase activity of peripheral blood NK cell subsets supports a linear NK cell differentiation process of NK cells from immature CD56^{bright} to CD56^{dim} NKG2A⁺ NKG2C⁻, CD56^{dim} NKG2A⁻ NKG2C⁻, CD56^{dim} NKG2A⁻ NKG2C⁺ and late differentiated CD56^{dim} NKG2A⁻ NKG2C⁺ CD57⁺ subset [37]. All NK cell subsets presented a reduction in telomere length and telomerase activity with increasing subject age. Of interest, the telomeres of early differentiated NK cells were shorter in the elderly than in young individuals, reaching lengths equivalent to levels found in highly differentiated CD57⁺ NK cells, considered as approaching senescence in young adults. These results highlight the overall ageing of all lymphocyte populations, including early compartments of lymphocyte differentiation, which may approach telomere-based cellular senescence in the elderly [37]. Thus, the study of NK cell subsets in elderly individuals supports an altered NK cell dynamic, with an age-associated decreased output of new CD56^{bright} NK cells and a maintained or increased percentage of peripheral blood NK cells with markers of long-lived NK cells in the elderly (CD56^{dim} CD57⁺) [34]. However, if as suggested in recent studies [18], CD56^{bright} NK cells and CD56^{dim} NK cells are distinct lineages, these results indicate that they are differentially affected by ageing and by virus infection. Considering that ageing is associated with a severe decrease in the numbers of CD56^{bright} NK cells, the debate over whether CD56^{bright} NK cells are precursors of CD56^{dim} NK cells or an independent lineage has important implications for novel approaches of NK cell-based immunotherapy in elderly donors.

NK cells from old individuals show an increased expression of CD57, a marker that defines a subset of mature

CD56^{dim} NK cells with cytolytic capacity and cytokine production, but a low proliferative response to cytokines [38, 39]. However, this expansion of CD57⁺ CD56^{dim} NK cells occurs mainly in HCMV seropositive individuals [38, 40, 41]. Although it has been proposed that HCMV is a major driving force of T and NK cell immunosenescence [42], recent advances support that HCMV infection triggers the maturation of a subset of lymphoid cells (NK, CD8 and CD4) phenotypically characterised by the expression of CD57 and a higher functional capacity to respond to different stimuli [43–46].

Murine NK cells and ageing

Murine NK cells are characterized by the expression of inhibitory receptors (e.g. Ly49A), involved in self-tolerance and licensing, and activating receptors (e.g. Ly49H, NKG2D, NKP46) responsible of triggering NK-mediated cytotoxic function and cytokine production. NK cells derive from lymphoid precursors that acquire these inhibitory and activating receptors and develop their effector functions after interaction with bone marrow stromal cells [47]. Several stages of NK cell maturation have been defined in mice, based on the expression of CD27 and CD11b: immature, CD27⁺ CD11b⁻, intermediate, CD27⁺ CD11b⁺, and mature, CD27⁻ CD11b⁺, NK cells [48]. NK cells are essential for resistance to murine cytomegalovirus (MCMV) [49] and ectromelia virus, the agent of mousepox [50].

In aged mice, reduced NK cell function is associated with lower numbers of mature NK cells in peripheral tissues and the bone marrow. Ageing-related functional NK cell deficiency, associated with reduced numbers of mature NK cells in mice, has been well documented using different experimental models. This defect results in a decreased response to viral infections resulting in higher mortality. An intrinsic defect in the migration of mature NK cells and

an impairment of NK cell migration has been observed in aged mice after influenza [51] or ectromelia virus infection [52]. During influenza infection, aged mice have reduced NK cells infiltrating the lungs and significant reduction of their function [51, 53]. Defective NK cell trafficking has also been involved in age-dependent susceptibility to influenza virus infection due to both lower chemokine and integrin expression and delayed actin polymerization in response to influenza infection [54].

The reduced ability of NK cells from aged mice to produce IFN- γ after stimulation correlates with reduced numbers of mature, CD11b⁺ CD27⁻ NK cells in peripheral tissues and the bone marrow [51]. This reduced numbers of mature NK cells are the consequence of a defect in their terminal maturation since the percentages of immature NK cells are maintained in the bone marrow from aged mice [55]. Other age-related defects in NK cells, including reduced proliferation, defective maturation and dysregulated expression of activating and inhibitory receptors, a reduced capacity to eliminate tumour cells, and a decreased expression of T-bet and Eomes transcription factors have been defined [56]. The use of young-old mixed bone marrow chimaeras has demonstrated that the aged non-hematopoietic environment is responsible for the impaired maturation and function of NK cells [56]. Similar conclusions were obtained by using an adoptive transfer approach that showed that NK cell from both young and aged mice had a similar response to pathogen and maturation after being co-transferred into young mice, whereas the response and maturation from young mice were decreased after being transferred to aged mice [57]. Bone marrow from young and aged mice gave rise to similar percentages of CD27⁻ mature NK cells in young mixed bone marrow chimeric mice. Although it has been proposed that age-related functional NK cell deficiency was completely reversed by injecting soluble IL-15/IL-15R α complexes [57], other authors have shown that age-associated defects of NK cells are not restored by IL-15, suggesting that the defect in NK maturation is the consequence, at least in part, of altered maturational cues provided by bone marrow stromal cells [58].

Cytomegalovirus and adaptive “memory” NK cells

In the past decade, cumulative evidence obtained in mice and humans supports that under certain circumstances NK cells can acquire attributes of immunological memory. The generation of “memory” NK cells has introduced an additional degree of complexity in the understanding of NK cells. This term defines a long-lived population of NK cells that possess traits of adaptive immunity, such as clonal expansion, rapid proliferation, high cytotoxicity and cytokine production. In murine models, the discovery that NK cells expressing the Ly49H activating receptor, that

interacts with the protein m157 encoded by the MCMV, expand in MCMV-infected mice and, after contraction, the remaining Ly49H⁺ cells are shown to be long-lived NK cells with the capacity to undergo secondary expansion in response to viral challenge and conferred protective immunity [59–62] supporting their behaviour as “memory” NK cells. An analogous population of NK cells expressing the activating receptor NKG2C expands specifically in response to HCMV [63–65] and HCMV infected individuals have an enhanced response not only to HCMV (HCMV reactivation in HSCT [41]) but also to other viruses such as Hantavirus [66], Chikungunya virus [67], Hepatitis B and C virus [67] or Epstein–Barr virus acute infection [68]. In a recent study, it has been shown that chronic stimulation of adaptive NK cells through NKG2C results in proliferation and activation of CD56^{dim} CD57⁺ NKG2C⁺ NK cells but also to the induction of the checkpoint inhibitory receptors LAG-3 and PD-1, resulting in dysfunctional cytotoxic capacity against tumour targets [69]. Thus, although it should be considered that NKG2C⁺CD57⁺ represent long-lived, “memory” NK cells in humans, with important implications for NK cell-based cancer immunotherapy, further studies are required to analyse the functional capacity of this NK cell subset, as, at least after *in vitro* stimulation, they may represent exhausted NK cells with limited cytotoxic activity against tumour cells.

Other murine model analysing the NK cell response to haptens or viruses also support the existence of NK cell memory subsets. Thus, hepatic NK cells expressing the chemokine receptor CXCR6 have been defined as memory NK cells [70]. A potentially similar population of long-lived NK cells expressing CXCR6 and other tissue residency markers that also exhibit recall responses to varicella-zoster virus, has been demonstrated in humans [71]. The observation of high frequencies of liver-resident NK cells expressing CXCR6 and NKG2C and KIR [72], suggest the possibility that the liver might be a site for NK differentiation to NK memory cells.

Taken together, these results support that the marked and persistent changes of NK cells observed in elderly and HCMV seropositive individuals may condition the NK cell response to tumours and the possibility to use these cells in NK cell-based immunotherapy.

NK cells in cancer patients

It can be appreciated significant phenotypic changes on NK cells of patients with cancer that can affect their functionality by reducing their lysis capacity and therefore limit NK cell-mediated tumour control (Fig. 2). In some instances, alterations observed in NK cells in young cancer patients may resemble the phenotype of these cells in elderly donors [8, 9].

Interactions between the repertory of KIRs and MHC class I are complex, as they can lead to a strong inhibition, weak inhibition or activation of NK cells [73]. In patients with leukaemia, it has been notified an increased expression of inhibitory KIR2DL1 (strong inhibition) and a lack of the inhibitory KIR3DL1 (weak inhibition) [74], as well as a lower level of the activating KIR2DS3 [75]. In non-small cell lung cancer, the expression of KIR2DL1, KIR2DL3, KIR2DL4 and KIR3DL1 were correlated with a poor prognosis [76].

We have previously described an altered NK cell phenotype associated with AML characterized by a decreased expression of DNAM-1, NKG2C and NCR receptors, NKp46 and NKp30. Fauriat et al. [77] correlated NKp46 expression with overall survival in AML patients and showed recovery of NK cell function after complete remission. Stringaris et al. [78] also reported downregulation of NKp46, upregulation of NKG2A and low cytotoxic capacity of NK cells from AML patients confirming previous results. Furthermore, in solid cancer such as prostate cancer, there was reported a decreased expression of several activating receptors (CD16, NKp30, NKp46, NKG2D and DNAM-1), and an increase in the inhibitory receptor CD85j [79]. NKG2A expression has been also linked with a poor prognosis in liver cancer [80].

In addition to changes related to cancer, cancer incidence increases with ageing [8, 9]. In elderly AML patients, the effect of age and cancer synergize and the downregulation of these activating receptors in NK cells is even more pronounced [33, 81]. *In vivo* culture with IL-15 can recover NK cell function in elderly AML patients [82] opening new possibilities for cancer immunotherapy based on autologous NK cells in elderly patients. An interesting aspect is that neither in ageing [83] nor in AML patients the expression of NKG2D seems to be significantly reduced [33]. NKG2D constitutes a major activating receptor in many cancer settings. Its ligands are frequently overexpressed in different types of tumours and consequently, strategies directed to improve NKG2D-mediated recognition of tumour cells should be considered in elderly cancer patients. However, shedding of NKG2D ligands is frequent in haematological cancer and solid tumours and affects NK cell function by blocking NKG2D recognition of its ligands on tumour cells [20, 84] and should be considered when designing strategies based on triggering NKG2D signalling.

AML blast as well as solid tumours such as melanoma express CD112 and CD155, ligands for the activating receptor DNAM-1, that are also recognized by the inhibitory receptors TIGIT (ligands CD112 and CD155) and PVRIG (ligand CD112). Thus, in cancer patients, the activating/inhibitory balance mediated by these paired receptors is threatened due to the downregulation of the activating receptor DNAM-1 and, even more, if the expression of the

inhibitory receptors TIGIT and PVRIG is preserved. Further studies are required to establish the role of this axis in tumour control [24].

In addition to their direct cytotoxic capacity, NK cells can contribute to the elimination of tumour cells via antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) in patients treated with anti-tumour-associated antigens (anti-TAA) that interact with CD16, the NK cell receptor for the Fc region of IgG (FcγIII). The polymorphisms of CD16 have been implicated in the efficacy of anti-TAA mAb-mediated therapy (for review see [85]).

NK cell-based immunotherapies against cancer

As a consequence of the advances in our understanding of NK cell receptors and their ligands, the use of NK cell-based immunotherapy has reached a significance among the new anti-tumour therapeutic strategies. Both, blockade of inhibitory receptors (NK cell checkpoints) or triggering activating receptors have been considered as possible strategies to enhance NK cell cytotoxicity against tumour cells [86]. Besides, the demonstration of the role of allogeneic NK cells in the recognition and killing of AML blasts in HSCT has encouraged development of novel NK cell-based immunotherapeutic strategies for high-risk cancer patients [87] based on the adoptive transfer of autologous or allogeneic NK cells or genetically engineered NK cells, that have already been introduced in phase 1/2 clinical trials.

Enhancement of NK cell function

Due to the importance of NK cells in immunotherapy, different methods have been posed for enhancing NK cell activity toward tumour cells. Here we will briefly discuss some of them (Fig. 3).

Combination of cytokines and mAbs against tumour-associated antigens

Interleukins have been used in clinical trials to activate NK cells *in vivo* although severe adverse effects have been reported when IL-2 is administrated at high doses [88]. IL-15 is increased in the bone marrow of old individuals [89]. IL-15 plasma levels are significantly affected by health and lifestyle status in the elderly, with important decrease in sarcopenia [90] or associated with visceral adipose tissue [91], supporting the possibility to use IL-15 or the IL-15 super-agonist (ALT-803) to enhance NK cell function in a subpopulation of old patients.

However, administration of low doses of IL-2 used to enhance ADCC triggered by anti-TAA improves the

Enhancement of NK cell function

Combination of cytokines and mAbs against tumour associated antigens

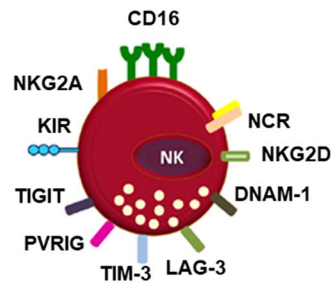
- Anti-TAA combined with low dose IL-2

Engineered Antibodies

- BiKE: anti-CD16 scFv x anti-TAA scFv)
- TRiKE: (anti-CD16 scFv x IL15 x anti-TAA scFv)
- TetraKE (anti-CD16 scFv x 2 anti-TAA scFv)

Blockade of NK cell immune checkpoints

- Targeting KIR, NKG2A
- Targeting TIGIT, PVRIG, TIM-3, LAG-3



Adoptive transfer of highly cytotoxic NK cells

Sources of NK cells and purification process

- PBMC, UCB, BM
- IPS
- NK cell lines

NK cell expansion in vitro:

- Expansions with combinations of cytokines (IL-2, IL-15, IL-12)
- Expansions with accessory and feeder cells

CAR-NK Cells

- Genetic engineered NK cells or NK cell lines

Analysis and selection of cytotoxic NK cells

- Phenotype
- Cytotoxicity
- KIR-HLA mismatch

Fig. 3 Enhancement of NK cell cytotoxic capacity for adoptive immunotherapy. Different strategies can be used to enhance the capacity of NK cells to kill tumour cells. Cytokines such as IL-2 and IL-15 are used to activate and expand NK cells in vitro and in vivo. The promotion of ADCC represent a valuable strategy by using mAb targeting tumour antigens (TAA) alone or in combination with low-dose IL-2 or using killer engagers that link CD16 on NK cells

to tumour antigens (BiKE), that can also include IL-15 (TRiKE, TetraKE). Checkpoint blockade using mAb directed to HLA class I-specific inhibitory receptors (KIR and NKG2A) and non-HLA class I-specific inhibitory receptors (e.g. TIGIT, PVRIG, TIM-3, LAG-3) can be used to block inhibitory signals and activate NK cells. (PBMC: peripheral blood mononuclear cells, UCB: umbilical cord blood; BM; bone marrow; IPSs: induced pluripotent stem cells)

anti-tumour response of these cytotoxic cells [92] and did not show relevant toxicity issues in phase1/2 clinical trials [93–95]. Other clinical trials have studied IL-12 also along with anti-TAAs, although they did not observe any improvement of NK cell activity [96, 97]. NKTR-214 (bempegaldesleukin) is a human recombinant IL-2 attached to polyethylene glycol at the region of IL-2 that contacts the CD25. After administration, it generates active cytokine species with limited binding to the IL-2R α subunit, thereby activating CD8⁺ T cells and NK cells, without expanding the T regulatory cells [98]. Its administration to cancer patients ($n=4$) in a first-in-human study is well-tolerated, shows evidence for activation of the immune response, and it is being combined with anti-checkpoint mAbs in ongoing clinical trials [99]. The use of IL-21 is also under evaluation in clinical trials, showing better results in combination with anti-TAA [100]. As described below, cytokines are also used in NK cell expansion protocols, which are critical for the success of therapy based on adoptive cell transfer [101].

Engineered antibodies

Bi-specific (BiKE), tri-specific (TRiKE), or tetra-specific killer engagers (TetraKE) are small engineered antibody molecules designed to create a bonding between the NK cell and the tumour cells. These engagers hold in one end of their structure an anti-CD16 antibody, which will bind CD16 to trigger NK cell cytotoxicity, and in the other end an antigen for the tumour cell. This connection between the

effector and target cell will lead to enhanced cytotoxicity and cytokine production of NK cells. An example of BiKE is CD16xCD33 which enhances the NK activity against CD33⁺ HL60 AML cell line in vitro [102]. TRiKE and TetraKE use IL-15 molecule as nexus between the antibodies and exhibited more cytotoxicity and generation of inflammatory cytokines than their BiKE ancestor [103]. Combined therapy using BiKEs or TriKEs with checkpoint blockade has been proposed to maximize NK cell anti-tumour response [103].

In addition, because glycosylation of Fc fraction influences antibody effector function, glycoengineering has provided to be useful to generate modified antibodies for use in immunotherapy [104].

Blockade of NK cell immune checkpoints

In the last decade, much attention has been given to the blockade of immune checkpoints for enhancing NK cell function against cancerous cells. The activity of NK cells can be modulated by the blockade of different NK immune checkpoints pathways, that constitute a promising therapeutic tool in immunotherapy [105].

It is known that HLA I inhibitory receptors are important modulators of NK cell activity and therefore interesting targets in this new therapeutic strategy. Both, KIRs and NKG2A blockade are under study, alone and in combination with other antibodies such as anti-PD-1 or rituximab (anti-CD20), to enhance NK cell activity [106, 107]. Anti-KIR antibodies, IPH2101 (1-7F9) and its replacement IPH

2102 (lirilumab, BMS-986015) that includes a modification in the hinge region that increases its *in vivo* stability have been analysed in clinical trials for haematological and solid tumours [108]. The antibody 1-7F9 blocks KIR signalling, therefore promoting NK cell-mediated lysis of HLA-matched AML blasts *in vitro* and in a xenograft model of AML [109]. However, when IPH2101 was tested in a clinical trial (NCT01248455) for multiple myeloma (MM) patients, negative results were obtained. The lack of effect of this antibody *in vivo* was probably due to antibody-induced hypo-responsiveness and contraction of the KIR2D⁺ NK cell subset [110] and it has been proposed that IPH2101 alters NK cell function by inhibiting NK cell education [111]. It has been demonstrated that the use of the humanized anti-NKG2A antibody (Monalizumab) enhances tumour immunity by boosting both NK and CD8⁺ T cell effector functions in mice and humans [107].

In patients with metastatic melanoma, Tim-3 signalling blockade with anti-Tim-3 antibodies resulted in NK cell function recovery [112]. This also was confirmed on a study conducted on lung adenocarcinoma patients, whose peripheral NK cells exhibited higher cytotoxicity and IFN- γ production after TIM-3 blockade [113].

A family of paired receptors that exert opposite functions after interaction with ligands of the Nectin/Nectin-like family has been considered of interest in novel NK cell-based immunotherapy approaches. Two of these ligands (CD112 and CD155) are frequently overexpressed on tumour cells. These receptors include DNAM-1, TIGIT, PVRIG and TACTILE. Whereas binding of DNAM-1 to CD155 or CD112 on target cells triggers NK cell-mediated cytotoxicity, TIGIT interaction with these ligands inhibits NK cell function. PVRIG is also an inhibitory receptor that interacts with CD112 [24]. Furthermore, a significant increase in NK cell-mediated cytolytic activity against tumour cells has been demonstrated following antibody-mediated blockade of TIGIT [114]. Additionally, TIGIT blockade drives enhancement of NK cell killing of tumour cells triggered by trastuzumab [115]. Several clinical trials based on checkpoint blockade using mAbs against TIGIT are ongoing [23, 24]. COM701, an anti-PVRIG mAb, is being tested in a phase I clinical trial (NCT03667716) in patients with advanced solid tumours either as monotherapy or in combination with Nivolumab [24]. It has also been reported an increase in IFN- γ production by NK cells and an improvement in the tumour control in different mouse models with lung metastases when CD96 (TACTILE) was blocked [116].

Adoptive NK cell-based immunotherapy

Advances in the knowledge of NK cell biology and new methods of cell processing under good manufacturing practice (GMP) conditions allow the possibility of a more

accurate clinical use of these cells. NK cells are a promising tool for use in adoptive immunotherapy against different types of cancer due to their innate ability to recognize and lyse tumour cells through the rapid activation of a series of NK activating receptors without the need for prior sensitization [73, 117].

Sources of NK cells and purification process

Adoptive immunotherapy based on NK cells requires a high number of cells for its application from 1×10^6 to 8×10^7 CD3⁻ CD56⁺ NK cells per kilogram recipient body weight [118]. Therefore, as NK cells comprise a low percentage of cells (5–15% in peripheral blood), it is necessary to expand them before being used in adoptive immunotherapy. Autologous or allogeneic NK cells can be used for transfer and cells can be obtained from different sources: peripheral blood mononuclear cells (PBMC), umbilical cord blood (UCB), bone marrow (BM), induced pluripotent stem cells, (iPSCs) and cell lines [119–125]. The expansion of large numbers of NK cells with high purity and viability are crucial factors for their use in therapy. Different protocols have been analysed for the expansion of clinical-grade NK cells observing GMP [126]. The expansion protocol can start from purified or enriched NK cells or NK cells expanded from apheresis products (e.g. PBMCs). Subsequently, NK cells are purified in the final stages of the process usually by magnetic separation to eliminate other immune cells such as T or B cells [127, 128]. This is crucial after an allogeneic HSCT where alloreactive T lymphocytes expanded from the donor can cause side effects to the patient such as GvHD [128–132].

Here we briefly review the protocols of expansion and *ex vivo* activation of NK cells from PBMCs. Safe and efficient production methods are essential to obtain a large number of functional NK cells ready for research and clinical application.

Induction of NK cell expansion by cytokines

The use of cytokines is a well-founded method to effectively expand NK cells and boost their activity, as they are known to mediate in their proliferation and activation. A wide array of cytokines such as IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21 and type I IFNs are used for *ex vivo* expansion of NK cells [133–136]. IL-2 promotes survival, stimulates activation and improves cytotoxicity of NK cells in a relatively short time (24 h) after incubation. The stimulation of PBMCs with IL-2 results in the expansion of a population termed lymphokine-activated killer (LAK) cells that comprise a mixed population of NK and T cells with higher cytotoxic capacity against autologous tumour cells [137, 138]. However, the adoptive transfer of autologous NK cells combined with low doses of

IL-2 in cancer patients was safe but did not provide clinical benefits [88, 139, 140].

The versatility of expansion protocols using cytokines has been demonstrated; peripheral blood purified NK cells incubated with IL-15 and hydrocortisone, for 20 days, expanded 23 times their initial number, while NK cells stimulated with IL-2 and IL-15 alone or combined for 84 days produced an expansion of 1000 times their initial number [132, 141]. IL-2 and IL-15 are closely related cytokines, when used in combination increases proliferation, viability and favours the priming of NK cells. Only IL-15, and not IL-2, can maintain the cytolytic functions after the infusion of NK cells [101, 128, 142]. In vitro culture of NK cells with IL-2 and IL-15 induces the expression of activating receptors NKG2D, NKp44, NKp30 and NKp46 [40, 141, 143–146]. We have also shown that ex vivo stimulation of NK cells from AML patients with IL-15 and IL-2 increased the expression of NKp30, NKG2D, and DNAM-1 receptors and improved their cytotoxicity against tumour cell lines [82]. IL-12, also used in expansion protocols, can stimulate the production of IFN- γ by NK cells [147]. The combination of IL-12, IL-15, and IL-18 induces cytokine-induced memory-like (CIML) NK cells that are long-lived and highly cytotoxic cells with a high production of IFN- γ . CIML NK cells have been tested in adoptive immunotherapy in mouse tumour models and show promising effects against melanoma and lymphoma in vivo [148, 149].

NK cell expansion with accessory and feeder cells

Despite the activation and robustness of the cytotoxic response, the degree of expansion achieved by NK cells in culture with cytokines seems to be insufficient. The expansion of NK cells requires diverse survival, proliferation and activation signals. Thus, stimuli from accessory cells can be used to enhance the expansion of NK cells to obtain enough cells to be used in adoptive NK cell therapy [139, 150]. It has been described a better expansion of NK cells when the culture starts with the entire PBMCs fraction [151] than when purified NK cells are used, suggesting that other non-NK cells, included in the PBMCs fraction provide additional factors for the proliferation of NK cells. Co-culture of NK cells with autologous accessory non-NK cells or addition of growth-inactivated feeder cells are methodological strategies with pronounced effects on NK cell activation and expansion [152, 153].

Assays in healthy donors and patients with MM using the combination of IL-2 (500 U/ml) and anti-CD3 mAb has shown a wide range of NK cell expansions in PBMCs cultures from 190-fold in healthy donors [151] to 1600-fold in MM patients [154] after 20 days of culture. It should be noted that starting the culture from PBMCs leads to the expansion of unwanted CD3⁺ T and NKT-like

(CD3⁺CD56⁺) cells. However, the infusion of this heterogeneous population, containing potentially alloreactive T cells, did not cause side effects such as GvHD in a clinical trial [155]. This is probably due to the loss of T cell-mediated alloreactivity during extended expansion periods [152, 156]. Thus, the risks in allogeneic transplantation have to be considered [129].

Irradiated PBMCs (monocytes and/or autologous or allogeneic B-lymphoblastoid cells) have been used as feeder cells in co-cultures of purified NK cells with the addition of IL-2 (1000 U/ml) with good results, from 25-fold to 30-fold increase [157, 158]. A combination of feeder cells (irradiated), IL-2, anti-CD3 mAb and recombinant human fibronectin fragment (RetroNectin) induces a powerful expansion of up to 4720 fold after 21 days, with more than 90% of NK purity [159].

The possibility of using as feeder cells genetically modified cell lines, such as K562-mb15-41BBL that express IL-15 and 41BBL to activate NK cells, is currently being tested with extraordinary results and with relatively low IL-2 concentrations (100 U/ml) with expansions ranging from 152-fold at day 14 to 277-fold increase at day 21 [160, 161]. Besides, they proved their effectiveness by eliminating tumour cells in mouse models of AML and against autologous and allogeneic tumour cells in vitro [161, 162]. Finally, despite the remarkable results in NK cell expansion with genetically modified allogeneic cell lines, these methods of expansion with tumour cell lines require the generation of a Master Cell Bank and certification and approval of strict regulations according to GMP for their safe use in adoptive immunotherapy [161, 163].

CAR-NK cells

Chimeric antigen receptor (CAR) is an artificial receptor initially designed to enhance T cell activity towards cancerous cells. CAR receptor can bind a wide range of molecules including proteins, carbohydrates and glycolipids. Treatment with anti-CD19 CAR-T cells has been shown successful [164], thus, becoming the most used CAR. It recognizes CD19, an antigen expressed in B cell leukaemia and lymphoma, as well as in B cells. CAR-T cells have shown positive results in haematological cancers in clinical trials [165, 166]. Nevertheless, CAR-T therapy requires to be personalized with autologous blood cells due to the need of the restricted HLA matching, and therefore plausible side effects such as GvHD, neurotoxicity, cytokine release syndrome, etc. Unfortunately, this is an expensive and time-consuming process [167, 168].

On the other hand, the use of CAR-NK overcomes some of the CAR-T cells disadvantages. As NK cells are not HLA restricted, there is no risk of GvHD making possible the production not only of allogeneic CAR-NK cell but also

CAR-NK cell lines, which will reduce both the cost and time of the treatment. Thus, the NK-92 cell line is being used for the manufacture of CAR-NK cells, as it is a cell line that regenerates easily [125]. NK cells usually do not secrete the proinflammatory cytokines IL-1 and IL-6, which are involved in the initiation of the cytokine release syndrome [167, 169]. Moreover, CAR-NK cells can recognize other ligands different from the CAR receptor-ligand using their activating receptors NKp30, NKp44, NKp46, NKG2D or DNAM-1 [167]. For all these, CAR-NK cells emerge as a promising tool in immunotherapy against cancer.

Currently, CAR-NK cells are being tested in several clinical trials targeting different receptor in haematological and solid cancers, although they are still in early phases (NCT02944162, NCT03824964, NCT03690310, NCT03056339, NCT03692637, and NCT03692663).

Adoptive transfer of NK cells: results from clinical trials

The use of autologous NK cells in cancer immunotherapy was evaluated by Rosenberg et al. [88] when LAK cells were transferred to patients with metastatic renal cell carcinoma and melanomas. Although transferred NK cells persisted for a long time, no significant clinical benefit was observed. Similar results were observed in a posterior clinical study using autologous in vitro activated NK cells (NCT00328861) for the treatment of 8 patients with metastatic solid tumours (7 patients with metastatic melanoma and 1 patient with renal cell carcinoma). The transferred NK cells persisted in the peripheral circulation of patients from 1 to several weeks after infusion [13]. The results of these studies suggest that treatment with autologous NK cells alone is not effective and the role of the KIR-HLA interaction inhibiting the activity of NK cells may be at least partially responsible for these results [13, 124]. The use of combined therapies may open new possibilities for the use of autologous NK cells. A phase 1 clinical trial (NCT02481934) has investigated the safety and efficacy of multiple infusions of activated and expanded autologous NK cells in combination with anti-myeloma drugs in MM patients. NK cells expanded with K562-mb15-41BBL cells were administered to five patients with recurrent or refractory MM. Patients also received four cycles of chemotherapy treatment with two infusions of 7.5×10^6 NK/kg per cycle. Two patients developed chemotherapy-related neutropenia. After NK cell treatment, four of five patients showed stabilization of the disease and two patients showed a reduction in bone marrow infiltration and a long-term response. These results support that ex vivo expansion of highly cytotoxic autologous NK cells is viable and that multiple infusions are well-tolerated [94].

The adoptive transfer of allogeneic NK cells may confer a superior anti-cancer effect than autologous NK cells,

due to the possibility of selecting donor NK cells according to KIR-HLA mismatch [124]. Several clinical studies have demonstrated that allogeneic infusions of NK cells are safe and effective in different cancer settings including haematological malignancies and solid tumours [15]. However, there is still poor evidence on the role of adoptive transfer of NK cells to treat cancer and, unfortunately, only a few completed clinical trials have been published so far (Table 1).

Many clinical trials with published results are in phase 1 and include a limited number of patients that impede to obtain accurate conclusions on the effect of adoptive transfer of NK cells on patient outcome. Thus, several clinical trials were developed to determine the safety and feasibility of haploidentical NK cell infusions in children with leukaemia. In childhood AML and ALL (clinical trials NCT00187096 and NCT00187096), NK cell infusion was well-tolerated, without GvHD, and successful engraftment of NK cells was observed [95, 170]. In one cohort the 2-year event-free survival estimate was 100%, supporting the feasibility and efficacy of this regimen [95]. However, in a phase 2 study (NCT00703820) designed to assess the efficacy of adoptive immunotherapy with haploidentical and KIR-HLA-mismatched NK cells in children with intermediate-risk AML, no difference was observed in event-free or overall survival. The authors suggest that in future clinical trials, repeated infusions of NK cells either during earlier phases of treatment to control tumour burden or during maintenance therapy could provide ongoing immune surveillance [171].

The effect of infusion of haploidentical NK cells before allogeneic stem cell transplant was analysed in phase 1 (NCT00402558) and phase 2 (NCT01390402) clinical trials that enrolled 21 patients with high-risk AML, MDS, or CML. Haploidentical alloreactive NK cell infusion before HSCT was well-tolerated without interfering with engraftment or affecting the rate of GvHD. Five patients showed durable complete remissions [172].

The results from another phase I/II clinical trial (EudraCT Number: 2011-003181-32), that enrolled patients with a median age of 64 years (range, 40–70 years) with treatment-refractory, high-risk MDS, MDS/AML or de novo AML treated with infusions of haploidentical NK cells, also support that MDS and MDS/AML and de novo AML, are susceptible to NK cell-based cancer immunotherapy [173]. Additionally, the results from a recent clinical trial (NCT02763475) with AML patients under 30 years old, support that the incorporation of NK cells to standard chemotherapy directly reduces the likelihood of relapse in these patients [174]. Together, these studies reinforce the use of NK cell-based immunotherapy strategies as a possible treatment approach both for haematologic malignancies and solid tumours.

Two clinical trials demonstrated that intravenous (NCT01385423) or subcutaneous (NCT02395822)

Table 1 Selected clinical trials with published results that use allogeneic NK cells to treat cancer patients

Disease	Patients	Treatment	NK cell dosage	Outcome	Phase	Clinical Trial Identifier	References
Relapse AML	10 children	<i>Conditioning regimen:</i> Fludarabine, Cyclophosphamide <i>Treatment:</i> Haploidentical KIR-HLA-mismatched NK cell infusion + rhIL-2	Range: 5–81 × 10 ⁶ NK cells/kg	Treatment with KIR-HLA-mismatched NK cells after low-dose immunosuppression is well-tolerated and successful engraftment was observed	1	NCT00187096	Rubnitz et al. [95]
Relapse or refractory Leukaemia (ALL/AML)	15 children not HCT & 14 children relapse after HCT	<i>Conditioning regimen:</i> Clofarabine, Etoposide, Cyclophosphamide <i>Treatment:</i> Haploidentical NK cell infusion + rhIL-2	Range: 3.5–103 × 10 ⁶ NK cells/kg	26 of 29 KIR-HLA-mismatched NK cell infusions and IL-2 injections were well-tolerated. OS of patients without prior HCT was 0.36 and OS of patients with prior HCT was 0.25	1	NCT00697671	Rubnitz et al. [170]
High relapsing Myeloma	Multiple 8	<i>Conditioning regimen:</i> Bortezomib alone or Cyclophosphamide, Dexamethasone, Fludarabine, Bortezomib <i>Treatment:</i> Haploidentical or autologous NK cell infusion + rhIL-2	Up to 1 × 10 ⁸ NK cells/kg	Infusion of large numbers of NK cells generated with K562-mb15-41BBL was feasible and safe. Superior expansion and activity of fresh compared to cryopreserved cells. Two patients did not require additional treatment for 6 months, one of them had a partial response and the other showed a decrease in disease progression. In 5 patients, disease progression was not affected by NK cell infusion	2	NCT01313897 (IND 14560)	Szmania et al. [176]

Table 1 (continued)

Disease	Patients	Treatment	NK cell dosage	Outcome	Phase	Clinical Trial Identifier	References
Myeloid malignancies (AML, MDS, CML)	21 (2 children, 19 adults)	<i>Conditioning regimen:</i> Fludarabine, Busulfan, Tacrolimus, Methotrexate, GCSF <i>Treatment:</i> Haploidentical NK cell infusion (KIR-HLA mismatch in phase 1) before allogeneic transplant	Range: $0.02\text{--}8.32 \times 10^6/\text{kg}$	Adoptive transfer of NK cells before allogeneic transplant is safe and feasible. No toxicity occurred with the maximal cell doses used and efficacy was related to the number of infused NK cells Complete remission was observed in 5 adult patients	1–2	NCT00402558 NCT01390402	Lee et al. [172]
Poor prognosis refractory Non-Hodgkin Lymphoma (NHL)	15	<i>Conditioning regimen:</i> Cyclophosphamide, Pentostatin, Denileukin <i>Treatment:</i> Haploidentical NK cell infusion + Rituximab + rhIL-2	Range: $0.5\text{--}3.27 \times 10^7$ NK cells/kg	Treatment was well-tolerated and induced remission of 25% of highly refractory NHL patients. A short-term persistence of haploidentical NK cells and 28% overall response rate was observed	2	NCT01181258	Bachanova et al. [177]
Liver metastasis of gastrointestinal origin	9	<i>Conditioning regimen:</i> Fludarabine, Cyclophosphamide <i>Treatment:</i> Allogeneic NK cell infusion + rhIL-2 + Cetuximab	3×10^6 , 8×10^6 or 12×10^6 NK cells/kg	Combined therapy using allogeneic NK cells administered via intra-hepatic artery, cetuximab and a high dose IL-2 is feasible, well-tolerated and can induce clinical responses. FoxP3+ regulatory T cells and PD-1+ T cells expanded in all patients, related to IL-2 administration	1	NCT 02845999	Adotevi et al. [178]
Advanced AML	42	<i>Conditioning regimen:</i> Fludarabine, Cyclophosphamide <i>Treatment:</i> Haploidentical NK cell infusion + rhIL-15	$1.9 \times 10^7/\text{kg}$ (those with rhIL-15 I.V.) $1.2 \times 10^7/\text{kg}$ (those with rhIL-15 S.C)	NK-cell infusions in combination with rhIL-15 induced remission in 32% of patients (rhIL-15 I.V.) and 40% patients (rhIL-15 S.C.). Cytokine release syndrome was observed in 56% of patients given subcutaneous rhIL-15	1	NCT02395822 NCT01385423	Cooley et al. [175]

Table 1 (continued)

Disease	Patients	Treatment	NK cell dosage	Outcome	Phase	Clinical Trial Identifier	References
Intermediate-risk AML in first complete remission	21 children	Conditioning regimen: Cyclophosphamide, Fludarabine Treatment: Haploidentical KIR–HLA-mismatched NK cells + rhIL-2	Range: 3.6– 62.2×10^6 cells/kg	NK cell infusions are well-tolerated, and transient engraftment is observed. Adoptive transfer of NK cells did not improve event-free or overall survival rates in children with intermediate-risk AML	2	NCT00703820	Nguyen et al. [171]

administration of rhIL-15 in combination with haploidentical NK cell infusion demonstrated high rates of in vivo expansion of adoptively transferred donor NK cells after lymphodepleting chemotherapy and peripheral blood NK cells were more cytotoxic against K562 cells compared with those patients who did not receive rhIL-15. Cytokine release syndrome was observed in 56% of patients given subcutaneous rhIL-15 but not was observed with intravenous administration. NK-cell infusions in combination with rhIL-15 induced remission in 32% of patients (rhIL-15 I.V.) and 40% patients (rhIL-15 S.C.) [175].

A phase 2 clinical trial (NCT01313897) analysed the safety, persistence and activity of NK cells expanded and activated in vitro with the K562-mb15-41BBL cell line in high-risk relapsing myeloma. Autologous (5 patients) or haploidentical (3 patients) NK cells were infused after a preparative regimen followed by the administration of IL-2. No serious adverse events related to NK cell infusion were observed. It has been demonstrated superior expansion and activity of fresh NK cell products compared to cryopreserved products. Among the 7 evaluable patients, one had a partial response and in another, a decrease of disease progression was observed and neither patient required further therapy for 6 months. However, in the 5 remaining patients, disease progression was not affected by NK cell transfer [176].

In poor prognosis refractory Non-Hodgkin Lymphoma (NHL) patients, treatment with haploidentical NK cell infusion together with Rituximab and rhIL-2 was well-tolerated and induced remission of 25% of highly refractory NHL patients (NCT01181258). A short-term persistence of haploidentical NK cells and 28% overall response rate was observed. It should be highlighted that NHL patients have a suppressive environment that is associated with inferior clinical responses after donor NK cell infusions [177].

Compared to haematological malignancies, adoptive transfer of allogeneic NK cell in solid tumours remains elusive. A phase 1 clinical trial using allogeneic NK cells, infused via intra-hepatic artery, combined with anti-EGFR (cetuximab) and high dose IL-2 has enrolled 9 patients with liver metastasis of colorectal or pancreatic cancers. Clinical responses were observed in 3 patients who received donor NK cells with at least one KIR-ligand mismatch. Although the results showed that the combination was feasible, well-tolerated and clinical responses were observed in one-third of the patients, a detrimental expansion of regulatory T cells and PD-1⁺ T cells related to administration of high dose IL-2 was observed in all patients [178].

Conclusions and perspectives

The development during the last decade of successful cancer immunotherapy strategies has represented a revolution in cancer treatment. The better understanding of the cellular and molecular interactions between the immune system and different types of tumour cells allows the rising number of approaches that are being actively exploited to manipulate cells of the immune system in novel cancer immunotherapy procedures. Since their discovery, NK cells have been proposed as effector cells in immunotherapy of solid tumours and haematological malignancies. NK cell-based cancer immunotherapy aims to selectively manipulate the mechanisms that regulate NK cell function to enhance NK cell cytotoxicity. Several strategies to trigger NK cell cytotoxicity by ADCC using either anti-TAA mAbs or engineered engagers, alone or in combinations with activating cytokines (IL-2 or IL-15) have been tested in clinical trials and proved to be safe and efficient. Besides, the technological advances to isolate, expand and activate NK cells *ex vivo* in GMP conditions, support the translation to clinics of NK-cell-based therapeutic approaches based on adoptive transfer of NK cells.

Considering the current knowledge on NK cell biology and that the immune system is frequently depressed in cancer patients and is affected by age or latent viral infections, we consider that a previous detailed analysis of NK cells and their activation and inhibitory receptors, should be required to define personalised NK cell-based cancer immunotherapy. This analysis will depend, not only on the immunotherapy protocol designed in each case (solid tumour vs. leukaemia, triggering host NK cells vs. adoptive therapy, etc.), but also on other aspects such as donors' age and CMV serostatus that affect NK cell subsets and their function.

Author contributions RT, CA and RS designed the first draft of the manuscript. NL, BG, FH and IV contributed to the writing of different sections, figures and tables. AP, BS, NP and ED discussed the manuscript sections and contributed with updated references. All authors revised and agreed to the final version of the paper.

Funding This work was supported by: Instituto de Salud Carlos III, Spain (PI13/02691 to Rafael Solana and PI16/01615 to Rafael Solana and Corona Alonso). Agencia Estatal de Investigación, Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (SAF2013-46161-R and SAF2017-87538-R to Raquel Tarazona). Consejería de Economía e Infraestructuras, Junta de Extremadura (IB16164 and grants to INPATT (CTS040) research group GR18085 to Raquel Tarazona). Grants were cofinanced by European Regional Development Funds (FEDER) “Una manera de hacer Europa”. Grant TE-0039-18 (to Beatriz Guerrero) from Consejería de Educación y Empleo cofinanced by European Social Fund, Youth Employment Initiative, “El FSE invierte en tu futuro”. Plan Propio Universidad de Córdoba (to Alejandra Pera).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795–1799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03231-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03231-1)
2. Ottinger HD, Beelen DW, Scheulen B, Schaefer UW, Grosse-Wilde H (1996) Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood* 88:2775–2779
3. Zaghi E, Calvi M, Di VC, Mavilio D (2019) Innate immune responses in the outcome of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation to cure hematologic malignancies. *Front Immunol* 10:2794
4. Ullah MA, Hill GR, Tey SK (2016) Functional reconstitution of natural killer cells in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Front Immunol* 7:144
5. Minculescu L, Marquart HV, Friis LS, Petersen SL, Schioldt I, Ryder LP, Andersen NS, Sengeloev H (2016) Early natural killer cell reconstitution predicts overall survival in T cell-replete allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:2187–2193. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.09.006>
6. Ruggeri L, Mancusi A, Capanni M, Urbani E, Carotti A, Aloisi T, Stern M, Pende D, Perruccio K, Burchielli E, Topini F, Bianchi E, Aversa F, Martelli MF, Velardi A (2007) Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* 110:433–440. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-07-038687>
7. Hsu KC, Keever-Taylor CA, Wilton A, Pinto C, Heller G, Arkun K, O'Reilly RJ, Horowitz MM, Dupont B (2005) Improved outcome in HLA-identical sibling hematopoietic stem-cell transplantation for acute myelogenous leukemia predicted by KIR and HLA genotypes. *Blood* 105:4878–4884. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4825>
8. Tarazona R, Sanchez-Correa B, Casas-Aviles I, Campos C, Pera A, Morgado S, Lopez-Sejas N, Hassouneh F, Bergua JM, Arcos MJ, Banas H, Casado JG, Duran E, Labella F, Solana R (2017) Immunosenescence: limitations of natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 66:233–245. <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1882-x>
9. Sanchez-Correa B, Campos C, Pera A, Bergua JM, Arcos MJ, Banas H, Casado JG, Morgado S, Duran E, Solana R, Tarazona R (2016) Natural killer cell immunosenescence in acute myeloid leukaemia patients: new targets for immunotherapeutic strategies? *Cancer Immunol Immunother* 65:453–463. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1720-6>
10. Lichtenegger FS, Krupka C, Kohnke T, Subklewe M (2015) Immunotherapy for acute myeloid leukemia. *Semin Hematol* 52:207–214. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2015.03.006>
11. Servais S, Porcher R, Xhaard A, Robin M, Masson E, Larghero J, Ribaud P, Dhedin N, Abbes S, Sicre F, Socie G, de Peffault LR (2014) Pre-transplant prognostic factors of long-term survival after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with matched related/unrelated donors. *Haematologica* 99:519–526

12. Rezvani AR, Storer BE, Guthrie KA, Schoch HG, Maloney DG, Sandmaier BM, Storb R (2015) Impact of donor age on outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 21:105–112
13. Parkhurst MR, Riley JP, Dudley ME, Rosenberg SA (2011) Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 17:6287–6297. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1347>
14. Veluchamy JP, Kok N, van der Vlet HJ, Verheul HMW, de Gruijl TD, Spanholtz J (2017) The rise of allogeneic natural killer cells as a platform for cancer immunotherapy: recent innovations and future developments. *Front Immunol* 8:631. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00631>
15. Lupo KB, Matosevic S (2019) Natural killer cells as allogeneic effectors in adoptive cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers11060769>
16. Del Zotto G, Marcenaro E, Vacca P, Sivori S, Pende D, Della CM, Moretta F, Ingegnere T, Mingari MC, Moretta A, Moretta L (2017) Markers and function of human NK cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom* 92:100–114. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21508>
17. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA (2017) The broad spectrum of human natural killer cell diversity. *Immunity* 47:820–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.10.008>
18. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, Dekker CL, Mackey S, Maecker H, Swan GE, Davis MM, Norman PJ, Guethlein LA, Desai M, Parham P, Blish CA (2013) Genetic and environmental determinants of human NK cell diversity revealed by mass cytometry. *Sci Transl Med* 5:208ra145. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006702>
19. Di Vito C, Mikulak J, Mavilio D (2019) On the way to become a natural killer cell. *Front Immunol* 10:1812. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01812>
20. Morgado S, Sanchez-Correa B, Casado JG, Duran E, Gayoso I, Labella F, Solana R, Tarazona R (2011) NK cell recognition and killing of melanoma cells is controlled by multiple activating receptor-ligand interactions. *J Innate Immun* 3:365–373. <https://doi.org/10.1159/000328505>
21. Paul S, Lal G (2017) The molecular mechanism of natural killer cells function and its importance in cancer immunotherapy. *Front Immunol* 8:1124. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01124>
22. Vivier E, Rautel DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331:44–49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>
23. Sanchez-Correa B, Lopez-Sejas N, Duran E, Labella F, Alonso C, Solana R, Tarazona R (2019) Modulation of NK cells with checkpoint inhibitors in the context of cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 68:861–870. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02336-6>
24. Sanchez-Correa B, Valhondo I, Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Pera A, Bergua JM, Arcos MJ, Banas H, Casas-Aviles I, Duran E, Alonso C, Solana R, Tarazona R (2019) DNAM-1 and the TIGIT/PVRIG/TACTILE axis: novel immune checkpoints for natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancers (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/cancers11060877>
25. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK (2016) Lag-3, Tim-3, and TIGIT: co-inhibitory receptors with specialized functions in immune regulation. *Immunity* 44:989–1004. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.05.001>
26. Joller N, Kuchroo VK (2017) Tim-3, Lag-3, and TIGIT. *Curr Top Microbiol Immunol* 410:127–156. https://doi.org/10.1007/82_2017_62
27. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727–729. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.727>
28. Sivori S, Vitale M, Morelli L, Sanseverino L, Augugliaro R, Bottino C, Moretta L, Moretta A (1997) p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med* 186:1129–1136. <https://doi.org/10.1084/jem.186.7.1129>
29. Pende D, Parolini S, Pessino A, Sivori S, Augugliaro R, Morelli L, Marcenaro E, Accame L, Malaspina A, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A (1999) Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505–1516. <https://doi.org/10.1084/jem.190.10.1505>
30. Vitale M, Bottino C, Sivori S, Sanseverino L, Castriconi R, Marcenaro E, Augugliaro R, Moretta L, Moretta A (1998) NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065–2072. <https://doi.org/10.1084/jem.187.12.2065>
31. Shibuya A, Campbell D, Hannum C, Yssel H, Franz-Bacon K, McClanahan T, Kitamura T, Nicholl J, Sutherland GR, Lanier LL, Phillips JH (1996) DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4:573–581. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)70060-4](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)70060-4)
32. Casado JG, Pawelec G, Morgado S, Sanchez-Correa B, Delgado E, Gayoso I, Duran E, Solana R, Tarazona R (2009) Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother* 58:1517–1526. <https://doi.org/10.1007/s00262-009-0682-y>
33. Sanchez-Correa B, Morgado S, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Arcos MJ, Bengochea ML, Duran E, Solana R, Tarazona R (2011) Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother* 60:1195–1205. <https://doi.org/10.1007/s00262-011-1050-2>
34. Solana R, Campos C, Pera A, Tarazona R (2014) Shaping of NK cell subsets by aging. *Curr Opin Immunol* 29:56–61. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.04.002>
35. Campos C, Pera A, Sanchez-Correa B, Alonso C, Lopez-Fernandez I, Morgado S, Tarazona R, Solana R (2014) Effect of age and CMV on NK cell subpopulations. *Exp Gerontol* 54:130–137. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2014.01.008>
36. Chidrawar SM, Khan N, Chan YL, Nayak L, Moss PA (2006) Ageing is associated with a decline in peripheral blood CD56bright NK cells. *Immun Ageing* 3:10. <https://doi.org/10.1186/1742-4933-3-10>
37. Fali T, Papagno L, Bayard C, Mouloud Y, Boddaert J, Sauce D, Appay V (2019) New insights into lymphocyte differentiation and aging from telomere length and telomerase activity measurements. *J Immunol* 202:1962–1969. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801475>
38. Lopez-Verges S, Milush JM, Schwartz BS, Pando MJ, Jarjoura J, York VA, Houchins JP, Miller S, Kang SM, Norris PJ, Nixon DF, Lanier LL (2011) Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:14725–14732. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110900108>
39. Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK cell differentiation uncoupled from NK cell education. *Blood* 116:3853–3864. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-04-281675>

40. Campos C, Lopez N, Pera A, Gordillo JJ, Hassouneh F, Tarazona R, Solana R (2015) Expression of NKP30, NKP46 and DNAM-1 activating receptors on resting and IL-2 activated NK cells from healthy donors according to CMV-serostatus and age. *Biogerontology* 16:671–683. <https://doi.org/10.1007/s10522-015-9581-0>
41. Foley B, Cooley S, Verneris MR, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, Lopez-Verges S, Lanier LL, Weisdorf D, Miller JS (2012) Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C⁺ natural killer cells with potent function. *Blood* 119:2665–2674. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>
42. Solana R, Tarazona R, Aiello AE, Akbar AN, Appay V, Beswick M, Bosch JA, Campos C, Cantisan S, Cicin-Sain L, Derhovnessian E, Ferrando-Martinez S, Frasca D, Fulop T, Govind S, Grubeck-Loebenstein B, Hill A, Hurme M, Kern F, Larbi A, Lopez-Botet M, Maier AB, McElhaney JE, Moss P, Naumova E, Nikolich-Zugich J, Pera A, Rector JL, Riddell N, Sanchez-Correa B, Sansoni P, Sauce D, van Rene L, Wang GC, Wills MR, Zieliński M, Pawelec G (2012) CMV and immunosenescence: from basics to clinics. *Immun Ageing* 9:23. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-10-386995>
43. Lopez-Sejas N, Campos C, Hassouneh F, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Pera A, Solana R (2016) Effect of CMV and aging on the differential expression of CD300a, CD161, T-bet, and Eomes on NK Cell subsets. *Front Immunol* 7:476. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00476>
44. Hassouneh F, Lopez-Sejas N, Campos C, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Solana R, Pera A (2017) Differential effect of cytomegalovirus infection with age on the expression of CD57, CD300a, and CD161 on T-cell subpopulations. *Front Immunol* 8:649. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00649>
45. Pera A, Vasudev A, Tan C, Kared H, Solana R, Larbi A (2017) CMV induces expansion of highly polyfunctional CD4⁺ T cell subset coexpressing CD57 and CD154. *J Leukoc Biol* 101:555–566. <https://doi.org/10.1189/jlb.4A0316-112R>
46. Pera A, Campos C, Corona A, Sanchez-Correa B, Tarazona R, Larbi A, Solana R (2014) CMV latent infection improves CD8⁺ T response to SEB due to expansion of polyfunctional CD57⁺ cells in young individuals. *PLoS ONE* 9:e88538. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088538>
47. Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225–274
48. Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T (2009) Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* 113:5488–5496
49. Loh J, Chu DT, O'Guin AK, Yokoyama WM, Virgin HW (2005) Natural killer cells utilize both perforin and gamma interferon to regulate murine cytomegalovirus infection in the spleen and liver. *J Virol* 79:661–667
50. Fang M, Lanier LL, Sigal LJ (2008) A role for NKG2D in NK cell-mediated resistance to poxvirus disease. *PLoS Pathog* 4:e30
51. Beli E, Clinthorne JF, Duriancik DM, Hwang I, Kim S, Gardner EM (2011) Natural killer cell function is altered during the primary response of aged mice to influenza infection. *Mech Ageing Dev* 132:503–510
52. Fang M, Roscoe F, Sigal LJ (2010) Age-dependent susceptibility to a viral disease due to decreased natural killer cell numbers and trafficking. *J Exp Med* 207:2369–2381
53. Nogusa S, Ritz BW, Kassim SH, Jennings SR, Gardner EM (2008) Characterization of age-related changes in natural killer cells during primary influenza infection in mice. *Mech Ageing Dev* 129:223–230
54. Duan X, Lu J, Wang H, Liu X, Wang J, Zhou K, Jiang W, Wang Y, Fang M (2017) Bidirectional factors impact the migration of NK cells to draining lymph node in aged mice during influenza virus infection. *Exp Gerontol* 96:127–137
55. Beli E, Duriancik DM, Clinthorne JF, Lee T, Kim S, Gardner EM (2014) Natural killer cell development and maturation in aged mice. *Mech Ageing Dev* 135:33–40
56. Shehata HM, Hoebe K, Chouhnet CA (2015) The aged nonhematopoietic environment impairs natural killer cell maturation and function. *Aging Cell* 14:191–199
57. Chiu BC, Martin BE, Stolberg VR, Chensue SW (2013) The host environment is responsible for aging-related functional NK cell deficiency. *J Immunol* 191:4688–4698
58. Nair S, Fang M, Sigal LJ (2015) The natural killer cell dysfunction of aged mice is due to the bone marrow stroma and is not restored by IL-15/IL-15Ralpha treatment. *Aging Cell* 14:180–190
59. Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH, Yokoyama WM (2002) Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:8826–8831. <https://doi.org/10.1073/pnas.092258599>
60. Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL (2002) Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science* 296:1323–1326. <https://doi.org/10.1126/science.1070884>
61. Orr MT, Sun JC, Hesslein DG, Arase H, Phillips JH, Takai T, Lanier LL (2009) Ly49H signaling through DAP10 is essential for optimal natural killer cell responses to mouse cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 206:807–817
62. Sun JC, Madera S, Bezman NA, Beilke JN, Kaplan MH, Lanier LL (2012) Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J Exp Med* 209:947–954. <https://doi.org/10.1084/jem.20111760>
63. Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, Lopez-Botet M (2006) Expansion of CD94/NKG2C⁺ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood* 107:3624–3631
64. Lopez-Botet M, Muntasell A, Vilches C (2014) The CD94/NKG2C⁺ NK-cell subset on the edge of innate and adaptive immunity to human cytomegalovirus infection. *Semin Immunol* 26:145–151
65. Muntasell A, Vilches C, Angulo A, Lopez-Botet M (2013) Adaptive reconfiguration of the human NK-cell compartment in response to cytomegalovirus: a different perspective of the host-pathogen interaction. *Eur J Immunol* 43:1133–1141
66. Bjorkstrom NK, Lindgren T, Stoltz M, Fauriat C, Braun M, Evander M, Michaelsson J, Malmberg KJ, Klingstrom J, Ahlm C, Ljunggren HG (2011) Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med* 208:13–21
67. Petitdemange C, Becquart P, Wauquier N, Beziat V, Debre P, Leroy EM, Vieillard V (2011) Unconventional repertoire profile is imprinted during acute chikungunya infection for natural killer cells polarization toward cytotoxicity. *PLoS Pathog* 7:e1002268
68. Hendricks DW, Balfour HH Jr, Dunmire SK, Schmeling DO, Hogquist KA, Lanier LL (2014) Cutting edge: NKG2C(hi) CD57⁺ NK cells respond specifically to acute infection with cytomegalovirus and not Epstein-Barr virus. *J Immunol* 192:4492–4496
69. Merino A, Zhang B, Dougherty P, Luo X, Wang J, Blazar BR, Miller JS, Cichocki F (2019) Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprogramming. *J Clin Invest* 130:3770–3785
70. Paust S, Gill HS, Wang BZ, Flynn MP, Moseman EA, Senman B, Szczepanik M, Telenti A, Askenase PW, Compans RW, von Andrian UH (2010) Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol* 11:1127–1135

71. Nikzad R, Angelo LS, Aviles-Padilla K, Le DT, Singh VK, Bimler L, Vukmanovic-Stejic M, Vendrame E, Ranganath T, Simpson L, Haigwood NL, Blish CA, Akbar AN, Paust S (2019) Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens. *Sci Immunol* 4:eaat8116
72. Hydes T, Abuhilal M, Armstrong T, Primrose J, Takhar A, Khakoo S (2015) Natural killer cell maturation markers in the human liver and expansion of an NKG2C⁺ KIR⁺ population. *Lancet* 385(Suppl 1):S45
73. Sivori S, Meazza R, Quintarelli C, Carlomagno S, Della CM, Falco M, Moretta L, Locatelli F, Pende D (2019) NK Cell-based immunotherapy for hematological malignancies. *J Clin Med*. <https://doi.org/10.3390/jcm8101702>
74. Verheyden S, Bernier M, Demanet C (2004) Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 18:2002–2007. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403525>
75. Zhang Y, Wang B, Ye S, Liu S, Liu M, Shen C, Teng Y, Qi J (2010) Killer cell immunoglobulin-like receptor gene polymorphisms in patients with leukemia: possible association with susceptibility to the disease. *Leuk Res* 34:55–58. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.04.022>
76. He Y, Bunn PA, Zhou C, Chan D (2016) KIR 2D (L1, L3, L4, S4) and KIR 3DL1 protein expression in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 7:82104–82111. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13486>
77. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty D, Olive D, Costello RT (2007) Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* 109:323–330. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-08-027979>
78. Stringaris K, Sekine T, Khoder A, Alsuliman A, Razzaghi B, Sargeant R, Pavlu J, Brisley G, de Lavallade H, Sarvaria A, Marin D, Mielke S, Apperley JF, Shpall EJ, Barrett AJ, Rezvani K (2014) Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 99:836–847. <https://doi.org/10.3324/haematol.2013.087536>
79. Pasero C, Gravis G, Granjeaud S, Guerin M, Thomassin-Piana J, Rocchi P, Salem N, Walz J, Moretta A, Olive D (2015) Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* 6:14360–14373. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3965>
80. Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, Wang J, Song J, Zheng M, Sun H, Wei H, Xiao W, Sun R, Tian Z (2017) High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology* 6:e1264562. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1264562>
81. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R, Tarazona R (2012) Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* 90:109–115. <https://doi.org/10.1038/icb.2011.15>
82. Sanchez-Correa B, Bergua JM, Pera A, Campos C, Arcos MJ, Banas H, Duran E, Solana R, Tarazona R (2017) In vitro culture with interleukin-15 leads to expression of activating receptors and recovery of natural killer cell function in acute myeloid leukemia patients. *Front Immunol* 8:931. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00931>
83. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro AS, Falcao RR, Abdelhay E, Bouzas LF, Thuler LC, Ornellas MH, Diamond HR (2011) Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol* 72:319–329. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2011.01.009>
84. Liu H, Wang S, Xin J, Wang J, Yao C, Zhang Z (2019) Role of NKG2D and its ligands in cancer immunotherapy. *Am J Cancer Res* 9:2064–2078
85. Kaifu T, Nakamura A (2017) Polymorphisms of immunoglobulin receptors and the effects on clinical outcome in cancer immunotherapy and other immune diseases: a general review. *Int Immunol* 29:319–325. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxx041>
86. Tarazona R, Casado JG, Soto R, DelaRosa O, Peralbo E, Rioja L, Pena J, Solana R (2004) Expression of NK-associated receptors on cytotoxic T cells from melanoma patients: a two-edged sword? *Cancer Immunol Immunother* 53:911–924
87. Hofer E, Koehl U (2017) Natural killer cell-based cancer immunotherapies: from immune evasion to promising targeted cellular therapies. *Front Immunol* 8:745
88. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Leitman S, Chang AE, Ettinghausen SE, Matory YL, Skibber JM, Shiloni E, Vetto JT (1985) Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *N Engl J Med* 313:1485–1492. <https://doi.org/10.1056/NEJM198512053132327>
89. Pangrazzi L, Meryk A, Naismith E, Koziel R, Lair J, Krismer M, Trieb K, Grubeck-Loebenstien B (2017) “Inflamm-aging” influences immune cell survival factors in human bone marrow. *Eur J Immunol* 47:481–492
90. Yalcin A, Silay K, Balik AR, Avcioglu G, Aydin AS (2018) The relationship between plasma interleukin-15 levels and sarcopenia in outpatient older people. *Aging Clin Exp Res* 30:783–790
91. Al-Attar A, Presnell SR, Clasey JL, Long DE, Walton RG, Sexton M, Starr ME, Kern PA, Peterson CA, Lutz CT (2018) Human body composition and immunity: visceral adipose tissue produces IL-15 and muscle strength inversely correlates with NK cell function in elderly humans. *Front Immunol* 9:440
92. Ochoa MC, Minute L, Rodriguez I, Garasa S, Perez-Ruiz E, Inoges S, Melero I, Berraondo P (2017) Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunol Cell Biol* 95:347–355
93. Gluck L, Hurst D, Yuen A, Levine AM, Dayton MA, Gockerman JP, Lucas J, Denis-Mize K, Tong B, Navis D, Difrancesco A, Milan S, Wilson SE, Wolin M (2004) Phase I studies of interleukin (IL)-2 and rituximab in B-cell non-Hodgkin’s lymphoma: IL-2 mediated natural killer cell expansion correlations with clinical response. *Clin Cancer Res* 10:2253–2264. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-1087-3>
94. Leivas A, Perez-Martinez A, Blanchard MJ, Martin-Clavero E, Fernandez L, Lahuerta JJ, Martinez-Lopez J (2016) Novel treatment strategy with autologous activated and expanded natural killer cells plus anti-myeloma drugs for multiple myeloma. *Oncoimmunology* 5:e1250051. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1250051>
95. Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 28:955–959. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.4590>
96. Ansell SM, Geyer SM, Maurer MJ, Kurtin PJ, Micallef IN, Stella P, Etzell P, Novak AJ, Erlichman C, Witzig TE (2006) Randomized phase II study of interleukin-12 in combination with rituximab in previously treated non-Hodgkin’s lymphoma patients. *Clin Cancer Res* 12:6056–6063. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1245>
97. Parihar R, Nadella P, Lewis A, Jensen R, De HC, Dierksheide JE, VanBuskirk AM, Magro CM, Young DC, Shapiro CL, Carson WE III (2004) A phase I study of interleukin 12 with trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor-2-over-expressing malignancies: analysis of sustained interferon gamma

- production in a subset of patients. *Clin Cancer Res* 10:5027–5037. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-0265>
98. Charych DH, Hoch U, Langowski JL, Lee SR, Addepalli MK, Kirk PB, Sheng D, Liu X, Sims PW, VanderVeen LA, Ali CF, Chang TK, Konakova M, Pena RL, Kanhere RS, Kirksey YM, Ji C, Wang Y, Huang J, Sweeney TD, Kantak SS, Doberstein SK (2016) NKTR-214, an engineered cytokine with biased IL2 receptor binding, increased tumor exposure, and marked efficacy in mouse tumor models. *Clin Cancer Res* 22:680–690
 99. Bentebibel SE, Hurwitz ME, Bernatchez C, Haymaker C, Hudgens CW, Kluger HM, Tetzlaff MT, Tagliaferri MA, Zalevsky J, Hoch U, Fanton C, Aung S, Hwu P, Curti BD, Tannir NM, Szol M, Diab A (2019) A first-in-human study and biomarker analysis of NKTR-214, a novel IL2Rbetagamma-biased cytokine, in patients with advanced or metastatic solid tumors. *Cancer Discov* 9:711–721
 100. Croce M, Rigo V, Ferrini S (2015) IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. *J Immunol Res* 2015:696578. <https://doi.org/10.1155/2015/696578>
 101. Wu Y, Tian Z, Wei H (2017) Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. *Front Immunol* 8:930. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00930>
 102. Gleason MK, Ross JA, Warlick ED, Lund TC, Verneris MR, Wiernik A, Spellman S, Haagenson MD, Lenvik AJ, Litzow MR, Epling-Burnette PK, Blazar BR, Weiner LM, Weisdorf DJ, Vallera DA, Miller JS (2014) CD16xCD33 bispecific killer cell engager (BiKE) activates NK cells against primary MDS and MDSC CD33⁺ targets. *Blood* 123:3016–3026
 103. Davis ZB, Vallera DA, Miller JS, Felices M (2017) Natural killer cells unleashed: checkpoint receptor blockade and BiKE/TriKE utilization in NK-mediated anti-tumor immunotherapy. *Semin Immunol* 31:64–75. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2017.07.011>
 104. Wang LX, Tong X, Li C, Giddens JP, Li T (2019) Glycoengineering of antibodies for modulating functions. *Annu Rev Biochem* 88:433–459. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012911>
 105. Kim N, Kim HS (2018) Targeting checkpoint receptors and molecules for therapeutic modulation of natural killer cells. *Front Immunol* 9(2041):2041. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02041>
 106. Pesce S, Greppi M, Grossi F, Del ZG, Moretta L, Sivori S, Genova C, Marcenaro E (2019) PD-1-PD-Ls checkpoint: insight on the potential role of NK cells. *Front Immunol* 10:1242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01242>
 107. Andre P, Denis C, Soulas C, Bourbon-Caillet C, Lopez J, Arnoux T, Blery M, Bonnafont C, Gauthier L, Morel A, Rossi B, Remark R, Bresó V, Bonnet E, Habib G, Guia S, Lalanne AI, Hoffmann C, Lantz O, Fayette J, Boyer-Chammard A, Zerbib R, Dodion P, Ghadially H, Jure-Kunkel M, Morel Y, Herbst R, Narni-Mancinelli E, Cohen RB, Vivier E (2018) Anti-NKG2A mAb is a checkpoint inhibitor that promotes anti-tumor immunity by unleashing both T and NK cells. *Cell* 175:1731–1743. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.014>
 108. Vey N, Karlin L, Sadot-Lebouvier S, Broussais F, Berton-Rigaud D, Rey J, Charbonnier A, Marie D, Andre P, Paturel C, Zerbib R, Bannouna J, Salles G, Goncalves A (2018) A phase 1 study of lirilumab (antibody against killer immunoglobulin-like receptor antibody KIR2D; IPH2102) in patients with solid tumors and hematologic malignancies. *Oncotarget* 9:17675–17688. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24832>
 109. Romagne F, Andre P, Spee P, Zahn S, Anfossi N, Gauthier L, Capanni M, Ruggeri L, Benson DM Jr, Blaser BW, Della CM, Moretta A, Vivier E, Caligiuri MA, Velardi A, Wagtmann N (2009) Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells. *Blood* 114:2667–2677
 110. Carlsten M, Korde N, Kotecha R, Reger R, Bor S, Kazandjian D, Landgren O, Childs RW (2016) Checkpoint Inhibition of KIR2D with the monoclonal antibody IPH2101 induces contraction and hyporesponsiveness of NK cells in patients with myeloma. *Clin Cancer Res* 22:5211–5222. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1108>
 111. Felices M, Miller JS (2016) Targeting KIR blockade in multiple myeloma: trouble in checkpoint paradise? *Clin Cancer Res* 22:5161–5163. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1582>
 112. da Silva I, Gallois A, Jimenez-Baranda S, Khan S, Anderson AC, Kuchroo VK, Osman I, Bhardwaj N (2014) Reversal of NK-cell exhaustion in advanced melanoma by Tim-3 blockade. *Cancer Immunol Res* 2:410–422. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0171>
 113. Xu L, Huang Y, Tan L, Yu W, Chen D, Lu C, He J, Wu G, Liu X, Zhang Y (2015) Increased Tim-3 expression in peripheral NK cells predicts a poorer prognosis and Tim-3 blockade improves NK cell-mediated cytotoxicity in human lung adenocarcinoma. *Int Immunopharmacol* 29:635–641. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2015.09.017>
 114. Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, Toporik A, Levy O, Novik A, Levine Z, Beiman M, Dassa L, Achdout H, Stern-Ginossar N, Tsukerman P, Jonjic S, Mandelboim O (2009) The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:17858–17863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903474106>
 115. Xu F, Sunderland A, Zhou Y, Schulick RD, Edil BH, Zhu Y (2017) Blockade of CD112R and TIGIT signaling sensitizes human natural killer cell functions. *Cancer Immunol Immunother* 66:1367–1375. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2031-x>
 116. Suzuki H, Duncan GS, Takimoto H, Mak TW (1997) Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J Exp Med* 185:499–505. <https://doi.org/10.1084/jem.185.3.499>
 117. Choucair K, Duff JR, Cassidy CS, Albrethsen MT, Kelso JD, Lenhard A, Staats H, Patel R, Brunicardi FC, Dworkin L, Nemanitis J (2019) Natural killer cells: a review of biology, therapeutic potential and challenges in treatment of solid tumors. *Future Oncol* 15:3053–3069. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0116>
 118. McKenna DH Jr, Sumstad D, Bostrom N, Kadidlo DM, Fautsch S, McNearney S, Dewaard R, McGlave PB, Weisdorf DJ, Wagner JE, McCullough J, Miller JS (2007) Good manufacturing practices production of natural killer cells for immunotherapy: a six-year single-institution experience. *Transfusion* 47:520–528. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.01145.x>
 119. Masuyama J, Murakami T, Iwamoto S, Fujita S (2016) Ex vivo expansion of natural killer cells from human peripheral blood mononuclear cells co-stimulated with anti-CD3 and anti-CD52 monoclonal antibodies. *Cytotherapy* 18:80–90. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.09.011>
 120. Bachanova V, Burns LJ, McKenna DH, Curtsinger J, Panoskaltis-Mortari A, Lindgren BR, Cooley S, Weisdorf D, Miller JS (2010) Allogeneic natural killer cells for refractory lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* 59:1739–1744. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0896-z>
 121. Lapteva N, Durett AG, Sun J, Rollins LA, Huye LL, Fang J, Dandekar V, Mei Z, Jackson K, Vera J, Ando J, Ngo MC, Coustan-Smith E, Campana D, Szmania S, Garg T, Moreno-Bost A, Vanrhee F, Gee AP, Rooney CM (2012) Large-scale ex vivo expansion and characterization of natural killer cells for clinical applications. *Cytotherapy* 14:1131–1143. <https://doi.org/10.3109/14653249.2012.700767>
 122. Cany J, Dolstra H, Shah N (2015) Umbilical cord blood-derived cellular products for cancer immunotherapy. *Cytotherapy* 17:739–748. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.005>


123. Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Monge J, Santos S, Vesga MA, Maruri N, Arrieta A, Rinon M, Tamayo-Orbegozo E, Amo L, Larrucea S, Borrego F (2014) Natural killer cells for cancer immunotherapy: pluripotent stem cells-derived NK cells as an immunotherapeutic perspective. *Front Immunol* 5:439. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00439>
124. Nayyar G, Chu Y, Cairo MS (2019) Overcoming resistance to natural killer cell based immunotherapies for solid tumors. *Front Oncol* 9:51. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00051>
125. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG, Tonn T (2016) NK-92: an ‘off-the-shelf therapeutic’ for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 65:485–492. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1761-x>
126. Koepsell SA, Miller JS, McKenna DH Jr (2013) Natural killer cells: a review of manufacturing and clinical utility. *Transfusion* 53:404–410. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03724.x>
127. Dykes JH, Toporski J, Juliusson G, Bekassy AN, Lenhoff S, Lindmark A, Scheduling S (2007) Rapid and effective CD3 T-cell depletion with a magnetic cell sorting program to produce peripheral blood progenitor cell products for haploidentical transplantation in children and adults. *Transfusion* 47:2134–2142. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01438.x>
128. Koehl U, Brehm C, Huenecke S, Zimmermann SY, Kloess S, Bremm M, Ullrich E, Soerensen J, Quaiser A, Erben S, Wunram C, Gardlowski T, Auth E, Tonn T, Seidl C, Meyer-Monard S, Stern M, Passweg J, Klingebiel T, Bader P, Schwabe D, Esser R (2013) Clinical grade purification and expansion of NK cell products for an optimized manufacturing protocol. *Front Oncol* 3:118. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00118>
129. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E (2009) Graft-versus-host disease. *Lancet* 373:1550–1561. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60237-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60237-3)
130. Chan YLT, Zuo J, Inman C, Croft W, Begum J, Croudace J, Kinsella F, Maggs L, Nagra S, Nunnick J, Abbotts B, Craddock C, Malladi R, Moss P (2018) NK cells produce high levels of IL-10 early after allogeneic stem cell transplantation and suppress development of acute GVHD. *Eur J Immunol* 48:316–329. <https://doi.org/10.1002/eji.201747134>
131. Oyer JL, Igarashi RY, Kulikowski AR, Colosimo DA, Solh MM, Zakari A, Khaled YA, Altomare DA, Copik AJ (2015) Generation of highly cytotoxic natural killer cells for treatment of acute myelogenous leukemia using a feeder-free, particle-based approach. *Biol Blood Marrow Transplant* 21:632–639. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.12.037>
132. Lapteva N, Szmania SM, van Rhee F, Rooney CM (2014) Clinical grade purification and expansion of natural killer cells. *Crit Rev Oncog* 19:121–132. <https://doi.org/10.1615/CritRevOncog.2014010931>
133. Zwirner NW, Domaica CI (2010) Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *BioFactors* 36:274–288. <https://doi.org/10.1002/biof.107>
134. Freund-Brown J, Chirino L, Kambayashi T (2018) Strategies to enhance NK cell function for the treatment of tumors and infections. *Crit Rev Immunol* 38:105–130. <https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2018025248>
135. Romee R, Leong JW, Fehniger TA (2014) Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica (Cairo)* 2014:205796. <https://doi.org/10.1155/2014/205796>
136. Swann JB, Hayakawa Y, Zerafa N, Sheehan KC, Scott B, Schreiber RD, Hertzog P, Smyth MJ (2007) Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol* 178:7540–7549. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.7540>
137. Cho D, Campana D (2009) Expansion and activation of natural killer cells for cancer immunotherapy. *Korean J Lab Med* 29:89–96. <https://doi.org/10.3343/kjlm.2009.29.2.89>
138. Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ, Rosenberg SA (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155:1823–1841. <https://doi.org/10.1084/jem.155.6.1823>
139. Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, DeFor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki JJ, McGlave PB (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105:3051–3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2974>
140. Burns LJ, Weisdorf DJ, DeFor TE, Vesole DH, Repka TL, Blazar BR, Burger SR, Panoskaltis-Mortari A, Keever-Taylor CA, Zhang MJ, Miller JS (2003) IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant* 32:177–186. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1704086>
141. Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, Doufexis D, Ardavanis A, Baxevanis CN, Rigatos G, Papamichail M, Perez SA (2010) A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59:1781–1789. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0904-3>
142. Mao Y, van Hoef V, Zhang X, Wennerberg E, Lorent J, Witt K, Masvidal L, Liang S, Murray S, Larsson O, Kiessling R, Lundqvist A (2016) IL-15 activates mTOR and primes stress-activated gene expression leading to prolonged antitumor capacity of NK cells. *Blood* 128:1475–1489. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-02-698027>
143. Pillet AH, Bugault F, Theze J, Chakrabarti LA, Rose T (2009) A programmed switch from IL-15- to IL-2-dependent activation in human NK cells. *J Immunol* 182:6267–6277. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0801933>
144. Skak K, Frederiksen KS, Lundsgaard D (2008) Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* 123:575–583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02730.x>
145. Boyiadzis M, Memon S, Carson J, Allen K, Szczepanski MJ, Vance BA, Dean R, Bishop MR, Gress RE, Hakim FT (2008) Up-regulation of NK cell activating receptors following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation under a lymphodepleting reduced intensity regimen is associated with elevated IL-15 levels. *Biol Blood Marrow Transplant* 14:290–300. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2007.12.490>
146. van Ostaijen-ten Dam MM, Prins HJ, Boerman GH, Vervat C, Pende D, Putter H, Lankester A, van Tol MJ, Zwaginga JJ, Schilham MW (2016) Preparation of cytokine-activated nk cells for use in adoptive cell therapy in cancer patients: protocol optimization and therapeutic potential. *J Immunother* 39:90–100. <https://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000110>
147. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G (1989) Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170:827–845. <https://doi.org/10.1084/jem.170.3.827>
148. Ni J, Miller M, Stojanovic A, Garbi N, Cerwenka A (2012) Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 209:2351–2365. <https://doi.org/10.1084/jem.20120944>

149. Ni J, Holsken O, Miller M, Hammer Q, Luetke-Eversloh M, Romagnani C, Cerwenka A (2016) Adoptively transferred natural killer cells maintain long-term antitumor activity by epigenetic imprinting and CD4(+) T cell help. *Oncoimmunology* 5:e1219009. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1219009>
150. Ahn YO, Kim S, Kim TM, Song EY, Park MH, Heo DS (2013) Irradiated and activated autologous PBMCs induce expansion of highly cytotoxic human NK cells in vitro. *J Immunother* 36:373–381. <https://doi.org/10.1097/CJI.0b013e3182a3430f>
151. Carlens S, Gilljam M, Chambers BJ, Aschan J, Guven H, Ljunggren HG, Christensson B, Dilber MS (2001) A new method for in vitro expansion of cytotoxic human CD3⁻ CD56⁺ natural killer cells. *Hum Immunol* 62:1092–1098. [https://doi.org/10.1016/S0198-8859\(01\)00313-5](https://doi.org/10.1016/S0198-8859(01)00313-5)
152. Granzin M, Wagner J, Kohl U, Cerwenka A, Huppert V, Ullrich E (2017) Shaping of natural killer cell antitumor activity by ex vivo cultivation. *Front Immunol* 8:458. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00458>
153. Bae DS, Lee JK (2014) Development of NK cell expansion methods using feeder cells from human myelogenous leukemia cell line. *Blood Res* 49:154–161. <https://doi.org/10.5045/br.2014.49.3.154>
154. Alici E, Sutlu T, Bjorkstrand B, Gilljam M, Stellan B, Nahi H, Quezada HC, Gahrton G, Ljunggren HG, Dilber MS (2008) Autologous antitumor activity by NK cells expanded from myeloma patients using GMP-compliant components. *Blood* 111:3155–3162. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-110312>
155. Barkholt L, Alici E, Conrad R, Sutlu T, Gilljam M, Stellan B, Christensson B, Guven H, Bjorkstrom NK, Soderdahl G, Cederlund K, Kimby E, Aschan J, Ringden O, Ljunggren HG, Dilber MS (2009) Safety analysis of ex vivo-expanded NK and NK-like T cells administered to cancer patients: a phase I clinical study. *Immunotherapy* 1:753–764. <https://doi.org/10.2217/imt.09.47>
156. Sutlu T, Alici E (2011) Ex vivo expansion of natural killer cells: a question of function. *Cytotherapy* 13:767–768. <https://doi.org/10.3109/14653249.2011.563295>
157. Miller JS, Oelkers S, Verfaillie C, McGlave P (1992) Role of monocytes in the expansion of human activated natural killer cells. *Blood* 80:2221–2229
158. Perussia B, Ramoni C, Anegon I, Cuturi MC, Faust J, Trinchieri G (1987) Preferential proliferation of natural killer cells among peripheral blood mononuclear cells cocultured with B lymphoblastoid cell lines. *Nat Immun Cell Growth Regul* 6:171–188
159. Sakamoto N, Ishikawa T, Kokura S, Okayama T, Oka K, Ideno M, Sakai F, Kato A, Tanabe M, Enoki T, Mineno J, Naito Y, Itoh Y, Yoshikawa T (2015) Phase I clinical trial of autologous NK cell therapy using novel expansion method in patients with advanced digestive cancer. *J Transl Med* 13:277. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0632-8>
160. Imai C, Iwamoto S, Campana D (2005) Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106:376–383. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-12-4797>
161. Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockett T, Eldridge P, Leung WH, Campana D (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res* 69:4010–4017. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3712>
162. Voskens CJ, Watanabe R, Rollins S, Campana D, Hasumi K, Mann DL (2010) Ex-vivo expanded human NK cells express activating receptors that mediate cytotoxicity of allogeneic and autologous cancer cell lines by direct recognition and antibody directed cellular cytotoxicity. *J Exp Clin Cancer Res* 29:134. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-134>
163. Caunday O, Bensoussan D, Decot V, Bordigoni P, Stoltz JF (2009) Regulatory aspects of cellular therapy product in Europe: JACIE accreditation in a processing facility. *Biomed Mater Eng* 19:373–379
164. Sadelain M, Brentjens R, Riviere I (2013) The basic principles of chimeric antigen receptor design. *Cancer Discov* 3:388–398. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0548>
165. Kohl U, Arsenieva S, Holzinger A, Abken H (2018) CAR T cells in trials: recent achievements and challenges that remain in the production of modified T cells for clinical applications. *Hum Gene Ther* 29:559–568. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.254>
166. Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A, June CH (2011) T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. *Sci Transl Med* 3:95ra73. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002842>
167. Hu Y, Tian Z, Zhang C (2019) Natural killer cell-based immunotherapy for cancer: advances and prospects. *Engineering* 5:106–114. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.11.015>
168. Bonifant CL, Jackson HJ, Brentjens RJ, Curran KJ (2016) Toxicity and management in CAR T-cell therapy. *Mol Ther Oncolytics* 3:16011. <https://doi.org/10.1038/mto.2016.11>
169. Shimabukuro-Vornhagen A, Godel P, Subklewe M, Stemmler HJ, Schlosser HA, Schlaak M, Kochanek M, Boll B, von Bergwelt-Baildon MS (2018) Cytokine release syndrome. *J Immunother Cancer* 6:56. <https://doi.org/10.1186/s40425-018-0343-9>
170. Rubnitz JE, Inaba H, Kang G, Gan K, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Shook D, Gruber T, Pui CH, Leung W (2015) Natural killer cell therapy in children with relapsed leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 62:1468–1472. <https://doi.org/10.1002/psc.25555>
171. Nguyen R, Wu H, Pounds S, Inaba H, Ribeiro RC, Cullins D, Rooney B, Bell T, Lacayo NJ, Heym K, Degar B, Schiff D, Janssen WE, Triplett B, Pui CH, Leung W, Rubnitz JE (2019) A phase II clinical trial of adoptive transfer of haploidentical natural killer cells for consolidation therapy of pediatric acute myeloid leukemia. *J Immunother Cancer* 7:81. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0564-6>
172. Lee DA, Denman CJ, Rondon G, Woodworth G, Chen J, Fisher T, Kaur I, Fernandez-Vina M, Cao K, Ciurea S, Shpall EJ, Champlin RE (2016) Haploidentical natural killer cells infused before allogeneic stem cell transplantation for myeloid malignancies: a phase I trial. *Biol Blood Marrow Transplant* 22:1290–1298. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2016.04.009>
173. Bjorklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, Cooley S, Miller JS, Klimkowska M, Schaffer M, Watz E, Wikstrom K, Blomberg P, Wahlin BE, Palma M, Hansson L, Ljungman P, Hellstrom-Lindberg E, Ljunggren HG, Malmberg KJ (2018) Complete remission with reduction of high-risk clones following haploidentical NK-cell therapy against MDS and AML. *Clin Cancer Res* 24:1834–1844
174. Munoz BM, Vela CM, Fuster Soler JL, Astigarraga I, Pascual MA, Vagace Valero JM, Tong HY, Valentin QJ, Fernandez CL, Escudero LA, Sisinni L, Blanquer M, Mirones AI, Gonzalez MB, Borobia AM, Perez-Martinez A (2020) Study protocol for a phase II, multicentre, prospective, non-randomised clinical trial to assess the safety and efficacy of infusing allogeneic therapy and expanded natural killer cells as consolidation therapy for paediatric acute myeloblastic leukaemia. *BMJ Open* 10:e029642
175. Cooley S, He F, Bachanova V, Vercellotti GM, DeFor TE, Curt-singer JM, Robertson P, Grzywacz B, Conlon KC, Waldmann TA, McKenna DH, Blazar BR, Weisdorf DJ, Miller JS (2019) First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia. *Blood Adv* 3:1970–1980. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018.28332>
176. Szmania S, Lapteva N, Garg T, Greenway A, Lingo J, Nair B, Stone K, Woods E, Khan J, Stivers J, Panozzo S, Campana D, Bellamy WT, Robbins M, Epstein J, Yaccoby S, Waheed S, Gee

- A, Cottler-Fox M, Rooney C, Barlogie B, van Rhee F (2015) Ex vivo-expanded natural killer cells demonstrate robust proliferation in vivo in high-risk relapsed multiple myeloma patients. *J Immunother* 38:24–36. <https://doi.org/10.1097/CJI.00000000000000059>
177. Bachanova V, Sarhan D, DeFor TE, Cooley S, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Curtsinger JM, Burns L, Weisdorf DJ, Miller JS (2018) Haploidentical natural killer cells induce remissions in non-Hodgkin lymphoma patients with low levels of immunosuppressor cells. *Cancer Immunol Immunother* 67:483–494. <https://doi.org/10.1007/s00262-017-2100-1>
178. Adotevi O, Godet Y, Galaine J, Lakkis Z, Idirene I, Certoux JM, Jary M, Loyon R, Laheurte C, Kim S, Dormoy A, Pouthier F, Barisien C, Fein F, Tiberghien P, Pivot X, Valmary-Degano S, Ferrand C, Morel P, Delabrousse E, Borg C (2018) In situ delivery of allogeneic natural killer cell (NK) combined with Cetuximab in liver metastases of gastrointestinal carcinoma: a phase I clinical trial. *Oncoimmunology* 7:e1424673. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1424673>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Affiliations

Raquel Tarazona¹ · Nelson Lopez-Sejas¹ · Beatriz Guerrero¹ · Fakhri Hassouneh¹ · Isabel Valhondo¹ · Alejandra Pera^{2,3} · Beatriz Sanchez-Correa¹ · Nieves Pastor⁵ · Esther Duran⁵ · Corona Alonso^{3,4,6} · Rafael Solana^{2,3,4,6} 

¹ Immunology Unit, University of Extremadura, Cáceres, Spain

² University of Cordoba, Córdoba, Spain

³ Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC), Córdoba, Spain

⁴ Reina Sofia University Hospital, Córdoba, Spain

⁵ Department of Medicine, Faculty of Veterinary, University of Extremadura, Cáceres, Spain

⁶ Immunology Unit, IMIBIC-Reina Sofia University Hospital-University of Cordoba, Av. Menendez Pidal, 14004 Córdoba, Spain