



TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS DE EVASIÓN DE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN
CÁNCER DE PULMÓN: PAPEL DE LAS MOLÉCULAS HLA EN LA
INTERACCIÓN HUÉSPED-TUMOR**

Francisco Javier Perea García

Directores

Francisco Ruiz-Cabello Osuna

Abel Sánchez-Palencia Ramos

Programa Oficial de Doctorado de Bioquímica y Biología Molecular

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Francisco Javier Perea García
ISBN: 978-84-9163-810-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/50097>

El doctorando Francisco Javier Perea García y los directores de la tesis Francisco Ruíz-Cabello Osuna y Abel Sánchez-Palencia Ramos garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 22 de Diciembre de 2017

Fdo.: Director de la Tesis

Francisco Ruíz-Cabello Osuna

Fdo.: Director de la Tesis

Abel Sánchez-Palencia Ramos

Fdo.: Doctorando

Francisco Javier Perea García

El trabajo de esta tesis doctoral ha sido dado a conocer mediante la exposición de varias comunicaciones en congresos nacionales e internacionales, y la publicación de dos artículos científicos en las revistas *International Journal of Cancer* y *Oncotarget*, y una revisión en la revista *Vaccines*.

1. Publicaciones en *International Journal of Cancer*, *Vaccines* y *Oncotarget*:

- Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, Gómez-Morales M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int J Cancer*. 2017 Feb 15;140(4):888-899. doi: 10.1002/ijc.30489. Epub 2016 Nov 7. PubMed PMID: 27785783.
- Perea F, Sánchez-Palencia A, Gómez-Morales M, Bernal M, Concha A, Mendez-García M, González-Ramírez A, Kerick M, Martín J, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. *Oncotarget* 2017.
- Garrido F, Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines (Basel)*. 2017 Feb 27;5(1). pii: E7. doi: 10.3390/vaccines5010007. Review. Pubmed PMID: 28264447.

2. Congresos Internacionales

- Valenzuela Membrives MM, Sánchez-Palencia Ramos A, Perea García FJ, Ruiz Cabello-Osuna F, Jiménez Gámiz P, Farez Vidal ME. Comparative analysis of lymphoid subsets in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of lung cancer patients. European Respiratory Society (ERS) International Congress, Amsterdam, Netherlands, 26-30 Septiembre 2015.
- Valenzuela Membrives MM, Sánchez-Palencia Ramos A, Perea García FJ, Ruiz Cabello-Osuna F, Rodríguez A, Farez Vidal ME. Peripheral blood lymphocytes indicate an immunosuppressive status in lung cancer. European Respiratory Society (ERS) International Congress, Amsterdam, Netherlands, 26-30 Septiembre 2015.
- Francisco Perea, Mónica Bernal, Abel Sánchez-Palencia, Javier Carretero, Cristina Torres, Clara Bayarri, Mercedes Gómez-Morales, Francisco Ruiz-Cabello and Federico Garrido. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. 31st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI, European Federation for Immunogenetics), Mannheim, Heidelberg, Germany, 30 Mayo-2 Junio 2017.
- Francisco Perea, Mónica Bernal, Abel Sánchez-Palencia, Natalia Aptsiauri, Pilar Jiménez, Mercedes Gómez-Morales, Francisco Ruiz-Cabello and Federico Garrido. T

cell infiltration and macrophage polarization correlates with HLA class I expression in non-small cell lung cancer. 31st European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (EFI, European Federation for Immunogenetics), Mannheim, Heidelberg, Germany, 30Mayo-2Junio 2017.

3. Congresos Nacionales

- Francisco Javier Perea García, María del Mar Valenzuela Membrives, Abel Sanchez-Palencia Ramos, Mónica Bernal Sanchez, María Esther Farez Vidal, Francisco Ruiz-Cabello Osuna. Increased numbers of CD14+ DR- cells in peripheral blood of lung cancer patients. 39º Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI), Alicante, España, 5-7 Mayo 2016.
- Francisco Javier Perea García, Mónica Bernal Sánchez, Abel Sánchez Palencia Ramos, Maria del Mar Valenzuela Membrives, Francisco Ruiz-Cabello Osuna, Federico Garrido Torres-Puchol. Tumor HLA class I loss forms different stromal patterns in lung cancer. 39º Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI), Alicante, España, 5-7 Mayo 2016.
- Francisco Javier Perea García, María del Mar Valenzuela Membrives, Abel Sanchez-Palencia Ramos, Mónica Bernal María Esther Farez Vidal, Francisco Ruiz-Cabello Osuna. Analysis of malignant lesions and peripheral blood natural killer cells in lung cancer patients. 39 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI), Alicante, España, 5-7 Mayo 2016.
- Cristina Torres Durán, Otero Mar, Eva García, Mónica Bernal, Marta López, Francisco Perea, Teresa Cabrera, Francisco Ruiz-Cabello, Federico Garrido and Angel Concha. Colorectal cancer microsatellite instability is associated with a higher HLA class II expression frequency and a different leukocyte infiltration pattern. 39º Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI) Alicante, España, 5-7 Mayo 2016.
- Miguela Méndez García, Francisco Javier Carretero Coca, José Francisco Flores-Martín, Francisco Javier Perea García, Jose Manuel Cozar, Abel Sánchez-Palencia Ramos, Francisco Ruiz-Cabello, Federico Garrido, Natalia Aptsiauri HLA class I and PDL-1 expression in lung and bladder tumors and cancer cell lines treated with anti-“immune checkpoint” antibodies or HLA correcting gene therapy. 39º Congreso de la Sociedad Española de Inmunología(SEI), Alicante, España, 5-7 Mayo 2016.

4. Otras publicaciones

- Del Mar Valenzuela-Membrives M, Perea-García F, Sanchez-Palencia A, Ruiz-Cabello F, Gómez-Morales M, Miranda-León MT, Galindo-Angel I, Fárez-Vidal ME. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Nov 1;7(44):71608-71619. doi: 10.18632/oncotarget.12264. PubMed PMID: 27689405; PubMed Central PMCID: PMC5342105.

Agradecimientos

Estos han sido 3 años de duro trabajo y esfuerzo reflejados en la presente tesis. Me he llevado también buenos momentos y me quedo con eso. En primer lugar quería agradecer todo el apoyo recibido a mis directores de tesis. Al Dr. Francisco Ruiz-Cabello gracias por todo lo que me has enseñado en este tiempo y por acogerme en tu laboratorio y confiar en mí desde el primer momento. No hay palabras para agradecer todo lo que me has enseñado y ayudado en esta etapa de mi vida, por tus consejos que me han ayudado a mejorar como profesional, gracias se queda corto, y que decir la persona magnífica que eres. Dr. Abel Sánchez Palencia-Ramos, co-director de tesis y el cirujano que me proporciona las muestras para este estudio, sin tu colaboración este trabajo no hubiera sido posible, gran profesional, gran persona también, gracias por tu ayuda.

Al Dr. Federico Garrido por acogerme en su laboratorio y mostrarme su confianza. Por todo lo que he aprendido junto a él, por sus críticas acertadas sobre la calidad en el diseño experimental y en la elaboración de los trabajos. Finalmente, por haberme mostrado su confianza para integrarme en su grupo de investigación.

A la Dra. Mónica Bernal por su ayuda infinita en esta etapa en el hospital. Gracias por tu apoyo en los momentos que presentaba dificultades, por aguantarme todo este tiempo, por todo lo que me has enseñado y, sobre todo, me quedo con que no sólo has sido una compañera de trabajo sino que has sido una amiga con la que he compartido grandes momentos.

A la Dra. Teresa Rodríguez por su ayuda en las inmunohistoquímicas, las veces que te dado la lata con los anticuerpos, el escáner, etc. Gran persona, desde luego.

A la Dra. Natalia Aptsiauri por su acogida y su disponibilidad, una persona agradable y trabajadora. Siempre me has ayudado cuando te lo he pedido sin ningún inconveniente.

A la Dra. Pilar Jiménez por acogerme también en el laboratorio como uno más y enseñarme los secretos que esconde la citometría de flujo.

A Rocío y Teresa Miranda por su ayuda con el análisis estadístico, por enseñarme vuestros trucos y por todo lo que he aprendido de estadística, más que en la carrera incluso. Ha sido todo un placer trabajar con ustedes.

A todo el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario, toda esa gente que me ha ayudado en el laboratorio, técnicos y residentes, gracias a todos: A Eva por ser mi principal

maestra cuando llegue al laboratorio. Gracias por dedicarme una parte de tu tiempo, y por todo lo que me has aportado. A las chicas del biobanco Anabel, Isa, Virginia y Ana gracias por vuestra paciencia y por compartir conmigo vuestra simpatía. A Svetlana por su enorme trabajo y cooperación. Alonso, Pilar, Toñi, Laura, Antonio, Paola, Esther, Cristina gracias por todo, por los buenos momentos que hemos pasado.

Por supuesto, mencionar que esta investigación ha sido posible gracias al instituto de Salud Carlos III (PI11/01386, PI16/00752), a la Unión Europea (FEDER, Fondo Europeo de Desarrollo Regional), a la fundación Neumosur (PI 16/2014), a la Junta de Andalucía (Grupos CTS-143, CTS-695, CTS-3952, CVI-4740) a la fundación FIBAO, y a la empresa Beckton Dickinson y Beckman Coulter por su ayuda para el fomento de la Investigación en nuestro Servicio.

A los pacientes de este estudio que generosamente han donado sus muestras a través del BIOBANCO del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada y del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña, ya que sin ellos no hubiera sido posible esta investigación.

Por supuesto, agradecer a mi familia todo su apoyo incondicional. Mis padres y hermanos, esos con los que río, lloro, conocen mi sufrimiento, mis defectos y mis virtudes. Esa familia que siempre ha estado cuando lo he necesitado, la que está en los buenos y los malos momentos, y la que hace que afrontar la vida no sea tan duro. Y sobre todo, a mis padres por la educación recibida y los valores que me habéis inculcado y por enseñarme que la vida no te regala nada, que si quieres conseguir algo tienes que hacerlo con ganas, trabajo y esfuerzo. Que no hay que tener miedo, que si uno se estanca que tire para adelante, que ya saldrá por algún lado, porque siempre hay una salida.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|-----------|
| I. ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO | 11 |
| II. RESUMEN | 13 |
| III. INTRODUCCIÓN | 17 |
| 1. Papel del sistema inmunitario en el cáncer | 19 |
| 2. Antígenos tumorales | 20 |
| 3. Control tumoral por el microambiente | 22 |
| 4. Inflamación y cáncer | 23 |
| 4.1 Mediadores inflamatorios promueven la proliferación y supervivencia celular | 23 |
| 4.2 La inflamación provoca angiogénesis | 24 |
| 5. Presentación antigénica | 25 |
| 6. Escape tumoral del control del sistema inmunitario | 28 |
| 6.1 Selección natural de variantes tumorales..... | 28 |
| 6.2 Mecanismos intrínsecos que afectan a la inmunogenicidad del tumor..... | 30 |
| 6.2.1 Pérdida de expresión de antígenos HLA y/o proteínas de la maquinaria de presentación del antígeno (APM) | 31 |
| 6.2.2 Otros mecanismos intrínsecos de escape tumoral | 34 |
| 6.3 Mecanismos extrínsecos que contribuyen al escape inmunológico: microambiente tumoral y células inmunitarias del microambiente..... | 37 |
| 6.3.1 Efectos supresores de los factores derivados del tumor (FDTs): microambiente tumoral..... | 38 |
| 6.3.2 Actividad supresora de las células inmunitarias del microambiente tumoral..... | 41 |
| 6.4 Mecanismos de evasión de las células NK..... | 46 |
| 7. Composición celular del microambiente tumoral y resultados clínicos | 49 |
| 7.1 Células T..... | 50 |
| 7.2 Células B..... | 51 |
| 7.3 Células NK | 52 |
| 7.4 Macrófagos asociados a tumor | 53 |
| IV. HIPOTÉISIS Y OBJETIVOS | 57 |
| V. METODOLOGÍA | 61 |
| 1. Pacientes y muestras | 63 |

| | |
|---|------------|
| 2. Estudio de citometría de flujo..... | 64 |
| 2.1 Procesamiento de las muestras..... | 64 |
| 2.2 Anticuerpos monoclonales..... | 65 |
| 2.3 Selección de las diferentes subpoblaciones celulares..... | 65 |
| 3. Estudio de inmunohistoquímica..... | 68 |
| 3.1 Estudio de la infiltración tumoral..... | 70 |
| 4. Aislamiento de ADN y microdissección..... | 71 |
| 5. Estudio molecular de las muestras tumorales..... | 71 |
| 5.1 Secuenciación del gen <i>β2-microglobulina</i> | 71 |
| 5.2 Tipaje genómico tumoral de HLA de clase I..... | 72 |
| 5.3 Estudio de expresión génica por RT-PCR..... | 72 |
| 6. Estudio de líneas celulares de cáncer de pulmón..... | 73 |
| 6.1 Análisis de hibridación genómica comparativa basada en array (array-CGH) en líneas celulares de cáncer de pulmón..... | 74 |
| 7. Análisis estadístico..... | 74 |
| VI. RESULTADOS (Artículos y Revisión)..... | 75 |
| 1. Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, Gómez-Morales M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. <i>Int. J. Cancer</i> 2017, 140, 888–899. | |
| 2. Perea F, Sánchez-Palencia A, Gómez-Morales M, Bernal M, Concha A, Méndez-García M, González-Ramírez A, Kerick M, Martin J, Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape. <i>Oncotarget</i> 2017. | |
| 3. Garrido F, Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Aptsiauri N, Ruiz-Cabello F. The escape of cancer from T-cell mediated immune surveillance: HLA class I loss and tumor tissue architecture. <i>Vaccines</i> 2017, 5, 1-10. | |
| VII. DISCUSIÓN..... | 141 |
| VIII. CONCLUSIONES..... | 163 |
| IX. BIBLIOGRAFÍA..... | 167 |
| X. ANEXOS..... | 191 |

I. RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

| | |
|------------|--|
| AICD..... | Muerte Celular Inducida por Activación |
| ADN..... | Ácido Desoxirribonucleico |
| APCs..... | Células Presentadoras de Antígenos |
| ARN..... | Ácido Ribonucleico |
| β2m..... | β2 microglobulina |
| COX..... | Ciclooxigenasa |
| CSF1R.... | Receptor del Factor Estimulante de Colonias 1 |
| CTCs.... | Células Tumorales Circulantes |
| CTLs..... | Linfocitos T citotóxicos |
| CTLA..... | Antígeno de Linfocitos T Citotóxicos |
| DC..... | Células Dendríticas |
| EGF..... | Factor de Crecimiento Epidermal |
| FADD.... | Dominio de Muerte Asociado a Fas |
| FGR.... | Factor de Crecimiento de Fibroblastos |
| HLA..... | Antígenos Leucocitarios Humanos |
| IDO.... | Indolamina 2,3-dioxigenasa |
| IL.... | Interleuquina |
| iNOS.... | Óxido Nítrico Sintasa inducible |
| MHC..... | Complejo Principal de Histocompatibilidad |
| MDSCs.... | Células Supresoras Derivadas Mieloides |
| NK..... | células Natural Killer |
| NFκB.... | factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas |
| NSCLC..... | Carcinoma de Pulmón no microcítico |
| PD..... | receptor de Muerte Programada |
| PDGF.... | Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas |
| ROS..... | Especies Reactivas del Oxígeno |
| SCLC..... | Carcinoma de Pulmón de Células Pequeñas |
| STAT.... | Factor de Transcripción Transductor de Señales y Activador de Transcripción |
| TAP..... | Transportador Asociado al Procesamiento del Antígeno |
| TCR..... | Receptor de las Células T |
| TGF..... | Factor de Crecimiento Transformante |
| Th..... | Linfocito T CD4 Helper |
| TME..... | Microambiente Tumoral |
| TNF.... | Factor de Necrosis Tumoral |
| TRAIL..... | Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF |
| Treg..... | Linfocitos T Reguladores |
| VCAM.... | Molécula de Adhesión Vasculare |
| VEGF.... | Factor de Crecimiento Endotelio Vasculare |

II. RESUMEN

El cáncer de pulmón es uno de los tumores más malignos que se han diagnosticado y es una de las principales causas de muerte a escala mundial en ambos géneros. Su tratamiento es difícil ya que cuando se detecta, en muchos casos se encuentra en fases avanzadas. La carcinogénesis, es un proceso complejo que incluye constantes cambios celulares a nivel genético y molecular que dan lugar a un el crecimiento celular incontrolado. Sin embargo, el desarrollo tumoral no se puede entender si no se tiene en cuenta el contexto celular estromal en el que se produce. Numerosas evidencias sostienen que células del estroma influyen notablemente el crecimiento tumoral. Muchas de las células que componen el estroma son células de la inmunidad tanto innata como adaptativa y constituyen lo que hoy se denomina inmuno-contexto que es probablemente el factor más importante a nivel pronóstico. Los leucocitos y especialmente los linfocitos T pueden infiltrar el tejido tumoral y se ha observado que este infiltrado es heterogéneo y se distribuye de forma organizada entre los distintos tipos de tumor e incluso es distinto entre pacientes. El análisis del tipo, densidad y localización de leucocitos (“Immunoscore”) ha cobrado una importancia vital en la prognosis de la enfermedad. Es conocido que estos linfocitos T citotóxicos pueden llevar a cabo un control del crecimiento tumoral. Sin embargo, la evolución natural del cáncer sucede en varias fases en las que sucesivamente se van seleccionando clonas con baja inmunogenicidad.

En nuestro estudio una gran parte de los tumores de pulmón analizados presentan alteraciones totales o parciales en la expresión de moléculas HLA de clase I. Nuestros resultados muestran los mecanismos por los que se producen esas alteraciones de expresión de moléculas HLA-I en cáncer de pulmón: la pérdida de heterozigosidad (LOH) en genes HLA-I en el cromosoma 6 y una disminución de la expresión de genes implicados en la maquinaria de procesamiento antigénico. Hemos observado que en contraste a lo que se observa en otros tumores como los de colon o el melanoma el gen de $\beta 2m$ no es una diana mutacional en el cáncer de pulmón. Por el contrario la LOH en 6p21 es frecuente y probablemente ha sido subestimada hasta el momento. A ello ha contribuido que ni la inmunohistoquímica, ni la secuenciación masiva, son herramientas adecuadas para poner de manifiesto este tipo de alteraciones al tratarse de un sistema multialélico y que las mutaciones representan la pérdida de gran parte del genoma. Estos mecanismos de pérdida de HLA tiene evidentes implicaciones para la inmunoterapia antígeno-específica. En la actualidad la inmunoterapia con inhibidores frente a los “immunocheckpoints” es la primera línea de tratamiento en el cáncer de pulmón metastásico no microcítico. Sin embargo, esta terapia beneficia sólo a una fracción de pacientes con NSCLC. Es conocido, que esta terapia requiere la integridad de la expresión de moléculas HLA-I. La existencia de LOH en el cromosoma 6 y la ausencia de mutaciones en el gen $\beta 2m$

dificulta la realización de estrategias de rescate antigénico dado que se trata de mutaciones genéticas irreversibles y que no permiten la recuperación antigénica con inmunomoduladores biológicos como el interferón. Por tanto, creemos que tumores HLA-I positivos podrían ser más susceptibles a tratamiento con inhibidores de “inmun checkpoints” porque el mecanismo del reconocimiento antigénico permanece inalterado y el patrón de reactividad estromal e infiltración tumoral es “permisivo”. Por el contrario, los tumores HLA-I negativos (especialmente aquellos que portan mutaciones truncadoras irreversibles por pérdida de genes HLA) pueden explicar la resistencia adquirida a la inmunoterapia con anti PD-1. Otro hallazgo importante de este estudio ha sido la observación de que la expresión HLA-I condiciona la densidad y el patrón de infiltración linfocitario de los tumores de pulmón. Observamos una asociación entre la expresión de HLA-I clase I y el nivel de infiltración por linfocitos CD8⁺. Además, nuestros resultados muestran una correlación directa entre la expresión tumoral de HLA-I, y los patrones de infiltración tumoral de linfocitos/macrófagos, y la reacción estromal. Cuando el tumor es HLA-I positivo, los linfocitos CD45RO⁺ (memoria), CD3⁺ y CD8⁺, así como macrófagos CD64⁺ (M1) están en estrecho contacto con las células malignas dentro de los nidos del tumor en una estructura que hemos denominada como “permisiva” para el rechazo inmunológico. Mientras, en tumores HLA-I negativos los leucocitos preferentemente se localizan fuera nido tumoral, en el estroma y sin un estrecho contacto con las células tumorales, en una estructura que hemos denominado “no permisiva” caracterizada por una densa malla de fibroblastos FAP+. La presencia de estos dos patrones de reacción estromal correlaciona con cambios en la polarización de los macrófagos M1/M2.

Hemos analizado otros componentes del estroma tumoral mediante un análisis conjunto de citometría de flujo e inmunohistoquímica. Nuestra investigación sostiene que en el microambiente de los tumores NSCLC, se conforma un microambiente tumoral inmunosupresor con una proporción alta de células Treg, así como alteraciones fenotípicas en otras células efectoras como son las células NK. Describimos también una disminución de expresión de marcadores de activación como NKp46 y CD161, podrían disminuir la actividad de las células NK. Estos mecanismos de supresión se reflejan tanto en la sangre de los pacientes como en las inmediaciones del tumor y no están relacionadas con la expresión de HLA-I del tumor pero que pueden colaborar también al escape inmunológico.

Hemos analizado también la expresión de PD-L1 en el tejido tumoral. Creemos que del análisis de la expresión de HLA-I y PDL-1 presenta notables ventajas a la propuesta actual como marcadores de respuesta a la inmunoterapia por varias razones. En primer lugar, la expresión HLA-I está frecuentemente alterada en tumores de diferentes tipos histológicos. Además, la emergencia de variantes tumorales HLA-I negativas ocurre durante la historia

natural del cáncer o tras inmunoterapia como resultado de la inmunoselección. Finalmente, el análisis de HLA-I impacta sobre los patrones de infiltración y conjuntamente con PD-L1 permite la identificación fácil de fenotipos de rechazo y progresión. Encontramos una asociación entre la expresión de HLA y PD-L1 con la afectación ganglionar (N): una alta proporción de pacientes con tumores de fenotipo HLA⁻ PD-L1⁺ presentaron afectación de uno o varios ganglios linfáticos (fases N1+N2) mientras que una minoría de los pacientes con tumores de fenotipo HLA⁺ PD-L1⁻ (fenotipo de rechazo tumoral) se encontraban en esas fases N avanzadas. Desde nuestro punto de vista, el fenotipo HLA⁻ PD-L1⁺ es el más agresivo (fenotipo de progresión) y está caracterizado por presentar mayor tamaño tumoral, mayor afectación linfática, estadio tumoral más avanzado, y menor infiltración por linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos en tumores con este fenotipo presentaron además localización preferentemente estromal.

En resumen, nuestro estudio muestra cambios en el microambiente tumoral que afectan a la inmunogenicidad de la célula tumoral y al infiltrado leucocitario que favorecerían el escape inmunológico y la progresión del cáncer. Hemos observado que las alteraciones HLA resultan determinantes en la configuración del microambiente tumoral: tipo y patrón de infiltración observado. Hemos demostrado, que el mecanismo de LOH-HLA es el más importante para generar tumores con baja inmunogenicidad. Creemos también imprescindible evaluar la existencia de LOH-HLA en pacientes candidatos a inmunoterapia específica, al ser la expresión HLA el factor crítico determinante para la eficacia terapéutica. Finalmente la combinación del estudio de HLA y PD-L1, presenta notables ventajas a la propuesta actual que contempla la expresión de PD-L1 e *immunoscore*, ya que permitiría identificar fenotipos particularmente agresivos y potencialmente no respondedores a inmunoterapia antígeno-específica.

III. INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer de pulmón es uno de los tumores malignos más comúnmente diagnosticados y se ha convertido en una de las principales causas de muerte en los países desarrollados en ambos géneros (1). La carcinogénesis es un proceso complejo y dinámico que incluye varios cambios celulares a nivel genético que desemboca en crecimiento celular descontrolado. Los análisis histopatológicos en diferentes tumores han demostrado la infiltración de células inflamatorias y linfocíticas. Los estudios intratumorales detallados determinan que esos infiltrados se distribuyen de forma organizada y localizada en el centro del tumor, en los bordes peritumorales y en órganos linfoides terciarios. Los infiltrados inmunológicos son heterogéneos y diferentes entre los distintos tipos de tumores e incluso entre pacientes. Se han descrito distintos tipos de células inmunológicas en el tumor incluyendo: macrófagos, células dendríticas (DCs), mastocitos, células natural killer (NK), células nativas, células de memoria, linfocitos B y linfocitos T, que incluyen varios subtipos de células: Th1, Th2, Th17, células T reguladoras, (Treg), linfocitos T citotóxicos (CTLs). Analizar la localización, densidad y funcionalidad de los diferentes biomarcadores inmunológicos ha permitido identificar componentes que son beneficiosos y otros que se relacionan de forma negativa con la supervivencia (2). Ante estos resultados, una evaluación celular inmunológica podría dar información sobre el pronóstico de la enfermedad y ayudar a identificar pacientes susceptibles a un tratamiento (3).

Los carcinomas de pulmón se pueden clasificar en dos tipos: carcinoma de pulmón microcítico (SCLC, Small Cell Lung Carcinoma) y carcinoma de pulmón no microcítico (NSCLC, Non-SCLC). NSCLC son aproximadamente el 80% de todos los casos de cáncer de pulmón e incluye tres tipos histológicos: carcinoma celular epidermoide, adenocarcinoma y carcinoma de células grandes (4).

El éxito limitado de la quimioterapia ha enfatizado la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas como la inmunoterapia. Sin embargo, la naturaleza multifacética de los mecanismos de escape inmunitario de las células tumorales de pulmón es un principal obstáculo para la aplicación potencial de inmunoterapia. Es necesario aclarar y caracterizar esos mecanismos de escape inmunitario para desarrollar estrategias que los contrarreste.

1. Papel del sistema inmunitario en el cáncer.

Un aspecto fundamental de la inmunología del cáncer es que el sistema inmunitario es capaz de reconocer células del huésped que sufren transformaciones malignas y controlar el crecimiento tumoral. En la evolución del proceso tumoral en la interacción con el sistema

inmunitario se han propuesto 3 fases de desarrollo (la teoría de las tres E): Eliminación, Equilibrio y Escape. Este proceso es lo que se conoce como “Inmunoeediting” (5). La idea es que el sistema inmunitario reconoce células malignas y las elimina. En ocasiones, algunas células tumorales proliferan lo suficientemente rápido para compensar la eliminación mediada por el sistema inmunitario y se produce la fase de equilibrio. En la tercera fase, por determinadas características que adquieren las células tumorales, el sistema inmunitario no es capaz de reconocerlas y eliminarlas, y escapan creciendo de forma descontrolada (edición del tumor). Hoy en día se plantea el reto de lograr eliminar esas células que escapan del control inmunitario para lo que se han propuesto numerosas estrategias de inmunoterapia con diferentes resultados que se detallarán más adelante.

2. Antígenos tumorales.

El sistema inmunitario adaptativo es capaz de discriminar entre antígenos propios de extraños. La distinción es clara en el caso de patógenos invasivos, pero las células tumorales son células del huésped transformadas y podrían, por lo tanto, pensarse que pertenecen a lo propio. La transformación maligna de células normales implica mutaciones (6) en rutas que controlan la proliferación, resistencia apoptosis y otras características fundamentales de los cánceres (7). Estas mutaciones podrían codificar epítomos que no se expresan en células normales del huésped y podrían considerarse, por lo tanto, como extraños, haciendo a las células malignas susceptibles de eliminación por el sistema inmunitario (Figura 1). Las mutaciones hacen que se codifiquen péptidos mutados capaces de provocar una respuesta inmunitaria adaptativa. Se conocen como neoantígenos. Se han encontrado clones de células T CD8⁺ específicos de antígenos tumorales contra quinasa dependiente de ciclinas 4 (CDK4) (8) o β -catenina mutada (9) en melanoma y la molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) HLA-A2 expresada en carcinoma renal (10).

Interesantemente, proteínas no mutadas del huésped se encontraron ser objetivo del sistema inmunitario adaptativo. En particular, proteínas que son expresadas en células MHC-I negativas como espermatozoides o trofoblasto, y aberrantemente expresadas en células cancerígenas, son capaces de producir una respuesta inmunitaria. El primer ejemplo en humanos fue un epítomo de MAGEA1 (11), una proteína restringida a los testículos que aberrantemente se expresa en melanoma. Más tarde, se encontraron antígenos de proteínas codificados por la familia de antígenos MAGE y otros genes específicos de la línea germinal como Bage1, Gage1, Xage1B, Ctga2, Ctga1 y Ssx2, en melanoma y otros carcinomas como pulmón, colorectal, mama y próstata (12)

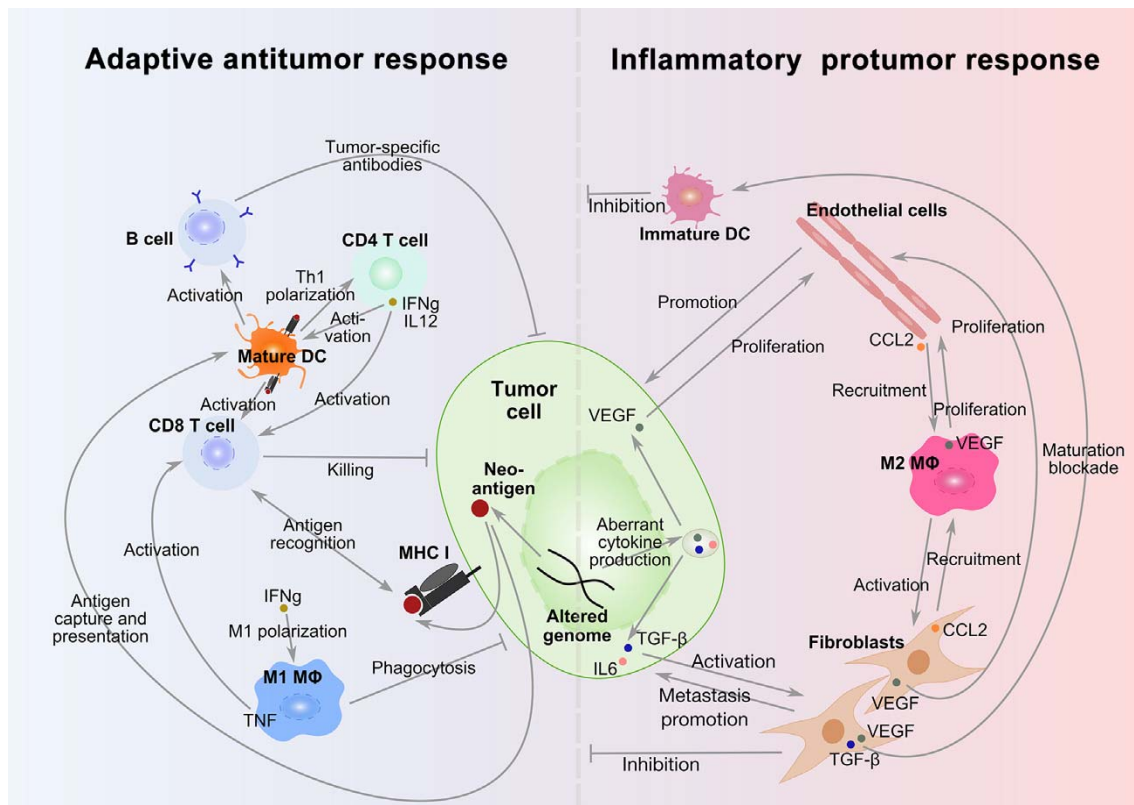


Figura 1. Los dos ejes inmunitarios con sus efectos opuestos en el desarrollo tumoral. Los genomas alterados de tumores pueden codificar neoantígenos que promueven respuestas adaptativas con objetivos tumorales. Estas son caracterizadas por una alta densidad de células T CD8⁺, células B, células dendríticas (DCs) maduras así como una polarización Th1 en el microambiente tumoral. Por otro lado, alteraciones genómicas provocan una producción aberrante de citoquinas en células tumorales, que pueden aumentar la angiogénesis, activar fibroblastos y células mieloides, resultando en la producción de factores de crecimiento y supervivencia que inhiben la actividad inmunitaria adaptativa frente al tumor. *Imagen adaptada de Becht et al. Advances in Immunology 2016, 130: 95-148.*

Aún más sorprendente, algunas proteínas constitutivamente expresadas por células no malignas fueron capaces de producir respuestas inmunitarias también. Esas proteínas son sobreexpresadas en células tumorales provocando activación mediada por el receptor de las células T (TCR) de los correspondientes linfocitos específicos (12), mientras que su expresión es tan baja en células normales para llegar al límite para provocar activación de células T. Un ejemplo de estos antígenos es el antígeno HER2/neu codificado por el gen *Erb2* en cánceres de próstata (13, 14) de mama y ovario, así como la proteína Melan-A en melanoma (15-17).

Una clase sencilla de antígenos asociados a tumor son los péptidos asociados con virus carcinogénicos. Esos péptidos se expresan en células transformadas y pueden provocar una respuesta inmunitaria, como se mostró con el virus de papiloma humano en carcinoma epidermoide de cuello y cabeza (18), virus de Eipstein-Barr en linfoma de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, linfoma NKT y linfoma de Burkitt (19). Todos estos ejemplos juntos muestran

que aunque las células tumorales son derivadas de células normales pueden expresar antígenos que pueden ser reconocidos como extraños.

Está bien documentado que la expresión de antígenos tumorales es muy heterogénea, incluso dentro de un mismo tumor. Por ejemplo, se ha observado que una expresión disminuida de antígenos de diferenciación de melanocitos de melanoma como gp100, antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MART1) y tirosinasa está asociada con progresión de la enfermedad. En un estudio, las células fueron 100% MART1⁺ en lesiones en estadio I y sólo el 75% en estadio IV. Un aumento de expresión ha sido encontrado también en tumores tras vacunación. En otro estudio se observó que con vacuna del péptido gp100 (209-2M) se produjo una disminución en la expresión de gp100 en tumores después de tratamiento (47% frente 32%), mientras que la expresión de MART1 no cambió en otro estudio (54% frente 54%). Además, la cantidad de antígeno tumoral expresado puede ser también importante para el reconocimiento (17).

El mecanismo exacto que controla la disminución de expresión de antígenos tumorales permanece desconocido en la mayoría de casos. Sin embargo, la propagación de esas variantes con pérdidas de antígenos podría ser facilitada por inmunodominancia de epítipo. El fenómeno de inmunodominancia podría pensarse que es como la inmunodetección preferente de uno de los pocos epítopos entre los muchos que se expresan en un objetivo dado. La teoría de la inmunodominancia, ya que está relacionada con el escape tumoral, predice que una de las maneras de que las variantes con pérdidas de antígeno dentro de un tumor son protegidas de la presión inmune es que las células tumorales parentales que llevan el epítipo inmunodominante sirve como “bandera roja” para el ataque inmunitario, de este modo desvían la atención de la variante tumoral. Una vez las células parentales se han eliminado, se establece una nueva jerarquía entre las variantes y epítopos anteriormente inmunorecesivos llegan a ser dominantes. Una variante tumoral que ha perdido la restricción a alelos de HLA de clase I (HLA-I) mientras retiene el antígeno inmunodominante podría hacer una presentación de este antígeno a CTLs CD8⁺ por células dendríticas y mantener una respuesta inmunodominante a un objetivo “fantasma”, ya que no puede ser reconocido por el linfocito, a expensas de respuestas más apropiadas y efectivas contra otros antígenos (20).

3. Control tumoral por el microambiente

El control tumoral resulta en modificaciones genéticas y epigenéticas de células transformadas que tienen lugar en el microambiente tumoral, el cual contiene células inmunitarias. Así, en varias situaciones en las que un estado precanceroso puede ser estudiado individualmente, un cambio desde un patrón inmunológico con una orientación Th1 hacia un

microambiente proinflamatorio correlaciona con invasión y agresividad. Esto se ha ilustrado en carcinoma cervical en el que una alta expresión de genes que codifican citoquinas Th1 en neoplasia *in situ* cervical donde la expresión de interferón γ (IFN- γ) se pierde y la expresión de la citoquina proinflamatoria interleuquina 6 (IL-6) es alta en carcinoma cervical invasivo y agresivo (21). Un cambio de citoquinas hacia un patrón Th2 se ha observado en la evolución de neoplasia de epitelios hacia carcinoma invasivo (22). Un cambio similar se ha descrito en cáncer pancreático donde se produjo un decremento de la densidad de células T CD8⁺ y DCs maduras desde lesiones con un grado bajo de premalignidad dentro de adenocarcinoma ductal invasivo (23).

4. Inflamación y cáncer.

Está bien establecido que la inflamación crónica en un tumor favorece el crecimiento de células neoplásicas. La inflamación está asociada con muchos eventos carcinogénicos. Una mutación activadora de la señal de transducción del receptor de IL-6 (IL-6 ST) provoca un programa proinflamatorio en hepatocitos favoreciendo la formación de adenoma que más adelante puede convertirse en hepatocarcinoma (24). Las condiciones exógenas pueden favorecer también señales inflamatorias. *Helicobacter pylori* es una bacteria asociada a cáncer gástrico (25), una infección viral con hepatitis B o C está asociada con el desarrollo de carcinoma hepatocelular (26) y la exposición al humo del tabaco provoca inflamación crónica de pulmón que favorece el desarrollo de un carcinoma (27). La asociación de parásitos como *Schistosoma haematobium* y *Opisthorchis viverrini/Clonorchis sinensis* con alta incidencia de cáncer de vejiga y colangiocarcinoma, respectivamente, revelan una carcinogénesis similar favorecida por inflamación (28, 29). Una inflamación preexistente puede promover carcinogénesis directamente a través de efectos mutacionales. En particular, las especies reactivas del oxígeno (ROS) se ha probado que directamente modifican la secuencia de ADN (30). Las reacciones inflamatorias pueden provocar también modificaciones epigenéticas en el ADN (31). Se ha propuesto que un 15% de los cánceres diagnosticados son producidos por infección (32). A continuación, se detallan algunos de los efectos que promueven el desarrollo tumoral asociados con inflamación a través de efectos directos sobre las células cancerígenas.

4.1 Mediadores inflamatorios promueven la proliferación y supervivencia celular.

Los factores inflamatorios como IL-6, IL-1 β o IL-22 inducen respuestas inflamatorias provocando una activación del factor de transcripción transductor de señales y activador de

transcripción 3 (STAT3) y factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFκB) en células cancerígenas. Estas rutas pueden provocar la activación de moléculas antiapoptóticas (33), como Bcl-2 (34), Bcl-x (35) que promueven supervivencia, por ejemplo, en células B malignas en linfoma folicular (36). Se ha observado que la ruta IL-6-STAT3 tiene actividades procancerígenas en muchos tipos de cáncer como adenocarcinoma ductal pancreático (37), carcinoma intraepitelial (38), adenocarcinomas de pulmón (39) y gástrico (40). La activación de NFκB promueve la supervivencia celular por inhibición de apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) (41). La inflamación también provoca proliferación de células malignas por un notable aumento de la expresión de ciclinas B, D1 y D2 relacionadas con la progresión del ciclo celular (35, 42).

4.2 Inflamación y angiogénesis

Cuando el tumor alcanza cierto tamaño el suministro de oxígeno es tan limitante para difundirlo a todas las áreas del tumor y las condiciones de hipoxia aumentan. La inflamación es uno de los mecanismos alterados por los tumores para mantener la angiogénesis y aumentar el suministro de sangre. Los mediadores inflamatorios liberados por células malignas, hematopoyéticas u otras células estromales pueden aumentar la angiogénesis local. La IL-1 β liberada por células cancerígenas simultáneamente provoca angiogénesis y el reclutamiento de células inflamatorias hacia los nidos tumorales, como se observó en ratones modelo en cáncer pancreático (43). Durante mucho tiempo se ha conocido que las células tumorales inducen angiogénesis. Sin embargo, la contribución de las células del estroma y, en particular, las células del sistema inmunitario innato a la angiogénesis se ha descubierto recientemente (44-46), notablemente a través de la liberación de factores de crecimiento endotelio vasculares (VEGFs), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGR2), TNF- α , factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFs), factor de crecimiento placentar, neuropilina-1 e IL-8 (47). Dentro de la inmunidad innata, los macrófagos son los más abundantes en el tumor y se ha observado que son los que controlan la angiogénesis en ratones modelo con cáncer de mama (48) a través de su capacidad de secretar VEGF-A (Figura 1). La inhibición del receptor de factor estimulante de colonia 1 (CSF1R), que es requerido por el macrófago para su diferenciación y supervivencia, se mostró que inhibía la vascularización en un modelo de glioma (49).

5. Presentación antigénica.

La presentación de péptidos en superficie es llevada a cabo por un conjunto de proteínas que forman lo que se conoce como complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Existen dos tipos de MHC. Para explicar esos dos tipos es necesario hablar del proceso de recambio de proteínas en la célula, es decir, como se degradan y se producen otras que remplazan a las primeras. La degradación de la mayoría de proteínas celulares ocurre por una de las dos principales rutas proteolíticas: la ruta lisosomal y la ruta del proteosoma por ubiquitinización. La ruta lisosomal degrada proteínas captadas por endocitosis (procedentes del medio extracelular) y por autofagia (procedentes del citosol). Por el contrario, la ruta del proteosoma está involucrada principalmente en la degradación de proteínas citosólicas como proteínas reguladoras (proteínas de vida corta que se eliminan poco después de completar su función), proteínas dañadas, incluyendo productos ribosomales defectuosos, así como proteínas mutadas en células cancerígenas y proteínas procedentes de virus en células infectadas. En ambas rutas, las proteínas se cortan en fragmentos de oligopéptidos que son presentados a las células T por moléculas de MHC. Mientras que los péptidos procedentes de proteínas degradadas por la ruta lisosomal son presentados principalmente por moléculas de MHC de clase II (MHC-II), los péptidos generados por la ruta del proteosoma son presentados por moléculas de MHC de clase I (MHC-I) (Figura 2). Una excepción importante a esta regla es la presentación cruzada, un proceso específico en células presentadoras de antígeno (APCs) en el que péptidos derivados de la ruta lisosomal pueden ser presentados por moléculas MHC- I (50).

En humanos, existen tres principales moléculas MHC-I que son llamadas también por el nombre del gen, Human Leukocyte Antigen (HLA): HLA-A, HLA-B, HLA-C. Están formadas por una cadena pesada y una cadena ligera llamada β -2-microglobulina (β -2m). La principal función de las moléculas MHC-I, que son expresadas sobre la superficie celular de la mayoría de tipos celulares, es presentar péptidos a los CTLs CD8⁺. Los péptidos derivados de proteínas de células normales (propios) son ignorados por las células T CD8⁺, mientras que aquellos que proceden de proteínas mutadas y de virus (no propias) y otros patógenos intracelulares no lo son y provocan una respuesta inmunitaria a través de su receptor TCR (50).

Para que las moléculas MHC-I presenten péptidos propios y no propios a las células T CD8⁺, los péptidos deben ser producidos primero por proteólisis en la ruta del proteosoma. Las proteínas objetivo de degradación son marcadas por unión covalente de múltiples copias de la proteína ubiquitina. El proteosoma es un complejo multimérico de proteínas que se encuentra tanto en el citosol como en el núcleo de la célula. Cuando las proteínas poliubiquitinadas llegan al proteosoma se produce un proceso complejo que prepara a los antígenos para presentarlos sobre las moléculas MHC-I. Este proceso consiste en cuatro principales etapas: 1) generación

del péptido; 2) transporte del péptido; 3) ensamblaje del complejo de carga MHC-I; 4) presentación antigénica (Figura 3).

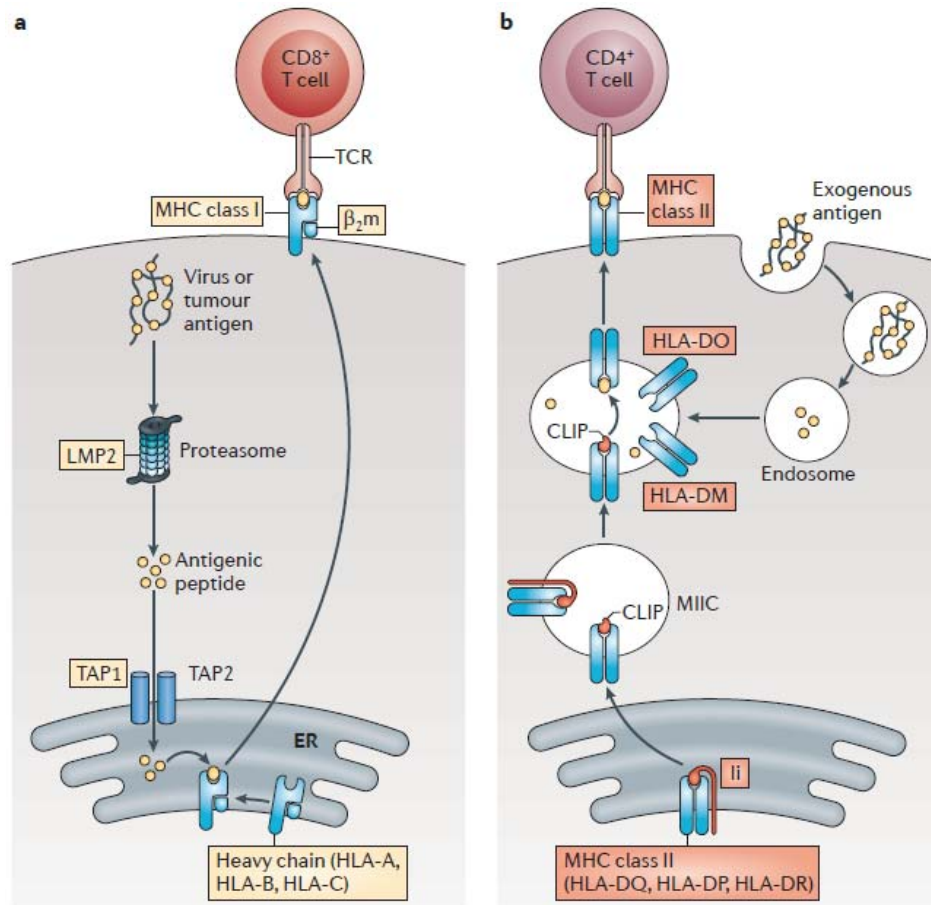


Figura 2. Rutas de presentación antigénica MHC-I y MHC-II. a) Los antígenos intracelulares, como los procedentes de virus o tumores, se procesan en péptidos por el inmunoproteosoma, que está compuesto de múltiples subunidades incluyendo LMP2. Los péptidos se transportan al retículo endoplasmático (ER) donde se cargan en la ranura del complejo MHC-I, que está compuesto de una cadena pesada y cadena β -2 microglobulina (β 2m). El complejo MHC-I presenta antígenos en la superficie a las células T CD8⁺. Las proteínas en la ruta de MHC-I que son codificadas por genes regulados por el transactivador NLRC5 se muestran en los cuadros amarillos. b) Los antígenos de fuentes extracelulares como bacterias, se procesan por enzimas endosomales en péptidos. Esos péptidos se unen a la ranura del complejo MHC-II por desplazamiento del péptido asociado a la cadena invariable de clase II (CLIP) que deriva de la cadena invariable asociada a clase II (li). HLA-DO y HLA-DM regulan el proceso de carga del antígeno. El complejo MHC-II presenta antígenos a las células T CD4⁺. La proteínas en la ruta MHC-II que son codificadas por los genes regulados por el transactivador CIITA se muestran en los cuadros rojos. *Imagen adaptada de Koichi et al. Nature Rev 2012, 12: 813-820.*

Cuando el proteosoma está activado, las proteínas ubiquitinadas pasan a través del hueco y pierden la cadena de poliubiquitina a través de la acción de enzimas desubiquitinizantes. Las proteínas se rompen en pequeños péptidos que se liberan al citosol. Los péptidos liberados al

citoplasmático son transportados al retículo endoplasmático por un transportador llamado transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP). TAP es un complejo heterodimérico compuesto por dos subunidades (TAP1 y TAP2) que son miembros de la familia de proteínas transportadoras unidas a ATP. TAP forma un poro transmembrana en el retículo endoplasmático que abre y cierra dependiendo de la unión e hidrólisis de ATP. Dentro del retículo endoplasmático los péptidos son degradados aún más por enzimas para encajar en la ranura de las moléculas MHC-I. A continuación se produce la carga del péptido en moléculas MHC-I con la ayuda de proteínas chaperonas: calreticulina, ERp57, calnexina y tapasina. Estas proteínas

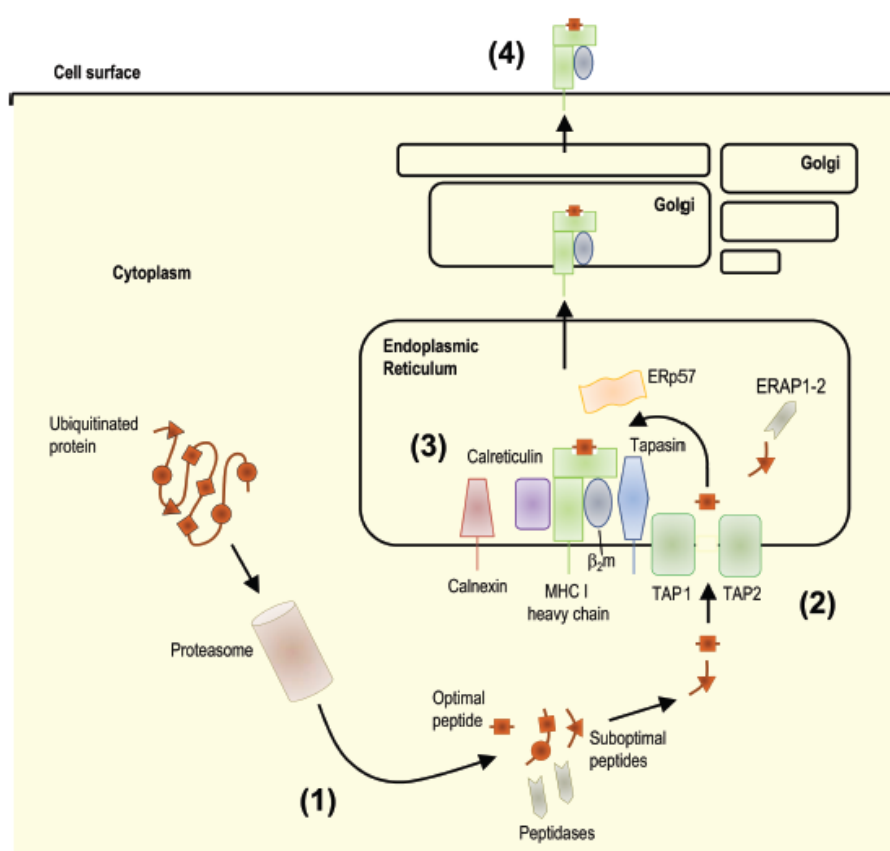


Figura 3. Principales etapas del procesamiento del antígeno (MHC de clase I). 1) Generación del péptido; 2) transporte del péptido; 3) ensamblaje del complejo de carga MHC de clase I; 4) presentación del antígeno. *Imagen adaptada de Leone et al. J Natl Cancer Inst 2013, 105: 1172–1187.*

junto con moléculas MHC-I y TAP forman el complejo de carga MHC-I que combina las actividades de transporte del péptido y carga en las moléculas MHC. Específicamente, una nueva cadena pesada MHC de clase I se transloca al retículo endoplasmático y adquiere un resto de glicano que sirve como elemento de reconocimiento para las chaperonas unidas a membrana calreticulina y calnexina. La cadena pesada de MHC-I interactúa con calnexina que facilita su

plegamiento correcto. En este punto, la cadena pesada es reconocida conformacionalmente por $\beta 2m$. Su unión provoca la liberación de calnexina. El cambio conformacional resultante da al heterodímero cadena pesada/ $\beta 2m$ una forma abierta que interactúa con calreticulina. La unión del péptido requiere la participación adicional de TAP, que asegura un “pool” de péptidos, y tapasina. Esta chaperona hace de puente entre las moléculas MHC-I y TAP, permitiendo a los péptidos tener acceso al retículo endoplasmático para unirse a la molécula MHC-I. Esto estabiliza el heterodímero y optimiza la carga del péptido. Tras la unión del péptido, las chaperonas residentes del retículo endoplasmático se liberan y el complejo péptido-MHC-I sale del retículo a través de vesículas que atraviesan el aparato de Golgi y migran hacia la membrana celular con la que se fusiona, con lo que el péptido en la molécula MHC-I queda expuesto extracelularmente. Una vez en la membrana, el complejo péptido-MHC-I puede ser reconocido e interactuar con las células T CD8⁺ a través de su TCR (50).

6. Escape tumoral del control del sistema inmunitario

El sistema inmunitario a través de la interacción con las células neoplásicas y como consecuencia de la intensa inmuno-vigilancia, esculpe el fenotipo del cáncer (“Immunoediting”) y favorece la selección de variantes tumorales menos inmunogénicas, que finalmente conducen al sobrecrecimiento del tumor. El escape tumoral puede ocurrir por esta inmuno-selección de variantes tumorales con alteraciones que les permiten resistir, evitar o suprimir la respuesta inmunitaria antitumoral, pero también por la inducción de una plétora de mecanismos inmunosupresores que comprenden la secreción de citoquinas específicas y la presencia de células inmuno-reguladoras en el microambiente tumoral (Figura 4).

Las células tumorales pueden ser reconocidas a través de los CTLs por receptores presentes en superficie en ambas células. Muchos tumores escapan de ese reconocimiento por el sistema inmunitario. La presentación antigénica es un proceso primordial en esta inmunovigilancia.

6.1 Selección natural de variantes tumorales

El establecimiento de una inmunoterapia parcialmente exitosa es uno de los escenarios que se puede esperar que resulte en escape tumoral. Uno de los factores más importantes que favorecen la supervivencia y propagación de organismos en evolución es la diversidad genética. Es interesante, en vista a la supervivencia del cáncer desde un punto de vista darwiniano, en el que la supervivencia de las células cancerígenas individuales está basada en variaciones

hereditarias y supervivencia diferencial asociada con ciertos genotipos. La selección natural es un proceso pasivo por el que un organismo tiene una ventaja de supervivencia simplemente por poseer ciertos genes beneficiosos. La inestabilidad genética, una propiedad inherente compartida por todos los tumores, provoca un aumento en la diversidad genética, como se manifiesta por el gran grado de heterogeneidad visto en los tumores.

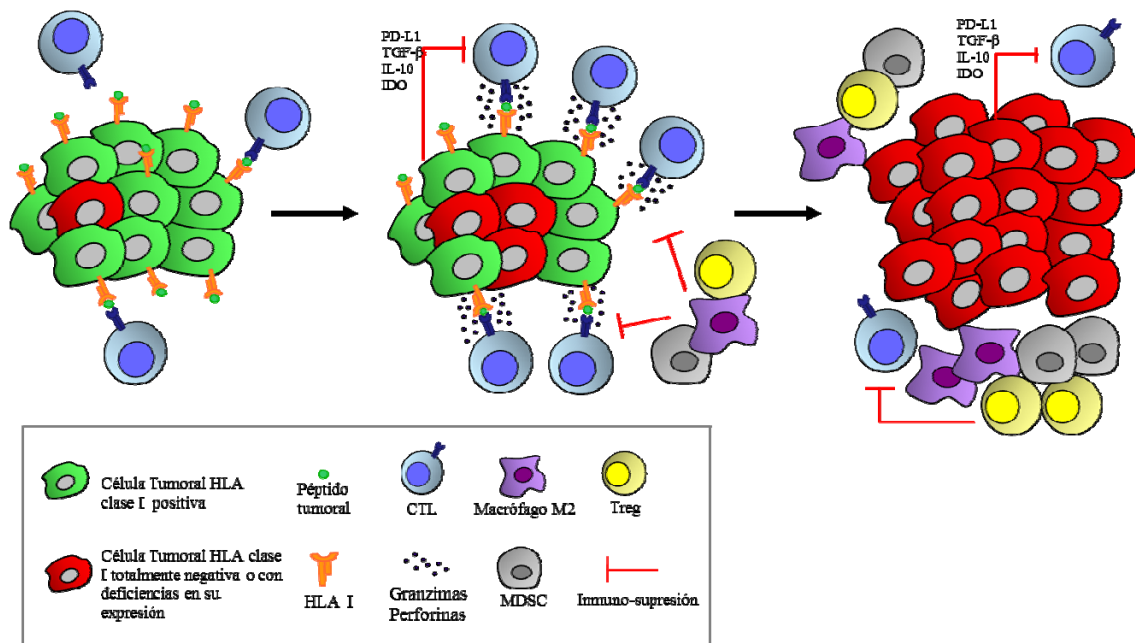


Figura 4. Mecanismos de escape tumoral del sistema inmunitario en la evolución del proceso tumoral. Las células tumorales van acumulando mutaciones y se ven afectados genes de β -2 microglobulina y HLA clase I que hace que determinadas células tumorales pierdan la expresión de moléculas HLA-I (inmunoselección). Las células tumorales son incapaces de ser eliminadas por los linfocitos T CD8⁺, escapan y proliferan (células de color rojo). Además el tumor genera un microambiente inmunosupresivo con factores como IL-10, TGF- β , indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) o favorece la infiltración de células inmunosupresoras como linfocitos T reguladores (Treg), células mieloides supresoras (MDSCs) y macrófagos tipo M2 que favorecen la progresión tumoral. *Imagen adaptada de Bernal et al. Inmunoterapia del cáncer. Realidades y perspectivas. Sociedad Española de Inmunología. Cap 2, 2015, 9-19 Editorial Elsevier ISBN: 978-84-9022-887-6.*

La selección natural está en función cuando las células cancerosas que poseen rasgos genéticos y epigenéticos, que son beneficiosos para su supervivencia y/o proliferación, tienen un crecimiento ventajoso sobre otras células. El resultado de este proceso pasivo es determinado por múltiples factores en el microambiente tumoral, como factores de crecimiento, suministro de nutrientes y presión inmunitaria. La inestabilidad genómica simplemente crea un amplio repertorio de células tumorales que serán seleccionadas acorde a los factores ambientales. Por lo tanto, los términos como “evasión tumoral” o “escape tumoral” son nombres equivocados

porque evasión y escape implica adquisición activa de ciertas características o fenotipos más que propagación diferencial de clones tumorales (Figura 5a). El mismo concepto también se aplica al crecimiento frente a una inmunoterapia efectiva (20) (Figura 5b).

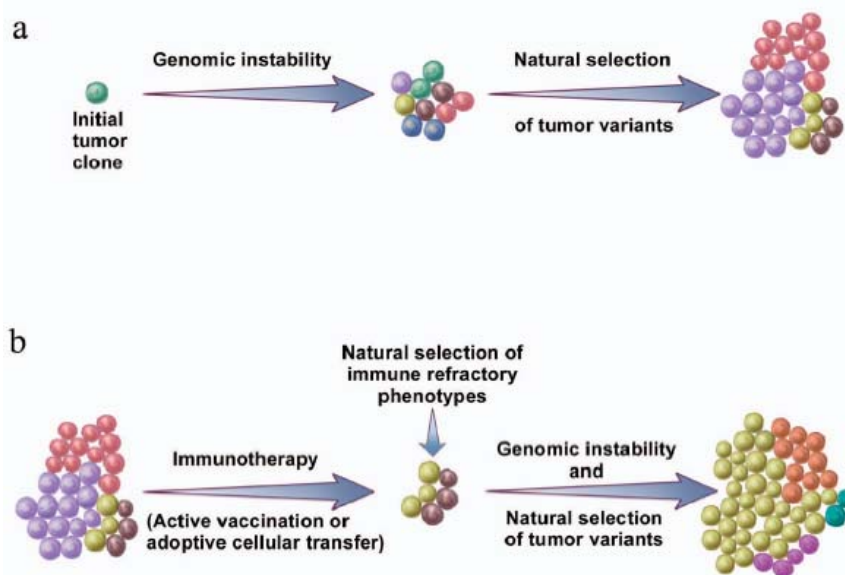


Figura 5. Selección natural de variantes tumorales en la generación de fenotipos de escape tumoral.
a) La inestabilidad genética provoca un aumento de diversidad genética en los tumores. La selección natural de variantes tumorales ocurre por una propagación diferencial de subclones en su microambiente.
b) El mismo concepto también se aplica al crecimiento tumoral después de una inmunoterapia efectiva.
Imagen adaptada de Khong et al. Nat Immunol 2002, 3: 999–1005.

6.2 Mecanismos intrínsecos que afectan a la inmunogenicidad del tumor

Uno de los mecanismos propios de las células tumorales (intrínsecos) para evadir el sistema inmunitario es la pérdida de antígenos HLA de clase I, que son vitales en el reconocimiento tumoral. Los tumores lo consiguen por diferentes vías, bien por pérdidas totales o selectivas, o desregulando los componentes de la maquinaria de procesamiento del antígeno. También forman parte de esos mecanismos intrínsecos producidos por el tumor para el escape inmunitario los receptores de control inmunitario responsables de apoptosis de linfocitos efectores antitumorales como PD-L1, FasL y galectinas. Determinadas moléculas de adhesión, expresadas por los tumores, también pueden afectar a la inmunogenicidad y favorecer el escape tumoral dificultando el tráfico de los linfocitos T hacia el tumor. Otro mecanismo de escape tumoral tiene que ver con CD47, una molécula que juega un papel importante en los tumores, inhibiendo la fagocitosis de las células malignas en circulación favoreciendo el proceso de metastatización y, por tanto, contribuyendo al escape tumoral. Los tumores también pueden

disminuir la expresión de co-estimuladores afectando así a la respuesta inmunitaria y permitiendo el escape inmunológico.

6.2.1 Pérdida de expresión de moléculas HLA-I y/o de moléculas de la maquinaria de procesamiento del antígeno (APM)

Pérdidas de expresión de moléculas HLA-I

Las moléculas HLA de clase I juegan un papel crucial en la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunitario. Unen péptidos antigénicos derivados de proteínas endógenas tumorales y los presenta a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs), para ser reconocidos por sus receptores de membrana (TCRs) (51). El reconocimiento de estos péptidos por los CTLs desencadena una serie de eventos que pueden terminar en la lisis de la célula tumoral. También están implicadas en la interacción de las células malignas con las células NK. En concreto, estos linfocitos lisan células tumorales que no expresan uno o más alelos HLA I (52). El ensamblaje correcto del complejo cadena pesada-B₂m-péptido y su transporte hasta la superficie celular, sigue un proceso dependiente de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM), como se ha mencionado anteriormente. Cualquier defecto en el proceso de ensamblaje conducirá a una expresión anómala de antígenos de clase I.

Desde hace tiempo se conoce que la transformación maligna de las células se asocia a una alteración en la expresión y/o función de las moléculas HLA de clase I, y que estas anomalías proporcionan vías de escape del reconocimiento por parte del sistema inmunológico. El estudio de la expresión HLA I se ha realizado en una gran cantidad y variedad de tumores eliminados quirúrgicamente mediante técnicas de inmunohistoquímica y empleando anticuerpos monoclonales específicos frente a determinantes HLA I. Estos análisis han permitido identificar en las lesiones malignas varios fenotipos de la expresión alterada de HLA clase I (53-55). Estos fenotipos incluyen: (I) Pérdida total de la expresión HLA clase I; (II) Pérdida selectiva de un haplotipo HLA; (III) Baja regulación selectiva de los productos génicos de los locus *HLA-A*, *B* o *C*; (IV) Pérdida selectiva de un alelo HLA de clase I; (V) Fenotipos complejos que representan una combinación de los fenotipos I-IV; o (VI) Incapacidad de incrementar la expresión de HLA de clase I debido a un bloqueo en la vía de señalización del IFN. Los tumores más estudiados a lo largo de los años han sido carcinomas de mama, pulmón, colon, riñón, cérvix, próstata y melanomas cutáneos. Las frecuencias de pérdida total o baja regulación de antígenos HLA de clase I en lesiones primarias, van desde un 16% en melanomas a un 50% en el cáncer de próstata. En el cáncer de colon, los datos de pérdida total son de un 27%. Las pérdidas de locus o alélicas tienen frecuencias desde un 16% en cáncer de colon, hasta un 35% en melanomas,

mientras que en cáncer de pulmón son sólo del 4% (53, 56, 57). A continuación vamos a desarrollar cada uno de los fenotipos de escape tumoral relacionados con la alteración de la expresión de HLA-I (Figura 6).

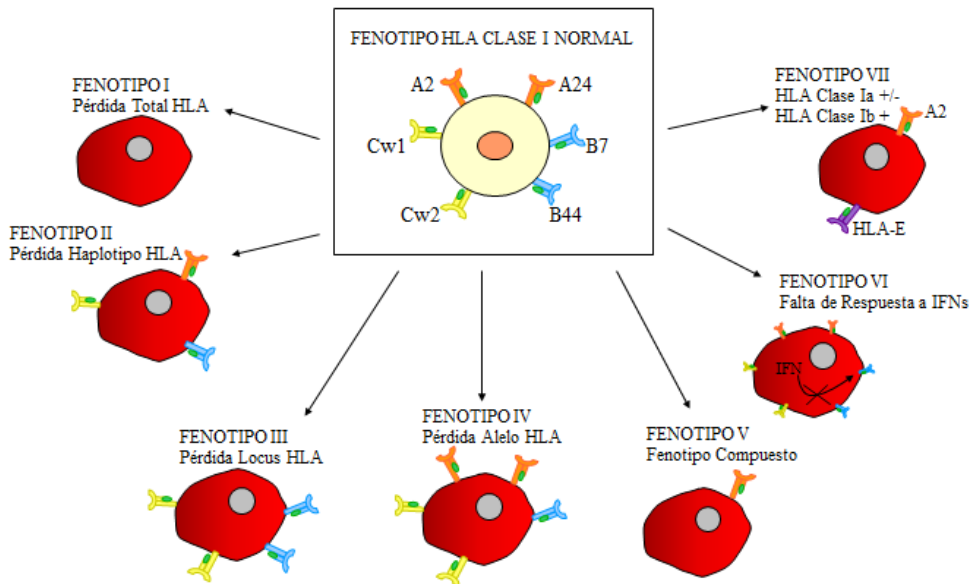


Figura 6. Diferentes fenotipos de HLA alterados en tumores: pérdida total, pérdida de haplotipo, pérdida de locus, pérdida alélica, fenotipos compuestos y fenotipo de falta de respuesta a IFN. *Imagen adaptada de Bernal et al. Libro Inmunoterapia del cáncer. Realidades y perspectivas. Sociedad Española de Inmunología. Cap 2, 2015, 9-19 Editorial Elsevier ISBN: 978-84-9022-887-6.*

Pérdida total de antígenos HLA-I (Fenotipo I)

El defecto molecular más frecuente causante de la pérdida total de moléculas HLA de clase I en las células cancerosas, es la presencia de alteraciones en el gen que codifica la β_2m y que resultan en la falta de expresión de una cadena funcional (58). Con frecuencia, la inactivación bialélica del gen *B2m* es el resultado de una mutación en una copia del gen, en combinación con la pérdida de la otra copia en un proceso de pérdida de heterocigosidad (Loss of Heterozygosity, LOH) (59, 60). Se han identificado mutaciones en el gen *B2m*, que abarcan desde grandes deleciones, hasta inserciones o deleciones de nucleótidos simples, así como también sustituciones de nucleótidos con diferentes consecuencias funcionales. El resultado es que se afecta la expresión de la cadena β_2m , porque se inhibe la transcripción del gen, o en la mayoría de los casos, porque se impide la traducción del ARNm, o por la síntesis de una proteína no-funcional (61). Las mutaciones en el gen *B2m* que conducen a una pérdida total de moléculas HLA de clase I, se han descrito principalmente en el cáncer de colon y en líneas celulares de melanoma (62-64).

Pérdidas selectivas de antígenos HLA-I (Fenotipos II, III, IV)

Entre las pérdidas selectivas de moléculas HLA de clase I destacan las pérdidas de haplotipo (Fenotipo II), de locus (Fenotipo III) y de alelo (Fenotipo IV). La pérdida de un haplotipo HLA-I surge como consecuencia de defectos en la segregación cromosómica o debido a recombinaciones mitóticas, que causan la pérdida del brazo corto del cromosoma 6 donde residen los genes de cadena pesada de HLA de clase I (65-67). Alteraciones en la regulación transcripcional y, concretamente en factores de transcripción de genes que codifican las cadenas pesadas de HLA de clase I, originan la baja regulación selectiva de los locus HLA-A y HLA-B (68). Las pérdidas selectivas de alelos HLA de clase I, pueden deberse a una pérdida del gen que codifica la cadena pesada o bien a mutaciones que inhiben la transcripción o traducción (58, 67, 69, 70).

Fenotipos mixtos (Fenotipo V)

Los fenotipos mixtos o compuestos son el resultado de la combinación de dos alteraciones diferentes, por ejemplo, una pérdida de haplotipo HLA y una falta de expresión del locus HLA B o A (combinación de los fenotipos II y III). En este caso, el resultado final es una célula tumoral que expresa uno o dos alelos HLA (69)

Falta de respuesta a IFNs (Fenotipo VI)

Algunas células tumorales expresan o no antígenos HLA de clase I en condiciones basales, y no responden a ciertos agentes activadores como citocinas e IFN- α ó γ (71, 72). La molécula de IFN es un potente inductor de la expresión de HLA de clase I.

Alteración de los componentes de la maquinaria de procesamiento del antígeno (APM)

Una de las causas de la alteración de la expresión de moléculas HLA-I es su baja regulación que se debe fundamentalmente a una baja expresión o a una pérdida de los componentes de la APM (73), aunque tampoco debe descartarse que sea consecuencia de un mecanismo epigenético que suprima la transcripción de genes que codifican la cadena pesada de HLA I. (74). Entre los componentes de la APM, TAP1 es el que se ha investigado de forma más exhaustiva. La baja expresión o pérdida del gen *TAP1* se ha descrito en carcinomas de mama, colon, riñón, cérvix y próstata y en melanomas cutáneos, con una frecuencia de mutación entre 10-84% (58, 73). Se ha observado una disminución en la expresión de las subunidades LMP2 y LMP7 del complejo multicatalítico del proteosoma y del transportador de péptidos TAP1 y TAP2 en cáncer de pulmón (75). También se ha descrito una baja regulación de los genes *TAP2*

y *LMP7*, contribuyendo junto a la LOH, a la pérdida de HLA de clase I en cancer colorectal con (76). Se han encontrado mutaciones en *TAP1*, *TAP2*, *Tapasina*, *Calreticulina*, *Calnexina* y *ERp57*, aunque las frecuencias de mutación son del 10% o incluso menores para cada gen (77).

6.2.2 Otros mecanismos intrínsecos de escape tumoral

Señalización PD-1/PD-L1

Al igual que otras células del sistema inmunitario, los linfocitos T CD8⁺ expresan de manera constitutiva o después de activarse, receptores inhibitorios (“immunecheckpoints”) que juegan un papel fundamental en el control de la actividad inmunitaria. Los tumores son capaces de alterar este mecanismo y evitar su eliminación a través de las células T CD8⁺. Un ejemplo claro de este fenómeno es la expresión de ligandos de muerte programada 1 (PD-L1) por células tumorales. El receptor de muerte programada 1 (PD-1) es un receptor inhibitorio expresado por una gran variedad de células del sistema inmunitario incluyendo células T, células B y células mieloides. Uno de sus ligandos, PD-L1 se ha observado que se expresa constitutivamente en células T, células B, macrófagos y células dendríticas (78). No sólo se expresa en células inmunitarias, se ha demostrado que células endoteliales de diferentes tejidos como corazón, páncreas y cerebro pueden expresarlo (79). Sin embargo, la expresión de otro de sus ligandos, PD-L2, está más regulada observándose sólo en células dendríticas y macrófagos activados (78). Se ha observado que IFN- γ , una citoquina producida principalmente por células Th1 y CD8⁺ induce la expresión de PD-L1 y PD-L2 en células circundantes (80). PD-1 puede unirse a PD-L1 o a PD-L2 resultando en una reducción de las capacidades citotóxicas, proliferativas y de respuesta a estimulación del TCR en los linfocitos T (81, 82). Hay estudios que muestran que altos niveles de expresión de PD-L1 en células mieloides asociadas al tumor en el microambiente tumoral sirven como un mecanismo de inmunoescape importante (83).

Estos descubrimientos han propulsado el desarrollo de estrategias terapéuticas para el bloqueo de la señalización PD-1/PD-L1 que han tenido éxito en superar este mecanismo de tolerancia. Anticuerpos que bloquean PD-L1 pueden proteger a los linfocitos T CD8⁺ de la apoptosis *in vitro* y aumentar los efectos antitumorales de células T por transferencia adoptiva (84) y vacunas basadas en células tumorales (85). Además, ensayos clínicos con anticuerpos anti-PD-1 y anti-PD-L1 mostraron una regresión tumoral duradera y una estabilización prolongada de la enfermedad en NSCLC, melanoma y cáncer renal (86-88). Están bajo desarrollo otros enfoques nuevos con objetivo en PD-L1, incluyendo ARN de interferencia o pequeñas moléculas (81), y PD-1 soluble el cual puede unirse a PD-L1 y hacerlo inactivo (90).

Señalización Fas/FasL

Los ligandos de receptores de muerte juegan un papel importante en la inmunovigilancia del tumor. Uno de estos ligandos importantes son Fas ligando (FasL). Defectos en la señalización del receptor de muerte pueden contribuir a la supervivencia y a la proliferación de las células tumorales. Los receptores de muerte tienen secuencias citoplasmáticas denominadas dominios de muerte, que son esenciales para la transmisión de la señal apoptótica vía cascada de caspasas. Fas es una proteína transmembrana que pertenece a la superfamilia TNF. Tras el contacto del receptor de muerte Fas (también conocido como CD95) con su ligando, el dominio de muerte asociado a Fas (FADD) acopla caspasa-8, que a su vez se autoactiva y corta otros sustratos de la cascada como caspasa-3, caspasa-6 y caspasa-7 (91). Mecanismos dependientes de contacto pueden mediar la eliminación de células T, como Fas-L, expresado por células tumorales que se unen al receptor Fas expresado por linfocitos, induciendo su apoptosis (92). El papel más importante en la interacción Fas-FasL en el ambiente tumoral puede ser la inducción de muerte celular inducida por activación (AICD) de células T antitumorales. Tras activación por reconocimiento del antígeno tumoral, la célula T expresa altas cantidades de FasL, lo que induce apoptosis de esas células T (“suicidio”) y entre células T (“fratricidio”) (Figura 7) (93).

Sin embargo, el papel de FasL parece no estar claro. Hay estudios contradictorios sugiriendo un efecto positivo contra el tumor. Por ejemplo, la expresión de FasL en el tumor podría conferir efectos antitumorales y proinflamatorios (94, 95). Los investigadores, por lo tanto, hipotizan que se requieren otros factores inmunosupresores para que FasL lleve a cabo su función supresora. Como se muestra a continuación, Galectina-1 puede ayudar a crear un ambiente inmunosupresor en favor de la acción de FasL. A pesar de su debatible papel de contraatacar al sistema inmunitario, FasL representa todavía una diana potencial para terapia del cáncer.

Galectinas

Las galectinas sobreexpresadas en tumor se ha observado que tiene efectos que contribuyen a la inmunoevasión del tumor. Por ejemplo, galectina-1 sobreexpresada en tumores favorece el escape tumoral por apoptosis de células T. Galectina-1 es una proteína de unión a β -galactosidasa implicada en la adhesión celular (96), interacciones de la matriz celular (97), homeostasis inmunitaria (98, 99) y crecimiento celular (99). También se asocia a angiogénesis (100), transformación maligna (101), y pobre prognosis (100, 102, 103).

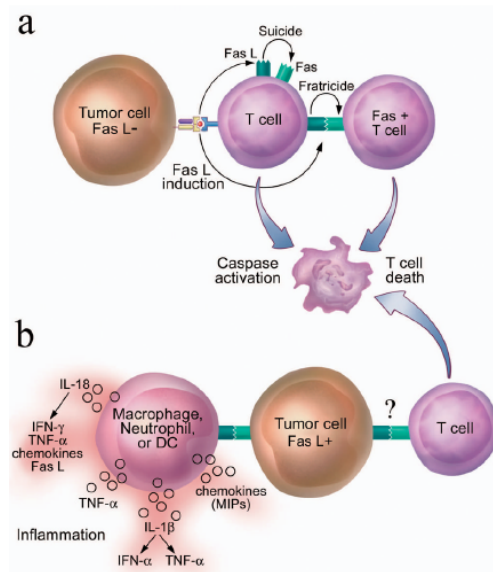


Figura 7. Modelo alternativo para la inducción de muerte de la célula T inducida por FasL después del encuentro con las células tumorales. **a)** AICD de células T después del reconocimiento de las células tumorales. El reconocimiento tumoral conduce a activación de las células T y aumentan la expresión de Fas y FasL en la superficie de la célula T matándose a sí misma (“suicidio”) y a otras células T (“fratricidio”). **b)** Modelo propuesto de “contraataque” tumoral. Las células tumorales expresan FasL funcional y matan a las células T infiltrantes que expresan Fas al interactuar con FasL, lo que conduce a escape tumoral. Sin embargo, la unión de Fas expresado en células de la inmunidad innata como neutrófilos macrófagos y células dendríticas (DCs) inmaduras con FasL expresado en las células tumorales puede provocar la liberación de múltiples citoquinas y quimioquinas proinflamatorias iniciando la fase de rechazo tumoral. *Imagen adaptada de Khong et al. Nat Immunol 2002, 3:999–1005.*

Influencia en el tráfico de las células T: moléculas de adhesión

Aunque las células T juegan un papel en la eliminación de tumores, un fallo en el acceso a estos representa un obstáculo importante. Los tumores pueden afectar al tráfico de células T por disminución de expresión de moléculas de adhesión como moléculas de adhesión intracelular (ICAM-1/2), molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1), y CD34 en la pared de los vasos para impedir la infiltración de las células T al tumor (104). Los tumores también pueden afectar adversamente al tráfico de células T por sobreexpresión de VCAM-1 (105). VCAM-1 se conoce ampliamente como una glicoproteína de la superficie celular expresada en células endoteliales que media la extravasación de linfocitos en el sitio inflamatorio por unión a la integrina 4 α de la célula T (105). Recientemente, se ha propuesto como un mecanismo importante para la metástasis del tumor y el escape inmunitario la sobreexpresión de VCAM-1 (106).

Expresión de CD47 e inhibición de la fagocitosis

Varios estudios detallados han destacado la importancia del papel que desempeña el antígeno de superficie de leucocitos CD47 en cáncer, en concreto en la evasión de la fagocitosis de las células tumorales. (107). CD47 se une a su ligando proteína α reguladora de la señal (SIRP α , también conocido como receptor de fusión de macrófagos), que se expresa en células dendríticas y en macrófagos, consecuentemente inhibiendo la fagocitosis por estos tipos celulares (108). El aumento de expresión de CD47, una señal antifagocítica, puede permitir a las células tumorales escapar de las consecuencias del aumento de las señales profagocíticas inducidas por daño celular y, por tanto, las secuelas inmunitarias evocadas tras reconocimiento de las células tumorales en el contexto de inmunidad adaptativa (107).

Falta de coestimulación

La mayoría de tumores parece crecer en un microambiente no inflamatorio que no conduce a una activación inmunitaria. Histológicamente, los tumores conviven inocuamente con tejido normal, aparentemente sin dar o inducir señales de activación inmunitaria, especialmente durante la fase temprana de crecimiento. El reconocimiento de los antígenos tumorales por células dendríticas bajo estas condiciones no conduce a activación y maduración de la célula dendrítica. Además, la falta de expresión de moléculas co-estimuladoras por las células tumorales puede dar lugar a anergia de células T (109) y activación no óptima de células NK. En un ambiente experimental, la inserción de genes que codifican para las moléculas B7-1, B7-2 o ambas en los tumores generalmente aumenta la inmunogenicidad de esos tumores pero no necesariamente conduce a regresión (110).

6.3 Mecanismos extrínsecos que contribuyen al escape inmunológico: microambiente tumoral y células inmunitarias.

Los mecanismos extrínsecos que contribuyen al escape inmunológico de los tumores comprende todo el microambiente tumoral, desde enzimas que regulan la disponibilidad de ciertos nutrientes para las células efectoras, cuya eliminación resultaría en escape tumoral, como indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), arginasa e óxido nítrico sintasa inducible (iNOs); hasta citoquinas con carácter supresor de la respuesta inmunitaria como TGF- β e IL-10, y otros factores como gangliósidos que pueden contribuir a la evasión del sistema inmunitario. En el microambiente también existen células del sistema inmunitario tanto adaptativo como innato con actividad supresora, como células Treg, células mieloides supresoras (MDSCs), y macrófagos, que contribuyen a la evasión tumoral. También células del estroma como los fibroblastos pueden contribuir al escape inmunológico del tumor.

6.3.1 Efectos supresores de los factores derivados del tumor (FDTs): microambiente tumoral

IDO

Las células tumorales utilizan un gran número de rutas metabólicas alteradas que contribuyen a un ambiente desfavorable para la expansión de las células T. Indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), es una enzima que es sobreexpresada en tumores y su sobreexpresión se ha correlacionado con pobre prognosis en varios tipos de cáncer (111-113). También se ha encontrado una sobreexpresión de IDO en células estromales inmunitarias, sobre todo en células dendríticas y MDSCs (114), donde reduce los niveles de triptófano, un nutriente esencial para la célula T. Esta función tiene muchos efectos en la limpieza de células tumorales. Las células T son muy sensibles a la falta de triptófano, por lo que una privación de triptófano acaba dañando la proliferación en el microambiente tumoral por un arresto en fase G1 del ciclo celular (115). La depleción de triptófano puede causar disminución de la cadena ζ del TCR en células T CD8⁺ lo que daña la función de la célula T. Además, IDO puede convertir el triptófano en metabolitos tóxicos como kinurenina, que daña las funciones de la célula T e induce apoptosis en ellas (116). Se ha descrito además, que IDO derivada del tumor puede reclutar células T reguladoras en el microambiente tumoral y favorecer su diferenciación desde células T vírgenes, ejerciendo así un efecto inmunosupresor (117). Aunque el mecanismo que regula la expresión de IDO no parece estar claro, un estudio ha mostrado que IDO está bajo control genético del gen supresor de tumores *Bin 1*. Una expresión elevada de IDO puede estar relacionada con una pérdida de *Bin 1* en tumores (118).

Por consiguiente, el bloqueo de IDO puede permitir una respuesta inmunitaria efectiva contra los tumores. Varios estudios han mostrado que la inhibición de IDO con 1metiltriptófano (1MT) u otros inhibidores de moléculas pequeñas, incluido tiohidantoína derivada del triptófano o por ARN interferente pueden promover efectos antitumorales por el restablecimiento de la inmunidad de las células T (118, 119). 1MT no tiene efectos secundarios ya que inhibe IDO mientras ahorra triptófano dioxigenasa, una enzima hepática que regula los niveles de triptófano corporales (120).

Arginasa y óxido nítrico sintasa (iNOS)

La alteración de la ruta implicada en el catabolismo de L-arginina está vinculada a la supresión células T en expansión. Dos enzimas importantes implicadas en el metabolismo de la arginina son arginasa y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (121). La arginina es usada por la enzima iNOS como precursor para la producción de óxido nítrico (NO). Por lo tanto, altos

niveles de arginasa e iNOS eliminan arginina del microambiente tumoral, un nutriente esencial para la célula T (121, 122). Varios tipos de tumores muestran altos niveles de arginasa e iNOS (123, 124) y MDSCs reclutadas en el microambiente tumoral (125, 126) se ha mostrado que producen arginasa (106). La depleción de arginina por los niveles altos de arginasa provoca disminución de la expresión de la cadena ζ del TCR y está asociado con el arresto del ciclo celular de las células T (123, 127). Un aumento de la expresión de iNOS por MDSCs y, por tanto, altos niveles de NO, puede inducir también arresto del ciclo celular de células T y se ha mostrado estar asociado con progresión del tumor y angiogénesis (128). Además, un aumento de NO bloquea la producción de IL-2 de las células T (129), una citoquina que estimula la proliferación de células T.

Por consiguiente, el uso de de inhibidores de arginasa/iNOS como N ω -Hidroxi-nor-L-arginina (nor-NOHA), N ω -Hidroxi-L-arginina (NOHA) (130, 131), o el inhibidor de iNOS N^G-Monometil-L-arginina, sal de monoacetato (L-NMMA), se ha mostrado que restauran la expansión de células T y bloquean el crecimiento tumoral en modelos de ratón (132, 133). El bloqueo de NO puede permitir efectos anti-tumorales. Un estudio mostró que la inhibición de NO usando nitroaspirina (NCX-4016) combinado con una vacuna tumoral mejoró el número y las funciones efectoras de células T, provocando una disminución del crecimiento tumoral y aumentando la supervivencia de los ratones (134). Aunque análogos de la arginina que bloquean arginasa están disponibles para investigar esta ruta biológica (135), no se están usando actualmente para estudios clínicos por seguridad asociado con la alteración del papel natural de la arginina en el ciclo de la urea.

TGF- β

Otro de los FDTs que se encuentran en el microambiente tumoral es TGF- β . Una sobreexpresión de TGF- β , una citoquina conocida que regula el crecimiento y la actividad de las células T, suprime fuertemente sus respuestas efectoras. Varios tumores que producen TGF- β explotan esta estrategia para evadir la respuesta inmunitaria (136). El mecanismo de supresión de las células T es a través de numerosas rutas de señalización TGF- β . En términos de activación y función, TGF- β se puede unir a los receptores de TGF- β sobre las células T e inhibir la producción de IL-2, la activación de los CTLs, la expansión clonal de linfocitos T CD8⁺ memoria, y la expresión de perforinas, esencial para la muerte de las células tumorales mediada por los CTLs (137). Otro papel inmunosupresor igualmente importante de TGF- β es que inhibe la diferenciación de los linfocitos Th1 y Th2 inhibiendo sus factores de transcripción que determinan el linaje (138, 139). TGF- β está también implicado en la inducción del factor de transcripción Foxp3 que, en última instancia, promueve el crecimiento y la diferenciación de las

células Treg CD4⁺ CD25⁺ (140). TGF-β puede promover también el desarrollo y mantenimiento de células Th17 (141). La función de las células Th17 en el microambiente tumoral parece ser un arma de doble filo. Además de su papel en la respuesta inflamatoria procarcinógena, las células Th17 también juegan un papel importante en la inmunidad antitumoral como han demostrado varios estudios en cánceres humanos y en modelos de ratón (142, 143). También TGF-β interfiere en la función de las células NK. Se ha observado que inhibe la expresión de receptores activadores NKG2D y NKp30 de las células NK (144).

Interleuquina 10

La IL-10 es una citoquina anti-inflamatoria que suprime la activación de células T y NK promoviendo así la supervivencia de células tumorales (145). Se ha observado en tumores humanos recién extirpados y líneas celulares de cánceres de diversos orígenes la presencia de IL-10 tanto a nivel de ARNm como de proteína (146-148). Esta citoquina puede ser liberada al microambiente por células tumorales (149) o macrófagos asociados al tumor (150). Esta citoquina inhibe la presentación antigénica, la producción de IL-12 e inducción de respuestas tipo Th1 (20). La IL-10 puede bloquear la diferenciación y proliferación celular Th1 e inhibe la producción de citoquinas tipo Th1 (151), lo que impactaría negativamente en la proliferación de los CTLs. Puede potenciar la susceptibilidad a lisis autóloga de células NK (152). La IL-10 puede ejercer un efecto inhibitor en la diferenciación de DCs desde precursores hematopoyéticos (153). La IL-10 actúa como activador del factor de transcripción STAT, que a su vez inhibe la diferenciación de DCs y células mieloides inmaduras a través de la activación de STAT3 (154). Además, el estatus funcional de la DC también es comprometido por IL-10. Las células mieloides inmaduras se convierten en MDSCs que ejercen efectos inmunosupresores sobre las células T CD8⁺ a través de varios mecanismos como se detallará más adelante (ver sección de MDSCs). También potencia la apoptosis espontánea de DCs (155). La IL-10 puede proteger al tumor del reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos por disminución de la expresión de moléculas de HLA-I y II y molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) (156). La disminución de expresión de HLA-I mediada por IL-10 puede deberse a la disminución de expresión de las proteínas TAP1 y TAP2 en los tumores (157). Además, se ha observado que IL-10 afecta a los mecanismos efectores inmunitarios como la lisis de las células tumorales mediada por los linfocitos T CD8⁺ (158).

Gangliósidos

Los tumores son capaces de escapar de la destrucción del sistema inmunitario adoptando estrategias que afectan a la función de la célula T en el microambiente tumoral. Uno de los mecanismos propuestos implica la liberación de gangliósidos por parte del tumor. Los gangliósidos son glucosfolípidos que se encuentran formando “clusters” en la superficie de las células de los mamíferos que regulan la respuesta celular así como el crecimiento y diferenciación (159). Sin embargo, muchos tumores expresan grandes cantidades de gangliósidos que no se expresan en su tejido de origen normal o sobreexpresan ciertos tipos de gangliósidos del tejido que con frecuencia liberan al microambiente. Este fenómeno se ha observado en varios tipos de cánceres humanos (159). Los gangliósidos solubles que se liberan al microambiente pueden desregular la función de la célula T de múltiples maneras. Por ejemplo, hay evidencia de que estos gangliósidos solubles inhiben la proliferación de las células T específicas del tumor (160) e inducen apoptosis en ellas (161). Los gangliósidos pueden tener un papel en interrumpir la producción de citoquinas como IFN- γ en células tipo Th1 (162) e IL-5 en células Th2 (163). Además, los gangliósidos solubles pueden desviar la respuesta de las células T contra el tumor hacia una respuesta Th2 que corresponde con una limpieza del tumor mucho menor que la respuesta Th1 (164). Se ha mostrado que los gangliósidos solubles también interrumpen la función de NF κ B en las células inmunitarias (165), así como el tráfico de gránulos líticos y exocitosis en células T CD8⁺ (166). Así, los gangliósidos que son liberados de manera soluble al microambiente tumoral pueden interrumpir las funciones normales de las células T de varias formas.

6.3.2 Actividad supresora de las células inmunitarias del microambiente tumoral

En la Figura 8 se muestran los principales tipos de células del sistema inmunitario que pueden desarrollar un papel supresor importante en el microambiente tumoral. Pueden ser de origen linfoide como las células T reguladoras, o bien de origen mielóide como MDSCs, células dendríticas y macrófagos.

Supresión mediada por células de origen linfoide

Células T reguladoras

Muchas rutas supresoras involucran múltiples poblaciones celulares del microambiente tumoral. Las células dendríticas inmaduras que presentan antígenos específicos a las células T transmitirán señales tolerogénicas para reprimir la capacidad de respuesta de la célula T a futura estimulación del TCR o favorecer la diferenciación hacia un fenotipo de célula T reguladora

(Treg), definidas como $CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$. Se ha observado que el factor de transcripción Foxp3 es un paso crítico para el desarrollo funcional de las células Treg (167). Están involucradas en funciones supresoras antígeno-específicas. Tras activación del TCR las células Tregs liberan citoquinas inmunosupresoras como IL-10 que disminuye la producción de citoquinas Th1 y moléculas co-estimuladoras en células presentadoras de antígenos. Las células Treg se diferencian bajo la influencia de TGF- β e IL-2 a través del receptor de alta afinidad de IL-2, CD25 (168).

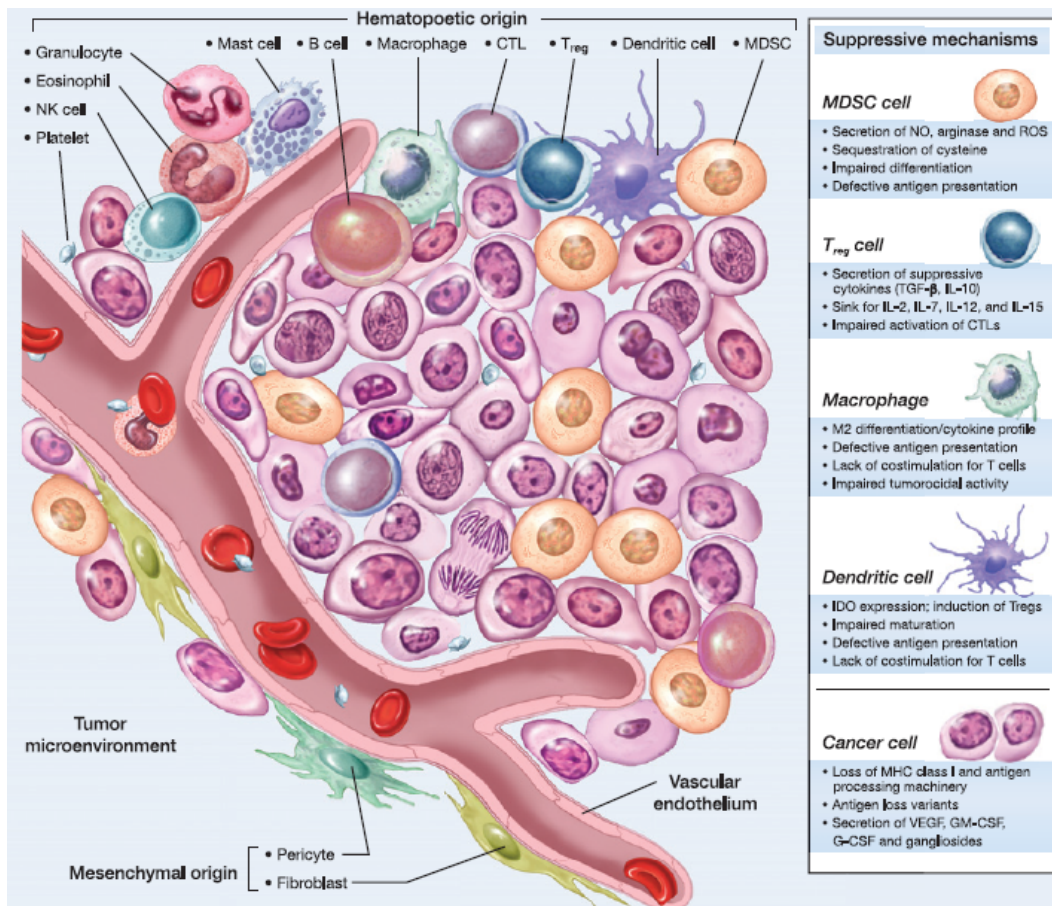


Figura 8. Infiltrado celular en el microambiente tumoral. Los cánceres establecidos consisten en una amplia variedad de células del sistema inmunitario que contribuyen al estroma tumoral de una malignidad en crecimiento. Los tumores poseen células infiltradas tanto de la inmunidad innata como adquirida, como MDSCs, macrófagos, DCs mastocitos, eosinófilos, neutrófilos, células NK y linfocitos. Estas células forman coordinadamente una compleja red reguladora que promueve el crecimiento tumoral por creación de un microambiente que permite a los cánceres evadir la inmunovigilancia y destrucción. G-CSF, Factor estimulante de colonias de granulocitos; GM-CSF, Factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocitos, NO, óxido nítrico. *Imagen adaptada de Kerkar et al. Cancer Resarch 2012, 72, 3125-3130.*

La eliminación de estas células que constituye un 5-10% de las células T humanas induce enfermedades autoinmunes en ovarios, la glándula tiroidea, las glándulas salivares y la mucosa de revestimiento del estómago e intestino delgado. Se han descrito varios mecanismos de evasión inmunitaria mediada por células Treg. Entre estos mecanismos son de importancia la secreción de TGF- β e IL-10 que crean un microambiente supresor que altera las respuestas efectoras antitumorales de linfocitos T CD4⁺, CD8⁺ y células NK. Las células Treg expresan un receptor heterotrimérico (CD25: cadena α ; CD122: cadena β ; y CD132: cadena γ) que tiene 100 veces más afinidad por la IL-2 que la forma dimérica a la que le falta CD25-cadena α . Esta diferencia funcional probablemente resulta en que las células Treg actúan como sumideros competitivos de IL-2, interleuquina inflamatoria importante, dentro del microambiente tumoral (167). Además, es probable que funcionen como sumideros de otras citoquinas homeostáticas y antitumorales como IL-7, IL-12 e IL-15 (169).

Las células Treg también expresan moléculas en superficie como Antígeno de Linfocitos T Citotóxicos (CTLA-4), receptor de muerte programada 1 (PD-1) y gen relacionado con la familia de receptores TNF inducido por glucocorticoides (GITR, también conocido como TNFRSF18), que interactúan con sus respectivos ligandos (CD80/CD86, PD-L1 y GITR-L) presentes en las células presentadoras de antígeno. La interacción entre estas células en los tumores mantiene y propaga un ambiente supresor y tolerogénico (170). CTLA-4 se une a los mismos ligandos que CD28, pero lo hace con una avidéz y afinidad mayor, sobre todo por B7-1. Por lo tanto, CTLA-4 puede competir con CD28 por la unión a sus ligandos atenuando la respuesta de las células T. La señalización de CTLA-4 provoca la producción de citoquinas reguladoras como TGF- β , que inhibe la presentación antigénica por las APCs y la función de las células T (171). La expresión predominante de CTLA-4, se ha especulado que podría requerirse para la supresión mediada por contacto celular y se asocia a la producción de las citoquinas supresoras IL-10 y TGF- β . De hecho, ratones “knockout” para CTLA-4 con ausencia de expresión de este en el compartimento celular de Treg, se caracterizaron por linfoproliferación sistemática sugiriendo que la deficiencia de CTLA-4 por sí misma en las células Treg puede cambiar la homeostasis inmunitaria (172).

En vista de su papel inmunosupresor, se han hecho varios estudios con terapias mediante anticuerpos monoclonales con diana en CTLA-4 bloqueando su acción. Se han desarrollado dos anticuerpos monoclonales, Ipilimumab y Tremelimumab, que se unen ambos a CTLA-4 y bloquea su interacción con sus ligandos aumentando la activación de las células T y su proliferación (170). En varios estudios en pacientes con melanoma metastásico avanzado en fase III, Ipilimumab demostró una mejora de la supervivencia (170,173) Aunque Ipilimumab se ha demostrado tener efectos beneficiosos, también en esos estudios se han observado efectos

perjudiciales con efectos inflamatorios. En un reciente ensayo clínico en humanos, anticuerpos que fueron diseñados para inhibir la señalización mediada por CTLA-4 y PD-1 mostró la capacidad de inducir inmunidad antitumoral endógena que resultó en la regresión de cánceres establecidos (172). La depleción de las células Treg más inyección de anticuerpo capaz de bloquear CTLA-4 potenció la reactividad a un antígeno asociado a tumor conocido (TAA) (172). La identificación de GITR, expresado sobre células Treg podría permitir nuevas oportunidades terapéuticas, ya que la estimulación de GITR con un anticuerpo activador revertiría la supresión mediada por las células Treg (174).

Supresión mediada por células de origen mieloide

Está bien establecido que las subpoblaciones de células mieloides son capaces de inhibir las respuestas inmunitarias frente a tumores usando una gran variedad de mecanismos. Muchos trabajos describen las propiedades inhibitoras de las células mieloides en cáncer. Las células mieloides representan numerosas poblaciones distintas y heterogéneas de células de origen hematopoyético (175). El marcador CD11b (también conocido como α M-integrina) representa un antígeno importante de diferenciación de linaje mieloide. Colectivamente, las células mieloides crean un ambiente inflamatorio crónico y son mediadores críticos de la iniciación tumoral, angiogénesis y metástasis (176). También las células mieloides contribuyen a la formación del estroma tumoral y da forma al ambiente inmunitario en masas tumorales que se expanden (177). Las subpoblaciones mieloides más importantes que contribuyen a disfunción inmunitaria dentro del estroma tumoral incluyen MDSC, macrófagos y células dendríticas.

MDSCs

Las MDSCs clásicamente se han descrito como una población de células CD11b⁺ Gr-1⁺ en ratones con tumores con capacidades demostradas de suprimir la inmunidad antitumoral de linfocitos T CD8⁺ (178). Se ha descubierto que el factor estimulante de colonias de macrófagos de granulocito (GM-CSF) es un factor clave en conducir la expansión de estas células (179). En humanos, el marcador para MDSCs no está claramente definido, debido en gran parte a la falta de un Gr-1 homólogo. Basándose en estudios previos, se piensa que el fenotipo para MDSCs humanas probablemente se encuentra en una población de células LIN⁻ HLA-DR⁻ CD33⁺ (180).

Las MDSCs portan los mismos marcadores que las células mieloides no supresoras que se encuentran bajo condiciones fisiológicas normales en el huésped. Sin embargo, en ratones con tumores y pacientes con cáncer, las células mieloides se inducen a un estado supresor y se encuentran con perfiles de diferenciación alterados que se asocia con un fenotipo inmaduro

(180). Estas células mieloides inmaduras poseen la capacidad de diferenciarse a macrófagos, DCs y neutrófilos (181). Además, presentan plasticidad entre diferentes linajes, como se ha destacado en estudios la capacidad de las MDSCs CD11b⁺ Gr-1⁺ de diferenciarse a células endoteliales CD31⁺ (182).

Los múltiples mecanismos por los que las células mieloides median inmunoevasión se están descubriendo en modelos de ratón. La mayoría de estudios han destacado el requerimiento de contacto célula-célula de MDSCs para mediar supresión de células T, sugiriendo que los mediadores de vida corta o la interacción directa entre células inducen la disfunción inmunitaria. Ahora está bien aceptado que las MDSCs expresa altos niveles de óxido nítrico sintasa inducible y arginasa (177). La producción de óxido nítrico impone un papel supresor directo en células T por inducción de apoptosis en ellas, inhibición de la señalización STAT5 y la formación de peroxinitrito, un potente oxidante que induce nitración y nitrosilación de aminoácidos que son esenciales para la función de la célula T (179). El aumento de la actividad y producción de arginasa 1 elimina L-arginina del microambiente tumoral y afecta a la capacidad proliferativa de las células T (182). Otros mecanismos de supresión inmunitaria inducida por MDSCs que se han descrito incluye el secuestro de cisteína provocando una disponibilidad limitada de este aminoácido esencial para las células T, la secreción de citoquinas supresoras (por ejemplo, IL-10), y la hiperproducción de ROS (183). Interesantemente, trabajos recientes sugieren que MDSCs tienen la capacidad de desviar la diferenciación de células T CD4⁺ a células Treg (184), aunque se necesitan más análisis que muestren un enlace inmunoregulador. Estos estudios revelan que las MDSCs facilitan el crecimiento tumoral no solo produciendo factores proangiogénicos sino también empelando numerosos mecanismos de inmunosupresión que dificulta las respuestas efectoras de las células T.

Macrófagos alternativamente activados

Aunque muchos focos en la capacidad supresora de las células mieloides están puestos en las MDSCs, los macrófagos también juegan un papel importante en la inmunoevasión de los tumores. Estas células estromales, que son identificadas por la expresión de CD11b y F4/80 en ratones; y CD11b, CD14, CD33 y CD68 en humanos; se han descrito clásicamente como ser desviadas hacia un perfil funcional alterado tipo M2 (185). Los macrófagos M2 producen bajas cantidades de citoquinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF- α , IL-12, y altas cantidades de mediadores inmunosupresores como IL-10, TGF- β y VEGF (186). Los macrófagos también tienen la capacidad inherente de presentar antígenos a los linfocitos T y proporcionan un apoyo co-estimulador en el microambiente adecuado. Esta capacidad de montar una respuesta inmunitaria es perturbada en el microambiente tumoral y probablemente juega un papel en la interrupción de la inmunidad mediada por la célula T. Los macrófagos disfuncionales también

presentan fallos en la capacidad de mediar lisis directa de células cancerígenas. Estudios han mostrado que la activación bajo condiciones inflamatorias, los macrófagos pueden mediar citotoxicidad contra las células tumorales a través, probablemente, de factores solubles como TNF- α , radicales del oxígeno, y metaloproteinasas de la matriz extracelular (186). Por tanto, dividiendo las estrategias para re-educar a los macrófagos infiltrantes en un macrófago activado tipo M1 podría mejorar tanto la muerte directa y la autorización indirecta de la respuesta inmunitaria antitumoral adaptativa (187).

DCs funcionalmente dañadas

Las DCs se han descrito como células presentadoras de antígenos profesionales por su capacidad de educar las células T en los órganos linfoides secundarios (188). Sin embargo, en el ambiente tumoral, las DCs en estrecho contacto con células tumorales desarrollan defectos funcionales y fallan a la hora de preparar a las células T en el mismo modo en el que las DCs residen en los órganos linfoides bajo condiciones no patológicas (189).

Las DCs asociadas al tumor poseen defectos en la maquinaria de presentación del antígeno y disminuyen la expresión de moléculas HLA de clase I y II además de genes asociados con la presentación del antígeno como TAP, y proteínas de bajo peso molecular (185). Por lo tanto, los tumores han desarrollado una compleja red que altera la diferenciación de las DCs y dañan la capacidad de esas células para montar respuestas inmunitarias adaptativas contra antígenos tumorales.

Fibroblastos

Los fibroblastos también pueden modificar la respuesta de las células T a través de varios mecanismos. Como principales productores de matriz extracelular controlan el tráfico de células T desde el margen invasivo hacia el estroma tumoral. Pueden inhibir directamente la inmunidad antitumoral mediada por TNF- α e IFN- γ (190), alterar la maduración de células dendríticas (191) e inhibir la proliferación de células T (192). Además se ha observado que expresan “inmunecheckpoints” como PD-L1 y su expresión es aumentada tras estimulación con IFN- γ (193).

6.4 Mecanismos de evasión a las células NK

La descripción de pérdida parcial o completa de HLA de clase I como mecanismo de inmuno escape con frecuencia haría a la célula tumoral susceptible de ser eliminada por las células NK pero, ¿por qué las variantes tumorales con pérdida de HLA-I continúan creciendo y no son destruidas por las células NK?. Las células NK expresan receptores activadores como

NKG2D, que se une a ligandos inducidos por estrés (MICA and MICB) cuya expresión puede ser aumentada en una variedad de tumores. La activación de células NK a través de esta ruta de señalización puede superar el efecto inhibitorio de los receptores que se unen a HLA-I (KIRs). Así, aunque los tumores HLA-I negativos deberían de ser susceptibles a morir por células NK, la pérdida o disminución de la expresión de MICA o MICB por tumores con crecimiento activo representa una estrategia de escape potencial, pero una que todavía no ha sido demostrada en tumores humanos (20).

Explicaciones alternativas de por qué las células tumorales que han perdido HLA-I no son destruidas por células NK podrían derivar del modelo activación-inhibición (Figura 9). Las células NK son rápidamente activadas en presencia de factores estimulantes como IL-2, IL-12, IL-15 o IFNs tipo I en respuesta a condiciones inflamatorias asociadas con infección microbiana. En microambientes “estériles”, como el observado en tumores o trasplantes, esos factores estimulantes podrían no estar disponibles y la interacción entre células dendríticas y el resto de células NK que induce su activación podría no ocurrir. Además una falta de expresión de moléculas co-estimulantes como B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40 y CD70 por tumores podría dificultar la activación óptima de células NK vía la co-estimulación de CD28 y CD27. Es posible que en algunas situaciones, los tumores puedan producir citoquinas inmunomoduladoras como TGF- β o factor inhibitorio de migración de macrófagos (MIF), el cual puede inhibir directamente la activación y la función de la célula NK (20).

Otra manera por la que los tumores evaden el reconocimiento inmunitario es la pérdida de ligandos de NKG2D incluyendo moléculas MICA, MICB y las proteínas de unión UL16. Los ligandos de NKG2D son glicoproteínas que comparten un superdominio 1 α 2 α en común con MHC-I y se unen a la membrana a través de los dominios transmembrana o ancladas a glicofosfatidilinositol (GPI) (194). En su forma de unión a membrana, los ligandos de NKG2D son sobreexpresados en tumores en respuesta a una infección, transformación maligna, u otros estreses celulares a través de varias rutas resultando en activación potenciada de células NK y células T CD8⁺ así como los efectos citotóxicos sobre las células que expresan ligandos de NKG2D (194). Sin embargo, las células tumores pueden liberar ligandos de NKG2D al microambiente tumoral a través de su muerte, por secreción de exosomas, o proteólisis por metaloproteinasas de la matriz extracelular (195). Estos ligandos de NKG2D solubles o exosomales pueden unirse a receptores NKG2D de las células T e inducir internalización y degradación del mismo en células T CD8⁺ infiltradas en el tumor. La degradación de NKG2D en células T provoca una disminución de la activación de las células T tras contacto con la célula tumoral contribuyendo a la inmunoevasión del tumor (196).

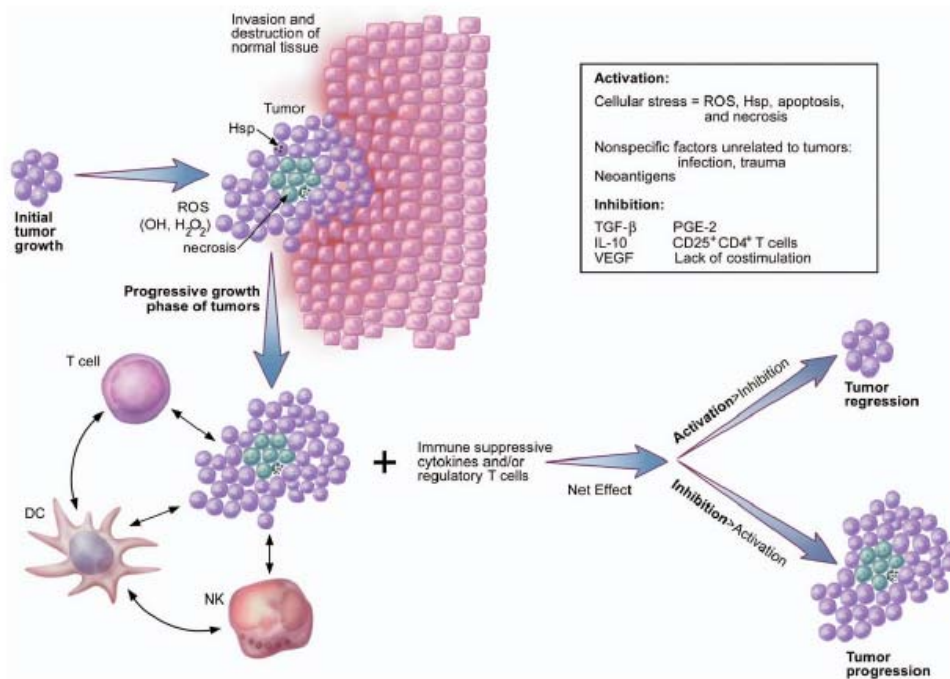


Figura 9. Activación y supresión durante la progresión tumoral. La activación inmunitaria durante la progresión temprana del tumor podría ser provocada por la expresión de neoantígenos. Además el crecimiento progresivo de los tumores podría estar asociado con la invasión y destrucción de tejido circundante normal. Otros factores que podrían causar activación inmunitaria incluyen la generación de proteínas de choque térmico (Hsps) que resultan del estrés celular, y ROS como OH- y H₂O₂. Esa activación inmunitaria podría impedirse por una falta de coestimulación apropiada, la presencia de citoquinas inmunosupresoras como VEGF, IL-10 y TGF-β, y el impacto de células inmunorreguladoras como células T CD4⁺ CD25⁺ y NKT. Ya que el tumor crece, estos eventos ocurren en la presencia de apoptosis y necrosis masiva de células tumorales, células inmunitarias infiltrantes y células estromales de alrededor. El destino de los tumores puede ser dictado por el efecto neto de activación e inhibición inmunitaria. *Imagen adaptada de Khong et al. Nat Immunol 2002, 3:999–1005*

En algunos cánceres humanos MICA y MICB en suero se ha relacionado con estadio de la enfermedad y supervivencia y, por lo tanto, puede usarse como predictor de pronóstico (194). Los inhibidores de desacetilasa de histonas (HDACis) están siendo testados como tratamiento para aumentar la expresión de MICA y MICB (194). Otras sustancias con el objetivo de la liberación de ligandos de NKG2D también se están explorando para potenciar la muerte de las células tumorales por los linfocitos T CD8⁺.

Así mismo, está documentado que células tumorales secretan o experimentan una ruptura de ligandos del receptor NKG2D, disminuyendo su expresión en la superficie de la célula neoplásica y perjudicando el reconocimiento y función de la célula NK (197).

7. Composición celular del microambiente tumoral y resultados clínicos en cáncer

Una vez producida la transformación maligna de la célula y el crecimiento tumoral, invade localmente y se dispersa hacia otros órganos distantes, todavía interactúa con el microambiente tumoral y, en particular, con células inmunitarias en el órgano donde se desarrolló el tumor primario, pero también en el órgano donde ha metastatizado. La composición del microambiente tumoral no es homogénea. Se observa heterogeneidad entre diferentes tipos de tumores y aún entre tumores de pacientes con el mismo tipo de cáncer. Algunos tumores muestran una baja infiltración por células inmunitarias. Otros, sin embargo, presentan una alta infiltración por linfocitos. Dentro de estos, la arquitectura del microambiente tumoral, con la localización de las células inmunitarias en el frente invasivo y en el centro tumoral, la presencia de agregados linfoides organizados adyacentes al tumor y el tipo de contexto inflamatorio determina el impacto pronóstico del infiltrado inmunitario. Por tanto, la descripción del contexto inflamatorio en tumores humanos es de gran importancia en los diferentes niveles de cuidado de los pacientes. Eso completa los estudios de análisis de mutaciones, transcripcionales y de patrones epigenéticos de las células malignas y abre nuevas vías para entender cómo las células tumorales modulan su microambiente inmunitario y es modulado por la reacción inmune. Eso proporciona marcadores pronósticos como el “Immunoscore” que son altamente predictivos de la supervivencia de los pacientes en lugares primarios y metastásicos del tumor, y son independientes de los usados clásicamente como el sistema de clasificación tumoral TNM, los niveles de lactato deshidrogenasa en sangre o el “score de Gleason” en cáncer de próstata. Esto ayuda a seleccionar pacientes que probablemente se beneficien de las inmunoterapias identificando el contenido tumoral de células inmunitarias que expresan inmunocheckpoints inhibidores como CTLA-4 y/o PD-1, o que expresan nuevos objetivos de inmunomodulación. Además, tumores pobremente diferenciados podrían identificar pacientes que se beneficiarían de terapias adoptivas de células T (198). Un aumento del conocimiento del microambiente tumoral e inmunitario debería revelar que moléculas son objetivo para enfoques innovadores de inmunoterapias.

Los tumores están compuestos por células malignas transformadas que interactúan con diferentes componentes del tejido donde crecen. Fibroblastos, sangre y vasos linfáticos encontrados en tejidos normales están presentes y disfuncionales en tumores. Además, las células tumorales se rodean por células infiltrantes de origen hematopoyético incluyendo linfocitos, células dendríticas, macrófagos, mastocitos, y células polimorfonucleares. Esas diferentes poblaciones celulares no están diseminadas en los tumores, sino que están localizadas en áreas selectivas de estos, pudiendo ser encontradas en el centro tumoral, en el margen invasivo y en agregados organizados linfoides adyacentes a los nidos tumorales. A continuación se habla del papel de los diferentes tipos celulares en el cáncer.

7.1 Células T.

Numerosos estudios han evaluado el infiltrado inmunitario en cánceres humanos y han investigado su correlación con la prognosis. En la gran mayoría de casos, una alta infiltración por células T memoria con una orientación hacia Th1 y una gran proporción de células T CD8⁺ correlaciona con un pronóstico favorable. Se han publicado estudios en los que se observa esta relación, y concluyen que altas densidades de células T CD3⁺, T citotóxicas CD8⁺ y T memoria CD45RO⁺ están claramente asociadas con una supervivencia más prolongada en diferentes tipos de tumores como melanoma, cabeza y cuello, mama, vejiga, urotelial, ovario, colorectal, renal, próstata y pulmón (2). Sin embargo, algunos estudios muestran un pronóstico pobre o nulo en tumores de próstata (199), pulmón (200), carcinoma renal (201) y endometrial (202). En la mayoría de casos en los que se observó un pobre infiltrado de células T CD8⁺ con frecuencia mostraron grados histológicos más altos caracterizados por diferenciación, vascularización prominente e inflamación. Interesantemente, algunos estudios han evaluado también sitios metastásicos y han encontrado consistentemente que un aumento de células T CD8⁺ correlaciona con una supervivencia prolongada en metástasis de hígado procedente de colon (203) y metástasis de pulmón (204).

Para otras subpoblaciones el panorama es menos sencillo. Parece haber una correlación inversa entre el impacto clínico de células Th2 y Th17. Por ejemplo, en cáncer gástrico, ovárico o pancreático, una alta densidad de células Th2 correlaciona con un peor pronóstico. Sin embargo, una alta densidad de células Th17 correlaciona con un mejor pronóstico en cáncer gástrico u ovárico. Al contrario, altas densidades de Th2 en cáncer colorrectal, pulmón o mama correlaciona con un buen pronóstico, en los que una alta densidad de Th17 correlaciona con un mal pronóstico (205). Aunque estos estudios se han llevado a cabo en diferentes cohortes de pacientes y en diferentes tipos de tumores sugieren que diferentes tumores, en distintos órganos pueden contribuir a modular el microambiente tumoral en el que el impacto de una determinada subpoblación de células T depende de la organización del contexto inmunitario y del balance entre inflamación aguda y crónica.

El caso de las células Treg es más complejo. Muchos estudios han mostrado un impacto deletéreo de las células Treg en cáncer de ovario, mama, melanoma, pancreático, hepático y pulmón también (2). Sin embargo, otros estudios han reportado una supervivencia prolongada asociada a altas densidades de células Treg en cáncer de cabeza y cuello, colorectal y vejiga (2). Esta controversia puede ser debida a la falta relativa de especificidad de Foxp3 como marcador de estas células y al hecho de que las células Treg pueden tener diferentes impactos clínicos dependiendo del subtipo de cáncer estudiado.

El hecho que las poblaciones de células inmunológicas estén situadas en diferentes zonas de un tumor y que estas varíen entre los distintos tipos de cáncer, sugiere que las células inmunológicas pueden tener diferentes funciones en el control tumoral.

7.2 Células B.

El papel deletéreo o benéfico de las células B en la inmunidad antitumoral ha sido un tema de debate. Algunos estudios sugieren que podrían tener una función protumoral. De hecho, la detección de anticuerpos específicos en suero o en mama de pacientes con cáncer se asoció a un mal pronóstico (206). De manera similar, en cáncer colorectal avanzado se pudo observar una disminución significativa del tamaño tumoral tras depleción de las células B con anticuerpos anti-CD20 con Rituximab (207). Muchos estudios en ratones modelo han intentado explicar este efecto protumoral como la formación de inmunocomplejos capaces de activar al sistema complemento que provoca inflamación (208) o promueve la degradación de la matriz extracelular y angiogénesis en una manera dependiente de macrófagos y granulocitos (209). También se ha observado que inhiben la actividad citotóxica de los linfocitos T en varios modelos de tumor (206), o directamente favorecen el crecimiento tumoral y metástasis a través de linfoquinas (210). Estudios recientes han revelado la existencia de una subpoblación de células B con función inmunomoduladora que pueden favorecer la progresión tumoral. Se denominan células B reguladoras (Breg) y se desarrollan a partir de células B “naive” (vírgenes) a través de TNF- α . Se ha observado que estas células Breg pueden producir TGF- β lo que favorece la diferenciación de células T CD4⁺ hacia células Treg inmunosupresoras. Además producen IL-10 que junto con el TGF- β inhiben la actividad antitumoral de los linfocitos T CD8⁺ (211).

Por el contrario, muchos estudios han reportado un papel beneficioso de las células B en diferentes tipos de tumor. Por ejemplo, en un modelo de melanoma de ratón se observó que la depleción de las células B aceleró el crecimiento tumoral y disminuyó la proporción de células T CD4⁺ y T CD8⁺ (212). Paralelamente, numerosos estudios clínicos han demostrado que una alta densidad de células B en el microambiente tumoral está asociada con un aumento de la supervivencia y mejor pronóstico, por ejemplo en cáncer colorectal (47) y en pulmón (213-215).

Interesantemente, han aumentado el número de estudios que reportan ahora que no sólo la densidad sino también la organización del infiltrado de células B puede asociarse positivamente con el resultado clínico de los pacientes. En un estudio de cáncer de pulmón se observó la presencia de estructuras terciarias linfoides en el microambiente tumoral caracterizadas por la presencia de células dendríticas maduras formando “clusters” con las células T, rodeado por

células B organizadas en folículos (216). Más tarde, estudios han reportado una asociación entre la presencia de los folículos de células B y resultado clínico de los pacientes. Por ejemplo, en pulmón en NSCLC, una alta densidad de células B CD20⁺ en estructuras terciarias linfoides se asoció con supervivencia prolongada de los pacientes independientemente del tratamiento recibido (217). Existen varios mecanismos que pueden explicar el efecto positivo de las células B en la inmunidad antitumoral. Se ha demostrado que *ex-vivo*, por ejemplo, las células B infiltradas de NSCLC humanas son capaces de producir una gran cantidad de anticuerpos antitumorales específicos (217). Además de su capacidad de provocar citotoxicidad dependiente del complemento o de anticuerpos, los anticuerpos cuando se unen a su antígeno pueden formar inmunocomplejos capaces de activar a células dendríticas y favorecer la generación de respuestas inmunitarias de células T CD8⁺ antígeno-específicas (218). En paralelo a la producción de anticuerpos antígeno-específicos, las células B pueden actuar también como células presentadoras de antígenos. Gracias a varias parejas de ligando/receptor involucradas en la interacción célula B-célula T (CD80-CD86/CD28, CD40/CD40L, CD27/CD70, OX40L/OX40) se ha mostrado que las células B juegan un papel importante en la expansión inicial de células T CD4⁺ (219, 220), son capaces de realizar una presentación cruzada a los linfocitos T CD8⁺ (221), y promover supervivencia y proliferación de los CTLs (222). En base a estas funciones, un estudio de cáncer ovárico en el que las células B infiltradas en el tumor estaban en estrecho contacto con las células T CD8⁺, expresaron moléculas de MHC-I, MHC-II, CD80 y CD86 y la presencia combinada de células B y T CD8⁺ estuvo asociada con supervivencia prolongada de los pacientes (223).

Algunos estudios sugieren que las células B podrían actuar como verdaderas asesinas de células tumorales a través de la expresión de granzima B y TRAIL (224) o incluso de manera dependiente de FasL (225).

7.3 Células NK

Las células NK se han descrito como otra de las principales poblaciones del sistema inmunitario capaces de mediar respuestas antitumorales. Estas células expresan una amplia variedad de receptores (incluyendo receptores activadores, inhibidores, moléculas de adhesión y receptores de citoquinas) que les permiten identificar las células tumorales y discriminarlas de las normales. La integración de esas señales determina si las células NK llegan a ser activadas y eliminan o no a su objetivo. Los dos mecanismos más importantes de reconocimiento de las células tumorales por las células NK son la disminución de expresión de moléculas HLA de

clase I la expresión de ligandos inducidos por estrés de los receptores de activación de las células NK (por ejemplo, MICA o MICB que se unen a NKG2D) en las células tumorales.

Las células NK se pueden dividir en varias subpoblaciones con diferentes funciones basadas en la expresión de marcadores de superficie CD16 y CD56. Estos grupos son: 1) células NK CD56^{bright} CD16⁻; 2) células NK CD56^{bright} CD16^{dim}; 3) células NK CD56^{dim} CD16⁻; 4) células NK CD56^{dim} CD16^{bright}; 5) células NK CD56⁻ CD16^{bright}. En general, las células NK CD56^{bright} son células con una capacidad citotóxica baja y producen quimioquinas y citoquinas con una actividad inmunoreguladora. Por el contrario, las células NK CD56^{dim}, son las mayoritarias en sangre periférica y las que mayor actividad citotóxica presentan, contienen más cantidad de perforinas, granzimas y gránulos citolíticos. Además, las células NK CD56^{dim} presentan una mayor proporción de receptores inhibidores, como distintos receptores KIR, ILT2 y CD94/NKG2A. El repertorio de receptores de quimioquinas también es diferente. Las células NK CD56^{bright} son las únicas que expresan CCR7 y producen CXCR3 en una densidad mayor que las células NK CD56^{dim}. Sin embargo, estas últimas expresan CXCR1 y CX₃CR1 exclusivamente. La consecuencia de ese diferente repertorio de receptores de quimioquinas es que presentan diferentes propiedades de migración: las CD56^{bright} migran hacia órganos linfoides mientras que las CD56^{dim} migran hacia sitios de inflamación aguda (226).

El impacto pronóstico de la infiltración por células NK ha sido estudiado en algunos tumores y un aumento en su densidad se ha asociado con un resultado clínico favorable. Esta asociación se ha observado en cáncer colorrectal (47), gástrico (227), esofágico (228) y NSCLC (213).

Sin embargo, otros estudios en NSCLC y mama no han encontrado ninguna asociación entre el infiltrado de células NK y prognosis donde mostraron un fenotipo inhibitor y disminuyeron las capacidades funcionales (229). Se necesitan más estudios de impacto pronóstico asociado a la infiltración de células NK.

7.4 Macrófagos asociados a tumor.

Debido a su papel fisiológico en la amplificación de la cascada inflamatoria no sería un error creer que la infiltración por macrófagos en el tumor podría estar asociada a una prognosis pobre en cánceres humanos. De hecho, varios estudios han encontrado que el resultado clínico asociado con el número de macrófagos asociados a tumor depende del tipo de tumor. Algunos estudios han reportado que un aumento de las densidades de esta población está asociado con resultado clínico favorable en cáncer colorrectal (230), NSCLC (231) y próstata (232). Por el

contrario, otros estudios han mostrado una asociación con mal pronóstico en melanoma (233), vejiga (234) y NSCLC (235).

Los macrófagos pueden provenir de dos fuentes: de monocitos de sangre procedentes de médula ósea o macrófagos residentes de tejido originados a partir de precursores del saco vitelino (236). La mayoría de estudios argumentan que los macrófagos infiltrados en el tumor proceden de monocitos de sangre periférica reclutados por el tumor a través de la quimioquina CCL2 (237). En el caso de los monocitos, después de llegar al tumor sufren un proceso de maduración específica, en los que se producen cambios en la expresión de marcadores de superficie como Ly6C y moléculas de MHC de clase II. Los monocitos Ly6C⁺ entran al sitio de inflamación y aumentan en tamaño y granulosidad y secuencialmente se convierten en macrófagos que expresan MHC de clase II (294) (Figura 10).

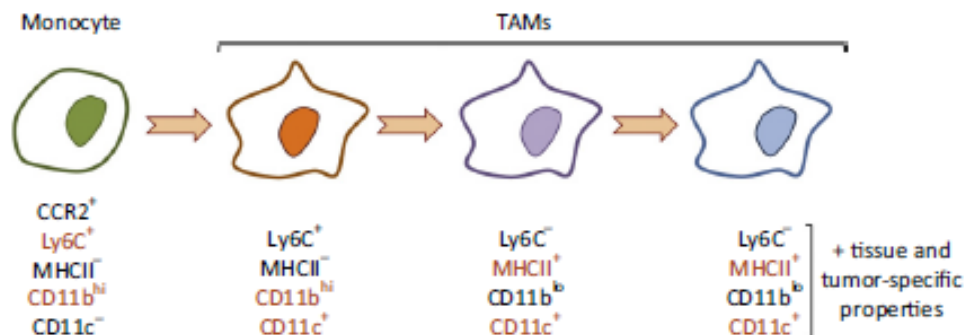


Figura 10. Modelo esquemático del desarrollo de macrófagos asociados a tumor (TAMs). Monocitos CCR2⁺ y Ly6C⁺ entran en el tejido tumoral y sufren una serie de cambios funcionales y fenotípicos, incluyendo cambios de expresión de marcadores de superficie como la pérdida de Ly6C y la adquisición de MHC de clase II. *Imagen adaptada de Ostuni et al. Trends in Immunology, 2015, 36: 229-239.*

El desarrollo de los macrófagos asociados a tumor depende de las señales producidas por el microambiente tumoral. Estas señales pueden ser clasificadas en tres categorías dependiendo del proceso biológico del que proceden: respuesta inmunitaria en la zona tumoral, muerte de células tumorales y metabolismo de las células tumorales. Respecto a las señales derivadas de la respuesta inmunitaria, existen varios factores que controlan el desarrollo de macrófagos asociados a tumor que coinciden con las que conducen a la activación de macrófagos como IL-10, IL-4, IL-13 y TGF-β. La mayoría de esas señales son producidas por células inmunitarias infiltradas en el tumor e influye en la función de los macrófagos a través de diferentes rutas (Figura 11). Por ejemplo, las inmunoglobulinas procedentes de células B se ha mostrado que pueden producir activación alternativa de los macrófagos adquiriendo un fenotipo protumoral potenciando la progresión neoplásica y el desarrollo del tumor. Las citoquinas proinflamatorias

se ha visto también que pueden conferir fenotipos protumorales a los macrófagos del tumor. Por ejemplo IFN- γ , en sí mismo, puede provocar la producción de enzimas inmunosupresoras como NOS2 e IDO (237). Las células estromales también son una fuente importante de producción de señales que controlan las funciones de los macrófagos asociados a tumor. Se conoce que los tumores estimulan la mielopoyesis a través de la producción de factores de crecimiento y supervivencia para macrófagos y granulocitos como M-CSF, GM-CSF, y G-CSF (también conocido como CSF-1, CSF-2, and CSF-3, respectivamente) (238).

La muerte de células tumorales espontánea o producida por terapias contra el cáncer se ha asociado con la liberación de señales de peligro dentro del microambiente tumoral. Estas señales son captadas por células inmunitarias incluidos los macrófagos del tumor que pueden estimular respuestas antitumorales. La exposición en superficie de calreticulina, secreción de ATP y liberación de HMGB1, una proteína de la cromatina no histónica, por células tumorales provoca la activación de la inmunidad innata de células dendríticas vía inflamasoma o la ruta de TLR4 (238).

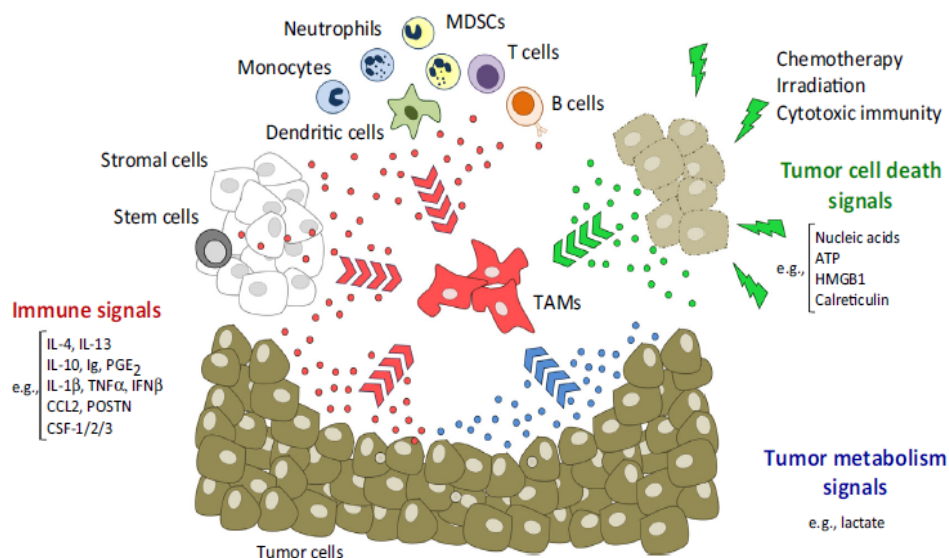


Figura 11. Señales ambientales que controlan el fenotipo de los macrófagos asociados a tumor (TAMs). Las señales procedentes del sistema inmunitario (en rojo) son determinantes en la polarización de los macrófagos; incluye citoquinas, quimioquinas y otras moléculas reguladoras liberadas en la zona tumoral por células inmunitarias infiltrantes así como células tumorales o las propias células tumorales. Las señales derivadas del metabolismo de las células tumorales (en azul) como lactato, un producto de la glicolisis aerobia, puede también controlar la adquisición de propiedades protumorales en los macrófagos. Finalmente, las señales de peligro (en verde) liberadas en el espacio extracelular tras la muerte celular tumoral espontánea (por tumores inmunogénicos) o provocada por terapia pueden activar y estimular las funciones proinflamatorias en los macrófagos. Abreviaciones: MDSCs: células mieloides supresoras, TAMs: macrófagos asociados a tumor. . *Imagen adaptada de Ostuni et al. Trends in Immunology, 2015, 36: 229-239.*

Respecto a las señales derivadas del metabolismo tumoral, el microambiente tumoral es típicamente hipóxico y caracterizado por una concentración de lactato (Figura 11). Altos niveles de ácido láctico en el tumor son debidos al efecto Warburg, es decir, el cambio metabólico que ocurre en células que proliferan altamente que convierten la glucosa en lactato aún en presencia de oxígeno. Este modelo de producción de energía, se piensa que apoya el crecimiento tumoral a través de la producción de intermediarios metabólicos que actúan como precursores de las rutas biosintéticas y difiere marcadamente de las células normales que utilizan la oxidación mitocondrial del piruvato generado por glicolisis. Recientes estudios señalan que las señales metabólicas del tumor pueden afectar al fenotipo y función de los macrófagos asociados a tumor. Se ha descrito que el ácido láctico induce en macrófagos la expresión de *Vegf* y *Arg1*, genes conocidos como protumorales. La expresión de *Vegf* es típicamente controlada por el factor de transcripción HIF1 α , que es estabilizado en respuestas a baja concentración de oxígeno. La expresión de *Arg1* puede ser provocada también por HIF1 α bajo condiciones hipóxicas e identificar otra modalidad de ARG1 en macrófagos asociados a tumor distinta de la conocida a través de IL-4 o IL-3 (238).

La asociación heterogénea entre las densidades de los macrófagos asociados a tumor y el resultado clínico dentro de diferentes tumores podría reflejar la plasticidad de esta población. Un papel protector en la tumorigénesis ha sido propuesto para macrófagos M1 a través de mecanismos que incluyen la activación de respuesta Th1 y por antagonismo de actividades supresoras de células inmunitarias reguladoras, mientras que macrófagos M2 se ha mostrado que promueven el crecimiento tumoral, invasión, metástasis, remodelación estromal y angiogénesis (238).

La ausencia de marcadores específicos de las dos subpoblaciones de macrófagos M1/M2 ha sido el principal obstáculo en la evaluación del resultado clínico de cada subtipo. Hasta la fecha se ha estado usando CD11c y NOS2 para identificar macrófagos tipo M1 y CD163, CD204 o CD206 para identificar macrófagos tipo M2. Parece ser que un aumento de densidad de macrófagos asociados a tumor M1 está asociado con resultado clínico favorable en NSCLC (239), mientras que los macrófagos M2 están asociados a mal pronóstico en varios tumores, incluido NSCLC (240).

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La utilización de la inmunoterapia antígeno-específica frente a puntos de control inmunitario en el cáncer ha representado uno de los avances en biomedicina más importantes en los últimos años. Sin embargo, la experiencia clínica demuestra que existe una enorme variabilidad en la respuesta clínica de los pacientes con un porcentaje significativo que no se benefician de este tipo de terapias. Hasta el momento, los factores de predicción de respuesta no están del todo aclarados y han sido propuestos entre otros, la carga de mutaciones relacionada con la aparición de neoantígenos, la expresión de PD-L1 en el tejido tumoral y el patrón de reacción inmunitaria (immunoscore). Sin embargo, ninguno de estos factores ha sido capaz de predecir de forma satisfactoria la respuesta de los pacientes. En este sentido, otros mecanismos genéticos y no genéticos necesariamente deben de estar implicados. Nuestra HIPOTESIS de trabajo establece que entre estos factores deben de estar aquellos que contribuyen de forma natural al escape inmunológico. En este proyecto queremos estudiar los mecanismos de evasión intrínsecos de la célula tumoral que conducen a una baja inmunogenicidad. Paralelamente, vamos a estudiar la naturaleza de la composición del infiltrado inflamatorio pre-existente en el tumor (*“immunoscore”*, immunecontexto) y el patrón estromal que pueden también arrojar luz a las diferencias observadas en los pacientes.

2. Objetivos

OBJETIVO PRINCIPAL: Analizar e identificar cambios en las células tumorales o en el microambiente tumoral que puedan explicar la evolución clonal del cáncer de pulmón no microcítico en un contexto de inmunoevasión. Evaluar así mismo, si estas alteraciones podrían explicar la ausencia de respuesta de los pacientes sometidos a inmunoterapia antígeno-específica.

Los objetivos ESPECÍFICOS de este estudio son los siguientes:

- **Estudio de las características inmunogénicas del tumor en cáncer de pulmón.** Para ello se estudiará la expresión de moléculas HLA de clase I y II en el tumor utilizando anticuerpos frente a cadena pesada HLA-A,B,C (clase I) y HLA-DR (clase II); y cadena ligera (β 2-microglobulina, HLA clase I). También se analizará la expresión de PD-L1 en el tumor.

- **Estudio del microambiente tumoral.** Se realizará un estudio de las diferentes poblaciones implicadas en la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa utilizando marcadores linaje específicos y otros que definen el estado funcional de las células. Este análisis se llevará a cabo mediante el uso conjunto de técnicas inmunohistoquímicas y de citometría de flujo.
- **Estudio de los mecanismos de inmunoescape tumoral.** A partir de los objetivos anteriores se profundizará en el estudio de los mecanismos de escape tumoral de la respuesta inmunitaria y analizar la posibilidad de revertir la resistencia a los mecanismos de citotoxicidad.

V. METODOLOGÍA

V. METODOLOGÍA

El estudio consiste en un doble análisis en paralelo en el que por un lado las muestras de tumores de pulmón de los pacientes son analizadas en fresco mediante técnicas de citometría de flujo y por otro lado son congeladas y analizadas mediante técnicas de inmunohistoquímica. Ambas técnicas tienen como objetivo analizar la expresión de moléculas HLA de clase I en tumores y estudiar el infiltrado de células del sistema inmunitario.

1. Pacientes y muestras.

Se analizaron un total de 77 muestras de pacientes con NSCLC. Se obtuvieron un total de 57 varones y 20 mujeres con un rango de 46-82 años con una edad media de 66 años. Las muestras procedieron del Biobanco de tumores del Hospital Virgen de las Nieves (Granada) y del Complejo Hospitalario Universitario de La Coruña. Las muestras recién extraídas de cada uno de los pacientes fueron procesadas y analizadas. Se obtuvieron 3 muestras por cada paciente: una muestra se adquirió de la zona tumoral, otra muestra se cogió de la zona adyacente al tumor representando una zona de aspecto macroscópicamente no tumoral, obtenida a 1 cm de distancia de la zona tumoral, y la tercera muestra corresponde con tejido pulmonar no neoplásico del paciente. Cada paciente tenía apareada una muestra de sangre periférica. Las características de los pacientes se muestran en la Tabla 1. Se usó como grupo control la sangre periférica de 54 pacientes, un total de 36 varones y 18 mujeres con un rango de edad 45-80 años con una media de edad de 65 años. Para las muestras de sangre se aprovechó la muestra del excedente del tubo de hemograma de la analítica de rutina realizada a los pacientes. Las muestras de sangre periférica fueron extraídas por el personal de Enfermería, en tubos de EDTA. Las muestras de tejidos fueron remitidas inmediatamente al laboratorio clínico y conservadas y registradas en el Banco de Tumores de nuestro Hospital. Antes del estudio, todas las secciones tumorales fueron revisadas por un oncólogo y un patólogo. Los pacientes fueron informados de la naturaleza del estudio mediante una hoja de consentimiento informado. En todo caso, en las distintas fases del estudio se respetará lo establecido por la Ley 14/2007 de 3 de Julio sobre investigaciones Biomédicas y se han mantenido la confidencialidad de todos los datos de carácter personal (ley Orgánica 15/1999 de protección de datos de carácter personal) quedando anonimizadas en la base de datos central.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes NSCLC y controles.

| Características clínicas | NSCLC N=77 | Controles N=54 |
|---------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Sexo | | |
| Varones | 57 (74%) | 36 (67%) |
| Mujeres | 20 (26%) | 18 (33%) |
| Edad media | 66 (46-80) | 65 (45-80) |
| Historia fumadora | | |
| Fumador | 66 (86%) | |
| No Fumador | 11 (14%) | |
| T. Neoadyuvante | | |
| Sí | 7 (9%) | |
| NO | 70 (91%) | |
| TNM | | |
| Tumor primario (T) | | |
| T1 | 22 (29%) | |
| T2 | 45 (58%) | |
| T3+T4 | 10 (13%) | |
| Afectación linfática (N) | | |
| N0 | 59 (77%) | |
| N1+N2 | 16 (23%) | |
| Estadio tumoral | | |
| I | 40 (52%) | |
| II+III | 37 (48%) | |
| Diferenciación | | |
| Bien/moderado | 46 (60%) | |
| Pobre | 31 (40%) | |
| Histología | | |
| Epidermoide | 36 (47%) | |
| Adenocarcinoma | 39 (51%) | |
| Carcinoma de células grandes | 2 (2%) | |

2. Estudio de citometría de flujo.

2.1 Procesamiento de las muestras.

Cada una de las muestras fue procesada inmediatamente tras su obtención en quirófano. Una vez embebidas en PBS se pasaron a unos tubos de procesamiento MACS™ Tubes (miltenybiotec), Alemania y a continuación se disgregaron usando un disociador Gentle MACS

Dissociator Milteny Bioted, Betgish Gladbach, Alemania. Cada muestra fue procesada 2 veces y posteriormente se filtraron usando unos filtros de tubos Falcon (Falcon BD Bioscience, San José, USA). A continuación se centrifugaron durante 5 minutos a 2000rpm. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en unos 100 µl de PBS. A continuación, 20 µl de la suspensión celular de cada una de las muestras (tejido tumoral, tejido adyacente al tumor, tejido no neoplásico y sangre periférica) se añadieron a los tubos preparados con los anticuerpos específicos para cada una de las subpoblaciones linfocitarias. Una vez incubada la suspensión celular con los anticuerpos se añadieron unas gotas de tampón de lisis (CINH4) para eliminar los hematíes y se dejó incubando a temperatura ambiente durante unos 20 minutos. Después de incubar se le añadió 1ml de tampón de lisis y pasados unos 10 minutos se adquirieron en un citómetro (Becton Dickinson FACS Canto™ II) para medir el porcentaje de las diferentes subpoblaciones linfocitarias usando el software Facsdiva. El análisis de las diferentes subpoblaciones celulares se realizó a través del software Infinicyt V 1.6.

2.2 Anticuerpos monoclonales.

Se utilizó un amplio panel de anticuerpos monoclonales específicos para marcadores de superficie usados en la identificación de las distintas subpoblaciones linfocitarias: anti-CD57-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-Percep, anti-CD45RO-Pecy7, anti-HLA-DR-APC, anti-CD3-Pacific Blue (V450), simultest anti-CD4-FITC/anti-CD25-Pecy7/anti-CD127-APC, anti-CD20-PE, anti-CD20-Pacific Blue (V450), pack anti-CD3-APC-H7, anti-CD56-PE, antiCD16-FITC, anti-CD45-Amcyam (V500), anti-EPCAM-Percep, anti-CD64-FITC, anti-CD11b-PE, anti-CD14 FITC, anti-CD33-Percep, anti-CD39-PE, anti-NKp46-Pecy-7, anti-NKG2D-Percep, anti-CD161-APC (BD Bioscience, San José, California, USA) y anti-HLA-ABC-APC (eBioscience, San Diego, CA). El volumen usado de cada monoclonal para cada tubo con las diferentes muestras (tumor, adyacente al tumor, no neoplásica y sangre periférica) fue de 5 µl para todos los monoclonales.

2.3 Selección de las diferentes subpoblaciones celulares

Las diferentes subpoblaciones inmunitarias se obtuvieron de la siguiente manera. A partir del grafico SSC-A vs CD45 se seleccionó la nube de puntos como se muestra en la Figura 12, que corresponde a los leucocitos. A partir de ahí, se abrieron nuevas ventanas (estrategia de “gating”) donde se mostraron los marcadores CD3, para la población de linfocitos T (Th CD4⁺ y Tc CD8⁺), y una combinación de CD56 y CD3 (CD56⁺ CD3⁻) para células NK. En las poblaciones de células T tanto CD4⁺ como CD8⁺ se analizaron las células T activadas (DR⁺) y

de fenotipo memoria ($CD45RO^+$). Se analizaron también las diferentes subpoblaciones de células NK según su fenotipo. En este caso, a partir de la ventana con las células NK identificadas ($CD56^+ CD3^-$), se abrió una nueva ventana con los marcadores CD56 y CD16. La combinación diferente de estos marcadores definieron las diferentes subpoblaciones de células NK, que se definieron como sigue: $CD56^{bright} CD16^-$, células NK de fenotipo no citotóxico; y $CD56^+ CD16^+$, células de fenotipo citotóxico y maduras. A partir del total de células NK se analizó también la expresión de marcadores de activación de células NK como NKp46, NKG2D y CD161, y el porcentaje de células positivas para esos marcadores se analizó sobre el total de células NK (Figura 13).

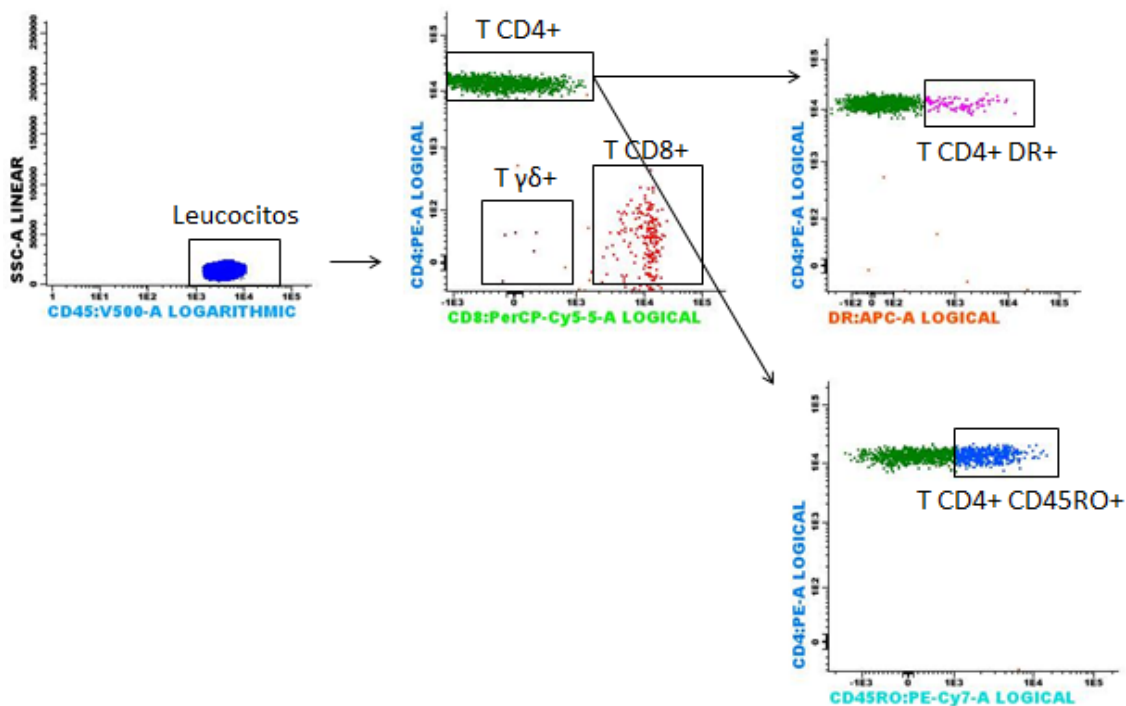
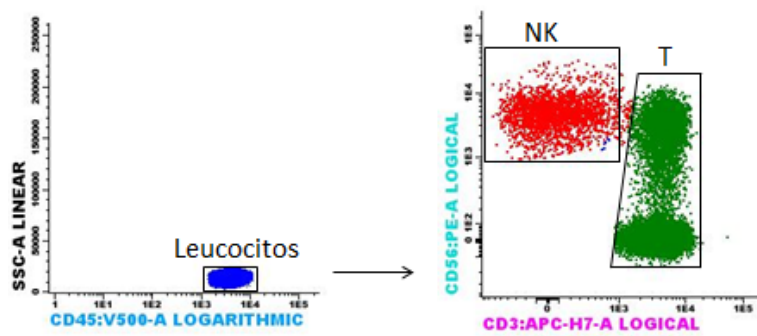


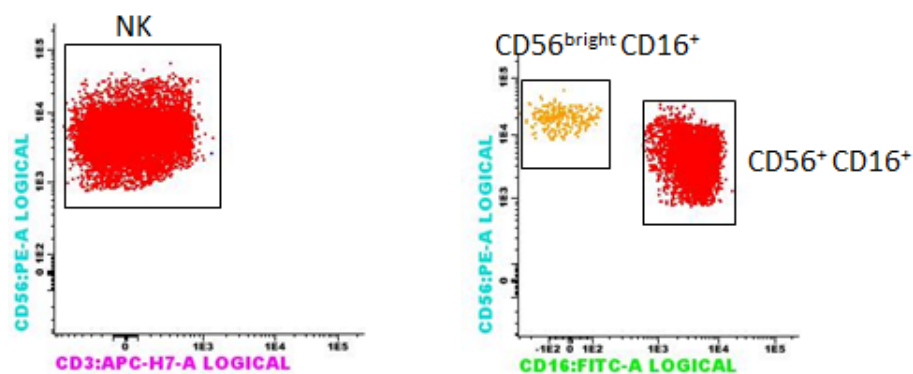
Figura 12. Representación de la selección de subpoblaciones linfocitarias. Diagramas de citometría de flujo en el que se representa la selección de las diferentes subpoblaciones linfocitarias: a partir del diagrama SSC-A vs CD45 que representa los leucocitos se abrió una nueva ventana con los marcadores CD4 vs CD8 para identificar las poblaciones de células T $CD4^+$, $TCD8^+$ y $T\gamma\delta^+$. A partir de CD4 se abrieron nuevas ventanas con marcadores CD4 vs DR y CD4 vs CD45RO para identificar las subpoblaciones de células T $CD4^+$ activadas y de fenotipo memoria, respectivamente. La misma estrategia se utilizó para identificar los linfocitos T $CD8^+$ activados y de fenotipo memoria (no mostrado en la figura).

Otro tipo celular analizado fueron los monocitos. Estos fueron identificados a partir del diagrama que representa el tamaño y la complejidad celular (SSC-A vs FSC-A). A partir de ahí, se abrió una nueva ventana mostrando marcadores CD14 vs HLA-DR. Los monocitos fueron identificados como $CD14^+$ y se midió la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la expresión de HLA-DR (Figura 14).

A



B



C

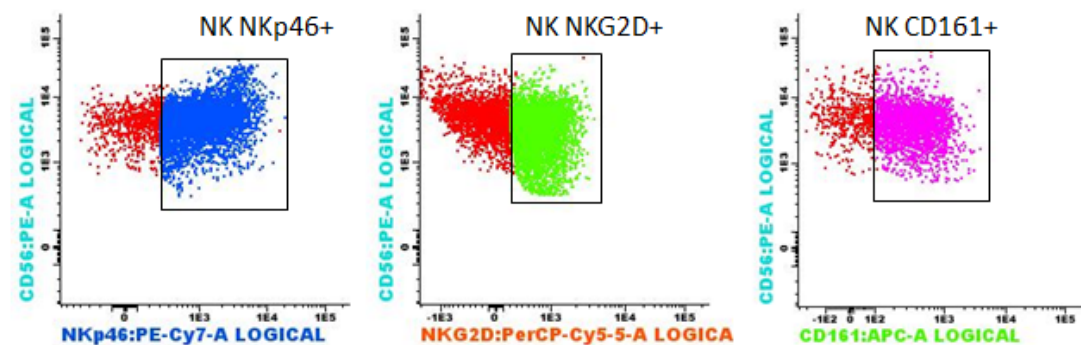


Figura 13. Selección de las diferentes subpoblaciones de células NK. **A)** Selección de células NK y T. A partir del diagrama de los leucocitos, se abrió una nueva ventana mostrando la combinación de marcadores CD56 y CD3 para identificar las células NK ($CD56^+ CD3^-$) y células T ($CD3^+$). **B)** Selección de las diferentes subpoblaciones de células NK en función de la expresión de los marcadores CD56 y CD16: NK $CD56^{bright} CD16^-$ de fenotipo no citotóxico y NK $CD56^+ CD16^+$ de fenotipo citotóxico. **C)** Selección de las diferentes subpoblaciones de células NK según marcadores de activación. A partir del diagrama de las células NK se abrieron sucesivas ventanas para mostrar las células $NKp46^+$, $NKG2D^+$ y $CD161^+$. Estas subpoblaciones se expresaron sobre el porcentaje total de células NK.

3. Estudio de inmunohistoquímica

En el estudio de inmunohistoquímica se analizaron sólo las muestras de tejido tumoral. Un total de 77 muestras de NSCLC fueron analizadas, 60 criopreservadas y 17 embebidas en parafina. Los especímenes incluyen 36 carcinomas epidermoides, 39 adenocarcinomas y 2 carcinomas de células grandes basados en los criterios de clasificación histopatológica de la Organización Mundial de la Salud (241). Los tumores se clasificaron en fase I (n=40), y fase II y III (n=37) basada en American Joint Committee on Cancer (AJCC) guidelines for postsurgical, Tumor-Node-Metastasis (TNM) (242).

Las muestras tumorales fueron cogidas de tumores malignos primarios de pulmón por excisión de un fragmento de masa tumoral. Tras la toracotomía y la resección de pulmón la mitad de la pieza fue congelada a -80°C . Se cortaron secciones de tejido tumoral congelado de un espesor de $4\text{-}8\mu\text{m}$ con un microtomo criostático (Bright), se secaron a temperatura ambiente durante 4-18h, se fijaron en acetona a 4°C durante 10min y se conservaron a -40°C hasta tinción. La otra mitad de la pieza fue fijada en formalina neutral al 10% y embebida en parafina. Secciones de tejido de unos $4\mu\text{m}$ fueron montadas en portas pretratados.

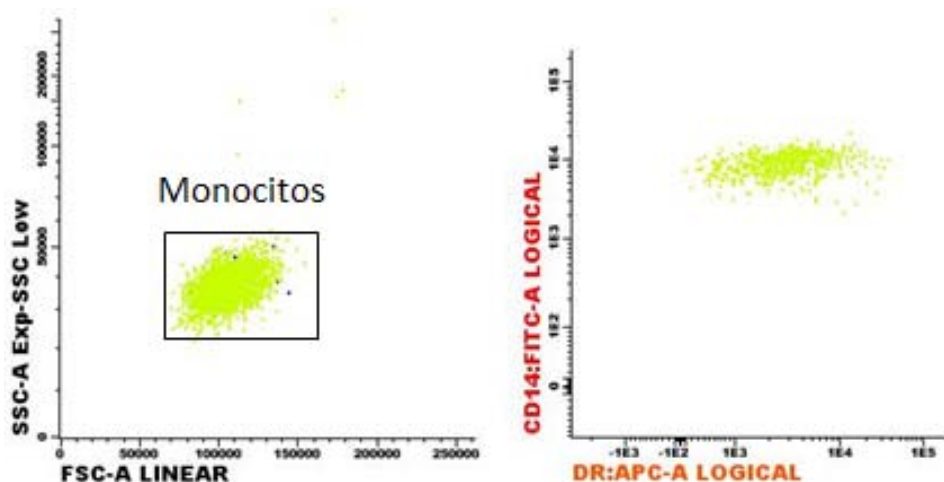


Figura 14. Selección de la población celular de monocitos. Los monocitos fueron identificados como CD14+ a partir del diagrama que representa los monocitos según tamaño y complejidad celular (SSC-A vs FSC-A). En los monocitos se midió la IMF de la expresión de DR.

Para la realización de las técnicas de inmunohistoquímica se utilizó el sistema Biotina-Estreptavidina (supersensitive Multilink HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, Holanda). Para las muestras criopreservadas, primero se incubaron con bloqueo de proteínas durante 5 min. Después se enjuagaron y se lavaron con PBS y permanecieron en PBS durante 10 minutos.

Después se secaron con cuidado sin tocar el tejido y se procedió a añadirle los anticuerpos. Se utilizaron anticuerpos para estudiar la expresión de HLA de clase I: W6/32 que reconoce el complejo cadena pesada HLA A,B,C- β 2 microglobulina (un regalo del Dr. Bodmer Imperial Cancer Research Fund Laboratories, Londres, UK); GRH-1 que reconoce la cadena β 2 microglobulina libre y asociada a la cadena pesada de HLA clase I producida y caracterizada en nuestro laboratorio; HC10 contra la cadena pesada libre de moléculas HLA-B y HLA-C; anti-HLA-A que reconoce un conjunto de productos génicos codificados por el locus HLA-A y 42IB5 contra productos génicos codificados por el locus HLA-B. También se estudió la expresión de moléculas de HLA de clase II usando GRB-1, anticuerpo monoclonal que reconoce moléculas HLA-DR, producido y caracterizado en nuestro laboratorio.

Para evaluar la expresión de PD-L1 se usó el anticuerpo monoclonal anti PD-L1 (clona 22c3) y el kit IHC PD-L1 22C3 pharmDx (DAKO) siguiendo las recomendaciones del fabricante en secciones de 2,5 μ m usando el sistema EnVision FLEX (DAKO, Santa Clara, USA). Las secciones se secaron durante 24h a 37°C seguido de una hora de incubación a 60°C. La recuperación del antígeno se realizó usando el reactivo PT LINK (DAKO) a bajo pH. Las secciones inmunomarcadas se analizaron digitalmente usando el scanner Ultrafast 1.6 (Philips) y las imágenes se visualizaron y fotografiaron usando Intellisite Pathology solution Image Management System 2.4 (Philips). Las muestras tumorales se consideraron PD-L1 negativas cuando menos del 25% de las células se tiñeron positivamente. Clasificamos los tumores en 2 grupos: tumores PD-L1 negativos y tumores con expresión de PD-L1 positiva o heterogénea.

Para caracterizar el infiltrado tumoral se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales de ratón: GRT-2 (anti-CD45) que reconoce todos los leucocitos, producido en nuestro laboratorio. OKT3 (anti-CD3 ATCC, Teddington, UK), OKT8 (anti-CD8 ATCC), anti-CD45RO (clon UCHL1, Thermo Fisher), anti CD64 (clon 10.1 BD Biosciences), anti-CD206 (receptor de manosa de macrófagos, clon 19.2 BD Biosciences), anti-CD56 (clon123C3.Dako) y anti-FAP (Proteína de Activación de Fibroblastos, clon F11-24, Merck Millipore). El anticuerpo primario fue remplazado por PBS para los controles negativos. No se detectó marcaje inmunohistoquímico en las preparaciones control. La cantidad usada de cada anticuerpo fue aproximadamente entre unos 25-50 μ l. Se dejó incubar con los anticuerpos durante 45 minutos a temperatura ambiente. A continuación se eliminó el exceso de anticuerpo, se lavó y se secó como anteriormente. Más tarde se añadió el bloqueo del anticuerpo primario durante 30 minutos. De nuevo se eliminó el exceso, se lavó y se secó. Posteriormente se añadió Streptavidina-Peroxidasa y se dejó incubar durante 30 minutos. Después se lavó con PBS durante 10 minutos de nuevo. A continuación se añadió Diaminobencidina más sustrato de diaminobencidina en una dilución 1:50. Se dejó incubando durante 5 minutos y se lavó con

PBS. A continuación se procedió a la tinción de los cortes con hematoxilina durante 30 segundos. Después se lavó con agua normal y se fue pasando por etanol de menor a mayor concentración del 50% hasta del 100% para deshidratar. Después se hizo pasar por xilol durante 30 segundos por tres veces. Por último se montó el cubre con la resina DPX. Destacar que durante los diferentes procesos de incubación, los portas con los cortes de los tejidos permanecieron en humedad en unas cubetas con agua para evitar que se sequen.

En las muestras de tejido embebidas en parafina se realizó un proceso de desparafinización a través de xilol y alcohol y se bloqueó la actividad peroxidasa endógena usando una solución de peróxido de hidrógeno durante 10 minutos. Para la recuperación del antígeno las secciones se trataron con un buffer de citrato de sodio (pH 6.0). Después se continuó la inmunohistoquímica siguiendo el mismo procedimiento que en las muestras de tejido criopreservadas. Para las muestras de parafina sólo se estudió la expresión de moléculas HLA de clase I usando los anticuerpos EMR8-5 contra cadena pesada HLA-ABC (clone ab70328, abcam), L-368 contra la cadena β -2 microglobulina (un regalo del Dr. Ferrone, Universidad de Harvard) y HC10 específico para cadena pesada libre HLA-B y C. Una vez desparafinados las secciones de tejido, la técnica inmunohistoquímica se continuó de forma similar a las muestras de tejido criopreservadas.

3.1 Estudio de la infiltración tumoral.

3 observadores independientes analizaron los infiltrados de los tejidos tumorales usando objetivos de 10x y 40x. El infiltrado tumoral se definió usando los anticuerpos monoclonales anti-CD45, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD45RO y anti-CD64 como sigue: 1) infiltración tumoral con linfocitos (TILs) y macrófagos junto con la infiltración estromal. Se observaron TILs en estrecho contacto con las células epiteliales neoplásicas (20-70 TILs por campo a objetivo de 40x) y 2) infiltración estromal (el infiltrado inflamatorio sólo encapsula la masa tumoral, sin penetrar en ella permaneciendo en el estroma del tejido). La infiltración global por células positivas para CD45, CD3, CD8, CD45RO y CD64 fue evaluada en 5 campos diferentes bajo el objetivo de 40x y puntuado como: + (≤ 30 células/campo), ++ (30-70 células/campo) +++ (70-120 células/campo) y ++++ (≥ 120 células/campo). Para cada muestra tumoral criopreservada se calculó la puntuación (1-4) para cada marcador: (CD45, CD3, CD8, CD45RO y CD64) dando un punto por cada cruz asignada (+) para el correspondiente análisis estadístico.

Las subpoblaciones de macrófagos fueron estudiadas usando anticuerpos monoclonales frente CD64 (M1 o marcador de macrófagos inflamatorios) y CD206 (M2 o marcador de macrófagos inmunosupresores). Las secciones de tejido marcadas con ambos anticuerpos fueron

escaneadas usando el scanner Panoramic MIDI Scanner (3DHISTECH). Para cada muestra tumoral las subpoblaciones M1 y M2 fueron cuantificadas en 5 campos diferentes por dos observadores independientes usando Viewer MIDI software y objetivo de 40x y, consecuentemente, la ratio M1/M2 fue calculada en cada caso. De igual manera, las muestras marcadas para CD8 fueron escaneadas y se contaron el n° de células por campo de 40x dentro del nido tumoral (TILs), realizando 5 observaciones para cada muestra y se hizo la media para comparar en los diferentes grupos de expresión de HLA-I.

4. Aislamiento de ADN y microdissección.

Las secciones de tejido criopreservado de 4–8- μ m de espesor, fijadas en 70% etanol y teñidas con una solución de azul de toluidina 0.05% w/v fueron microdisectadas usando un micromanipulador (PALM MicroLaser Systems, ZEISS). Los fragmento microdisectados fueron recogidos en tapones adhesivos PALM. Se aisló el ADN del tumor de los fragmentos microdisectados usando el kit QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, Holanda). En todos los casos se obtuvo ADN autólogo normal de linfocitos de sangre periférica (PBLs) usando también el kit de aislamiento de DNA QIAGEN DNA siguiendo las indicaciones del fabricante.

5. Estudio molecular de las muestras tumorales.

El ADN y ARN obtenido de tumores HLA-I negativos y controles (PBLs) fueron evaluados mediante análisis de secuenciación del gen $\beta 2$ -microglobulina, tipaje genómico de HLA-I, pérdida de heterocigosidad (LOH) y estudio de expresión génica por RT-PCR a tiempo real.

5.1 Secuenciación del gen $\beta 2$ -microglobulina

El ADN de los tumores fue usado para la secuenciación del exón 1 y 2 del gen $\beta 2$ -microglobulina. Los “primers” usados para la amplificación fueron para el exón 1 los siguientes: B2-1Fw 5'-TGCAGGTCCGAGCAGTTAAC-3' y B2-1Bw 5'-CAGAGCGGGAGGGTAGGAGA-3'; Exon2: B2-C (Fw) 5'-CGATATTCCTCAGGTACT-3' y B2-NC (Bw) 5'-CAACTTTCAGCAGCTTAC-3'. El producto de PCR se purificó usando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN Wetsburg, Leusden, Holanda). La secuenciación se realizó usando Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) y los mismos “primers” que en la reacción de amplificación. La purificación de la reacción de secuenciación se realizó usando el kit DyeEx 2.0 Spin (QIAGEN) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se usó el software ABI 3130x/Genetic Analyzer and Sequencing Analysis v5.2 (Applied Biosystem) para los análisis.

5.2 Tipaje genómico tumoral de HLA de clase I.

El ADN aislado de células tumorales microdisectadas y de células autólogas se usó para llevar a cabo el tipaje genómico de HLA de clase I con los kits LIFECODES HLA-A, B y C Typing Kits – Rapid (IMMUCOR, Stanford, EE.UU) siguiendo las instrucciones del fabricante. El sistema Luminex 100/200TM, basado en la tecnología xMAP (Luminex®, Austin, Texas, EEUU), se usó para analizar el tipaje de HLA de clase I, y consecuentemente, para detectar pérdida de haplotipo, locus o alélica en genes HLA de clase I en muestras tumorales comparado con el tipaje de HLA normal en linfocitos de sangre periférica.

5.3 Analisis de pérdida de heterozigosidad (LOH) en ADN de tejido tumoral

Para confirmar los resultados obtenidos del tipaje HLA también se analizó la región de microsatélites que rodea a la región de HLA de clase I. Se determinó el estado de heterozigosidad de marcadores de microsatélite específicos asociados con la región HLA del cromosoma 6 (6q21) (*D6S105*, *D6S265*, *D6S276*, *D6S291*, *D6S473*) y del gen *β2-microglobulina* en el cromosoma 15 (15p21) (*D15S126*, *D15S153*). Estos marcadores de microsatélites se amplificaron de ADN de tumores microdisectados y de PBLs normales autólogos. El extremo 5' de cada "primer" del conjunto de "primers" fue marcado con un marcador fluorescente (Applied Biosystems). Se empleó una estrategia de múltiples PCRs para la combinación de varios marcadores (usando diferente marcaje) usando una concentración de 10pmol de cada "primer" (forward y reverso).

El análisis de LOH se determinó usando ABI 3130x/Genetic Analyzer con 16 capilares y el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). Se consideró ser una prueba LOH-positiva en caso de una reducción de la señal de más de un 25% en el marcador de microsatélites. Estos análisis de datos fueron descritos previamente (243).

5.4 Estudio de expresión génica por RT-PCR

En el estudio de expresión génica se usaron 5 muestras tumorales HLA clase I negativas y 8 muestras de PBLs (Controles). El ARN tumoral se extrajo de los fragmentos microdisectados usando el kit was miRNeasy Mini (QIAGEN) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. El ARN normal se aisló de muestras de PBLs usando también el kit de aislamiento de ARN QIAGEN. La síntesis del ADN complementario (cDNA) se realizó con el kit iScript cDNA Synthesis (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de RT-PCR se analizaron para la expresión de $\beta 2$ -microglobulina, genes cadena pesada de HLA, componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) como TAP1, TAP2, Tapasina, LMP2, LMP7, Calnexina, Calreticulina y el gen regulador *NLRC5* por PCR a tiempo real cuantitativa (Q-PCR). Todas las reacciones se realizaron usando el sistema 7500 Fast Real-time PCR usando TaqMan PCR master mix y “primers” específicos de Applied Biosystems (UK). Los niveles de expresión final de los genes objetivo en muestras tumorales y controles se dieron relativos a los niveles de expresión del gen β -Glucuronidasa (*GUSB*) para controlar las variaciones en las cantidades de ARNm.

6. Estudio de líneas celulares de cáncer de pulmón

Se obtuvieron 6 líneas de cáncer de pulmón que fueron las siguientes: A-427 (carcinoma epidermoide), A-549 (adenocarcinoma), SKLU-1 (adenocarcinoma), SKMES, (adenocarcinoma) CALU-1 (carcinoma epidermoide) y CALU-6 (carcinoma de células grandes). Las líneas fueron cultivadas en nuestro laboratorio en RPMI 1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) con 10% de suero bovino fetal inactivado por calor a 37°C a una atmósfera del 5% de CO₂. Todas las líneas celulares se obtuvieron de la American Type Tissue Collection. Las líneas celulares se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% FBS (Life Technologies), 2 mmol/L glutamina (Sigma-Aldrich), y antibióticos. En algunos experimentos, las líneas celulares se trataron con 100 U/mL IFN- γ durante 48 horas (Sigma-Aldrich). Tras incubación, las células fueron cosechadas por tratamiento EDTA-PBS y preparadas para citometría de flujo.

Para el análisis de HLA y PD-L1 se usó los anticuerpos monoclonales APC-Nu-TH/I (anti-CD274, BD) y PE-W6/32 (anti-HLA, e-Bioscience). Las células se incubaron con los anticuerpos primarios durante 30 min a 4 °C y se analizaron por un citómetro FACSCanto (BD Biosciences). Se usó como control de isotipo Igs G de ratón conjugadas con FITC, PE, o APC. Debido a que todas las líneas celulares testadas expresaron antígenos de HLA-I los resultados se expresaron como media de fluorescencia. Se establecieron 2 grupos de líneas: cada una de las líneas celulares que fueron tratadas con IFN- γ constituyen un grupo y el otro grupo no fue tratado. Se midieron los niveles de expresión por citometría de flujo de HLA-I y PD-L1 basales (primer grupo) y tras inducción con IFN- γ (segundo grupo). Además, se obtuvo ADN y ARN de cada una de las líneas celulares con o sin tratar. El estudio molecular fue desarrollado de manera similar al del estudio de inmunohistoquímica, pero en este caso no se realizó estudio de LOH porque no se tenía muestra control de sangre para comparar con las líneas celulares. Se realizó tipaje genómico HLA de clase I y II con el ADN extraído, y con el ARN se realizó un estudio RT-PCR a tiempo real siguiendo el mismo procedimiento anteriormente citado.

6.1 Análisis de hibridación genómica comparativa basada en array (array-CGH) en líneas celulares de cáncer de pulmón.

Las muestras de ADN procedentes de líneas celulares tumorales de pulmón y los controles se genotiparon usando la prueba Illumina Infinium en el ImmunoChip acorde al protocolo del fabricante, el cual detecta sobre 200.000 SNPs seleccionados basados en GWAS de enfermedades del sistema inmunitario. Los datos para el análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) y el análisis de del número de copias se obtuvo del software de estudio Illumina Genome con valores "theta" y "R". "Theta" representa la frecuencia del alelo B y "R" la de la intensidad de fluorescencia unida de ambos canales. Mientras "theta" puede interpretarse directamente para detectar LOH usando e.g. bcftools [PMID:26826718], "R" necesita compararse al standard para detectar regiones de número de copias perdidas o ganadas. Usamos los datos del immunoChip de 1632 muestras no relacionadas de ancestros europeos para obtener un valor medio de fluorescencia por prueba para crear un standard y consecuentemente obtener los Log-ratios. Una distribución Log-ratio alrededor de cero puede considerarse como número de copias (CN) neutral, mientras que los intervalos cromosomales de log-ratios principalmente positivos (o negativos) pueden interpretarse como ganancia de CN (o pérdida). Los tramos cromosomales de las frecuencias de alelo B con valores de cero o uno pueden interpretarse como LOH.

7. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron usando el software IBM-SPSS Ver.21. Las variables con distribución normal se expresaron como la media y desviación estándar. Las variables que presentaron una distribución distinta a la normal se hizo con el rango promedio. Para comprobar la normalidad de las variables se usó el test de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de normalidad de las variables las diferencias entre los diferentes grupos se evaluaron usando el test T-Student. En el caso de no cumplir normalidad las variables, las diferencias entre los diferentes grupos se evaluaron usando el test no paramétrico U- Mann Whitney. Para evaluar diferencias entre más de 2 grupos en caso de normalidad se realizó un test de ANOVA y en caso de no cumplir normalidad se realizó un test de Kruskal Wallis. Las variables cualitativas (sexo, estadio tumoral, tipo histológico de tumor...) se analizaron usando el test Chi-cuadrado (χ^2) o test exacto de Fisher en caso de no cumplir las condiciones de validez. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas para una $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS (Artículos y Revisión)

The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration.

Francisco Perea¹, Mónica Bernal¹, Abel Sánchez-Palencia², Javier Carretero¹, Cristina Torres¹, Clara Bayarri², Mercedes Gómez-Morales³, Federico Garrido^{1,4,5} and Francisco Ruiz-Cabello^{1,4,5}

¹Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC Laboratorio Clínico; Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, ²Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, ³Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada, Granada, Spain, ⁴Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain, ⁵Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada, Granada, Spain.

RESUMEN

Objetivo: Nuestro objetivo en este estudio fue analizar si la expresión de HLA de clase I (HLA-I) influye en el patrón de infiltración de células inmunitarias y la reacción celular estromal en el microambiente tumoral. **Material y métodos:** Los tejidos tumorales obtenidos de 57 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón se analizaron para la expresión de HLA y el infiltrado leucocitario. **Resultados:** 28 de 57 pacientes fueron completamente negativos para la expresión de HLA-I (49.1%) o mostraron una pérdida de expresión selectiva del locus HLA-A (3 pacientes, 5.2%). En 26 de 57 tumores (47.8%) detectamos una expresión positiva de HLA-I pero con un porcentaje de células neoplasias tumorales entre el 10 y 25%. El fenotipo HLA-I negativo se produjo por una combinación de pérdida de haplotipo y una desregulación transcripcional de β 2-microglobulina (β 2-m) y los genes de la maquinaria de procesamiento del antígeno LMP2 y LMP7. El análisis y localización de las diferentes poblaciones celulares inmunitarias revelaron la presencia de dos patrones principales y reproducibles. Un patrón que designamos como “microambiente tumoral inmuno-permisivo”, caracterizado por una expresión positiva de HLA-I, infiltración intratumoral de linfocitos T citotóxicos CD8+, macrófagos tipo M1 inflamatorios, y un patrón difuso de fibroblastos asociados a cáncer FAP+. Por el contrario, el otro patrón definido como “microambiente tumoral no permisivo” se encontró en tumores HLA-I negativos con una interacción estromal fuerte, linfocitos T CD8+ rodeando los nidos tumorales, una capa densa de fibroblastos FAP+ y macrófagos tipo M2 reparadores. **Conclusión:** Este estudio revela diferencias notables entre los tumores con expresión HLA-I positiva y negativa relacionada con la estructura del tejido, la composición del infiltrado y el microambiente estromal.

The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration.

Francisco Perea¹, Mónica Bernal¹, Abel Sánchez-Palencia², Javier Carretero¹, Cristina Torres¹, Clara Bayarri², Mercedes Gómez-Morales³, Federico Garrido^{1,4,5} and Francisco Ruiz-Cabello^{1,4,5}

¹Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC Laboratorio Clínico; Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, ²Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain, ³Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada, Granada, Spain, ⁴Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain, ⁵Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada, Granada, Spain.

Keywords: Lung Cancer, HLA class I loss, Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs), Immune escape

Abbreviations: HLA: human leukocyte antigen; β 2-m: beta-2-microglobulin; APM: antigen processing machinery; CTL: cytotoxic T lymphocyte; TIL: tumor infiltrating lymphocyte; FAP: fibroblast activation protein; LOH: loss of heterozygosity; TME: tumor micro-environment; LOT: lymphocyte outside the tumor; NSCLC: non-small-cell lung carcinoma; MHC: major histocompatibility complex; PDL-1: Programmed death-ligand-1; PD-1: Programmed death-1.

Grant Support: This work was supported by grants co-financed by FEDER funds (EU) from the Instituto de Salud Carlos III (PI11/01386, PI14/01978, RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165, PT13/0010/0039) and Junta de Andalucía in Spain (Group CTS-143).

DOI: 10.1002/ijc.30489

History: Received 17 May 2016; Accepted 21 Oct 2016; Online 27 Oct 2016

What's new?

Immune cell infiltration in tumors has great clinical significance, but the factors pre-determining different infiltration patterns remain unclear. Many tumors are however known to evade T lymphocyte responses by down-regulating HLA-I expression. Here, the authors demonstrate, in lung cancer, that tumor tissue structure strongly correlates with HLA-I expression and identify two patterns of leukocyte infiltration. HLA-I-positive tumors are heavily infiltrated by CD8⁺ T lymphocytes and M1 macrophages mixed with stromal cells in an immune-permissive tumor microenvironment (TME). In contrast, HLA-I-negative tumor

nodules are encapsulated by a stroma with CD8+ T lymphocytes, M2 macrophages and FAP+ fibroblasts in a non-immunopermissive TME.

Abstract

We wanted to analyze whether tumor HLA class I (HLA-I) expression influences the pattern of the immune cell infiltration and stromal cell reaction in the tumor microenvironment. Tumor tissues obtained from 57 patients diagnosed with lung carcinomas were analyzed for HLA expression and leukocyte infiltration. 28 patients out of the 57 were completely negative for HLA-I expression (49.1%) or showed a selective HLA-A locus downregulation (three patients, 5.2%). In 26 out of 57 tumors (47.8%) we detected a positive HLA-I expression but with a percentage of HLA-I negative cells between 10 and 25%. The HLA-I negative phenotype was produced by a combination of HLA haplotype loss and a transcriptional downregulation of b2-microglobulin (b2-m) and LMP2 and LMP7 antigen presentation machinery genes. The analysis and localization of different immune cell populations revealed the presence of two major and reproducible patterns. One pattern, which we designated “immune-permissive tumor microenvironment (TME),” was characterized by positive tumor HLA-I expression, intratumoral infiltration with cytotoxic T-CD8+ cells, M1-inflammatory type macrophages, and a diffuse pattern of FAP+ cancer-associated fibroblasts. In contrast, another pattern defined as “non-immune-permissive TME” was found in HLA-I negative tumors with strong stromal-matrix interaction, T-CD8+ cells surrounding tumor nests, a dense layer of FAP+ fibroblasts and M2/repair-type macrophages. In conclusion, this study revealed marked differences between HLA class I-positive and negative tumors related to tissue structure, the composition of leukocyte infiltration and stromal response in the tumor microenvironment.

Introduction

Leukocytes and especially T lymphocytes can infiltrate tumor tissue independently of the histological type. This infiltration has been described in melanoma¹ esophageal,² colorectal,³⁻⁵ pancreatic,⁶ ovarian,⁷ gallbladder,⁸ breast,⁹ prostate,¹⁰ and lung carcinomas.¹¹ Recently, attention focused on the type, density and location of leukocyte infiltration in human tumors and its impact on prognosis. The clinical significance of a detailed analysis of the cellular infiltration (called “immunoscore”) appeared to be greater than that of TNM tumor classification.¹² However, the factors that predetermine the different patterns of tumor infiltration are not known. Some tumor tissues have different types of leukocytes, including CD8+ T cells, which surround tumor cells and are restricted exclusively to the peritumoral-stroma and the invasive margin. In contrast, in other tumors, the presence of CD8+ tumor-infiltrating T lymphocytes is observed

within tumor islets. Recently, it has been proposed that the matrix architecture contributes to these distinct patterns of infiltration and migration of T cells into the stroma, preventing direct contact with tumor cells and contributing to immune evasion.^{13,14} The reason why the tumor tissue architecture changes so dramatically from the infiltration to the non-infiltration stage is not known.

A high proportion of human tumors can evade T lymphocyte responses by losing or downregulating the expression of HLA-I molecules.¹⁵⁻¹⁷ This immune escape mechanism is well documented and has been reported and confirmed by different groups.¹⁸⁻²⁰ Total or selective HLA-A,B,C losses have been reported in a large variety of human tumors derived from HLA-I positive epithelia.²¹⁻²³ The molecular mechanism responsible for HLA-I losses is crucial for the possible restoration of the expression of these molecules. If the molecular mechanism is reversible (soft), HLA-I molecules will be recovered after the release of TH1 type cytokines in the TME and the tumor will be rejected by CTLs.²⁴ In contrast, if the mechanism is irreversible due to structural alterations in HLA-I or b2-m genes (hard lesions), the HLA-I expression will not be recovered and the tumor will continue growing and will eventually kill the host.²⁴

In this paper we present evidence of a direct correlation among patterns of tumor HLA-I expression, patterns of tumor infiltrating lymphocytes/macrophages, and the tissue stroma/matrix architecture in lung cancer. When the tumor is HLA-I positive CD45RO, CD3, and CD8-positive T lymphocytes, as well as CD64 and CD206-positive macrophages are in close contact with tumor cells inside the tumor nests. In contrast, these cells are in the stroma in HLA-I negative tumors and outside the tumor tissue. Interestingly, we found that the presence of these two patterns of stromal reaction correlates with the ratio of macrophage M1/M2 polarization.

Material and Methods

Clinical and histopathological characteristics of tumor sample

57 NSCLC (Non-small cell lung cancer) patients were included in this study. Patient samples were obtained from Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain). Demographic, clinical and histological characteristics of studied subjects are summarized in Table 1. Before the study, all medical records and tumor sections were reviewed by an oncologist and a surgical pathologist. Informed consent was obtained from all the patients, which was approved by the Ethics Committee of our institution. The specimens included 30 squamous cell carcinomas (SCC), 25 adenocarcinomas and two large cell carcinomas based on WHO criteria of histopathological classification.²⁵ The tumors were classified as stage I (n=30),

and stage II and III (n=24) based on the American Joint Committee on Cancer guidelines for postsurgical, tumor-node-metastasis (TNM).²⁶ Five cases received radiation or chemotherapy before surgery.

Immunohistological analysis of cryopreserved and paraffin embedded tissue samples

57 NSCLC tumors were analyzed in the present study, including 40 cryopreserved and 17 paraffin embedded tissues. Tumor samples were taken from primary malignant lung tumors by excision of a fragment of tumor mass during the initial surgery for the disease. After thoracotomy and lung resection, half of the piece was immediately stored at -80°C . Frozen tumor tissue sections of 4–8- μm -thick tissues were cut on a microtome-cryostat (Bright), allowed to dry at room temperature for 4–18 hr, fixed in acetone at 4°C for 10 min, and stored at 240°C until staining. The other half of the piece was fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. 4 μm -thick sections were mounted on pretreated slides. Immunohistological techniques were performed with the Biotin-Streptavidin System (supersensitive Multilink HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands).

The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used in cryopreserved tumor tissues to analyze HLA-I expression: W6/32 against HLA-A, B, and C heavy chain/b2-m complex (a gift from Dr Bodmer, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK); GRH-1, which recognizes free and HLA class I heavy chain-associated b2-m chain, produced and characterized in our laboratory; HC-10 against free heavy chain of HLA-B and C molecules, anti-HLA-A which recognizes a subset of HLA-A locus-encoded gene products and 42IB5 against HLA-B locus-encoded gene products. We also studied HLA class II expression by using GRB1 mAb against HLA-DR molecules, produced and characterized in our laboratory. These mAbs were previously reported.^{5,10} Total loss of HLA-I molecules was defined by negative staining with W6/32 and GRH-1 mAbs according to the criteria established by the HLA and Cancer component of the 1996 International Histocompatibility Workshop.²⁷ Paraffin embedded tissues were stained for EMR8-5 against HLAABC heavy chain (Clone ab70328, abcam), L-368 which recognizes b2-m chain (a gift from Dr. Ferrone, Harvard University) and HC-10, specific for HLA-B and C free heavy chain.⁵ Before immunolabeling paraffin sections were deparaffinized and endogenous peroxidase activity blocked using a solution of hydrogen peroxide for 10 minutes. For antigen retrieval, sections were treated with sodium citrate buffer (pH 6.0).

Table 1. Clinical features of lung cancer patients and tumor HLA class I expression

| Clinical features | HLA-I expression | | p values |
|-----------------------------------|---|--------------------------|----------|
| | Positive or heterogeneous n = 29 (51%) | Negative n = 28 (49%) | |
| Age | | | |
| Mean: 67 (45-82) | | | |
| Sex | | | |
| Male: 48 (84%) | 22 (76%) | 26 (93%) | 0.144 |
| Female: 9 (16%) | 7 (24%) | 2 (7%) | |
| Smoking History | | | |
| Smoker: 51 (89%) | 27 (93%) | 24 (85%) | 0.420 |
| No smoker: 6 (11%) | 2 (7%) | 4 (15%) | |
| Primary tumor | | | |
| T1:15 (28%) | 8 (29%) | 7 (27%) | 0.700 |
| T2: 32 (59%) | 17 (61%) | 15 (58%) | |
| T3 and T4: 7 (13%) | 3 (10%) | 4 (15%) | |
| Nodal status | | | |
| N0: 41 (76%) | 22 (79%) | 19 (73%) | 0.743 |
| N1 and N2: 13 (24%) | 6 (21%) | 7 (27%) | |
| Pathological stage | | | |
| I: 30 (56%) | 16 (57%) | 14 (54%) | 0.779 |
| II and III: 24 (44%) | 12 (43%) | 12 (46%) | |
| Histology | | | |
| Squamous cell carcinoma: 30 (53%) | 15 (52%) | 15 (54%) | 0.297 |
| Adenocarcinoma: 25 (44%) | 12 (41%) | 13 (46%) | |
| Large cell carcinoma: 2 (3%) | 2 (7%) | 0 (0%) | |

Mouse mAbs used to stain tumor infiltrates in cryostatic sections were: GRT2 (anti-CD45), produced in our laboratory,⁵ OKT3 (anti-CD3, ATCC, Teddington, UK), OKT8 (anti-CD8, ATCC), anti-CD45RO (Clone UCHL1, Thermo Fisher), anti-CD64 (Clone 10.1, BD Biosciences), anti-CD206 (Macrophage mannose receptor; Clone 19.2, BD Biosciences), anti-CD56 (Clone 123C3, Dako) and an anti-FAP (Fibroblast Activation Protein), (Clone F11-24, Merck Millipore). Paraffin-embedded tissue sections were also stained for CD45, CD4, CD8, using prediluted antibodies supplied by Master Diagnostica (CD45: Ref MAD-002066QD, batch:0108-01; CD4: Ref: MAD-00600QD, batch:0107-02-10, clone EP 204; CD8: Ref MAD-000618QD, batch 0183-11, clone SP16. Immunohistochemical staining was carried out using the of UltraVision Quanto (peroxidase) immunohistochemistry detection system (MAD-021881QK/MAD-001881QK Master Diagnostica) following manufacturer's instructions. The primary antibody was replaced with PBS for negative controls; no immunohistochemical staining was detected in control preparations.

Study of tumor infiltration

Three observers analyzed tissue tumor infiltrates, using 10x and 40x objectives and defining the tumor infiltration using anti-CD45, anti-CD8 and anti-CD64 mAbs as follows: (1)

tumor infiltration with lymphocytes (TILs) and macrophages along with stromal infiltration. TILs were observed in close contact with neoplastic epithelial cells (20–70 TILs per field at 40x magnification) and (2) stromal infiltration (inflammatory infiltrate only encapsulating tumor mass). Global infiltration by CD45, CD3, CD8, CD45RO and CD64 positive cells was evaluated in 5 different fields under 40x objective and scored as: + (≤ 30 cells/field), ++ (30–70 cells/field), +++ (70–120 cells/field) and ++++ (≥ 120 cells/field). For each cryopreserved tumor sample we calculated the infiltration score (1–4) for each marker (CD45, CD3, CD8, CD45RO and CD64) by adding one point for each assigned cross (+) for subsequent statistical analysis. Macrophage subpopulations were studied using mAbs against CD64 (M1 or inflammatory macrophage marker) and CD206 (M2 or immunosuppressive macrophage marker). Tissue sections for staining with both mAbs were scanned using Panoramic MIDI Scanner (3DHISTECH). For each tumor sample, M1 and M2 subpopulations were quantified in five different fields by two independent observers using Viewer MIDI software and 40x objective, and subsequently the M1/M2 ratio was calculated in each case.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), version 20.0. Variables with normal distribution are expressed as means with standard deviation. Variables with non-normal distribution are expressed as medians and interquartile range. In the case of quantitative variables, differences among all study groups were evaluated by using a t test in case of normality or a non-parametric test (Wilcoxon or Mann Whitney Test) for non-normal variables, when two groups were compared. To check for normality we used Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests.

Categorical variables, such as sex, smoking history, tumor stage, HLA-I expression were coded in two groups and analyzed using the χ^2 or Fisher's exact test. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Microdissection and DNA isolation

Cryopreserved tissue sections 4–8- μ m-thick, fixed in 70% ethanol and stained with a 0.05% w/v solution of toluidine blue, were microdissected using a laser micromanipulator (PALM MicroLaser Systems, ZEISS). Microdissected fragments were collected in PALM Adhesive Caps. Tumor DNA was isolated from microdissected tumor fragments using QIAamp Tissue Kit (QIAGEN, the Netherlands). In all cases, normal autologous DNA was obtained from peripheral blood lymphocytes (PBLs), also using the QIAGEN DNA isolation kit following the manufacturer's protocol. Molecular study of tumor samples DNA and RNA

obtained from HLA-I negative tumors and controls (PBLs) were evaluated for B2M gene sequencing, HLA-I genomic typing, loss of heterozygosity (LOH) analysis and gene expression study by RT-PCR (see Supporting Information Material and Methods)

Results

HLA class I expression on tumor tissues

The expression of HLA-I antigens was evaluated in 57 primary lung cancer tissue samples using immunohistochemical staining with monomorphic determinants of HLA-ABC and locus-specific and anti-b2-m antibodies. Leukocytes and other interstitial cells revealed a strong cell surface HLA-I expression. However, we detected various HLA-I alterations in 32 out of 57 samples (56.1%) (Table 2 and Supporting Information Table S1).

The most frequent alteration detected in cryopreserved sections was total loss or downregulation of HLA-ABC molecules, which was observed in 22 out of 40 cases (55%) (Table 2). These alterations affected both HLA heavy and light chains, since no immunolabeling was detected when either anti-HLA-ABC-b2-m complex (W6/32) or anti-b2 m (GRH-1) antibodies were used. Interestingly, in 9 cases out of 22 (40.9%), we observed positive intracellular labeling of free heavy chains (HC-10 mAb positivity). In 3 tumor samples (7.5%) we detected a selective loss of HLA-A locus expression. In 15 out of 40 tumors (37.5%) the HLA-I expression was positive, but with the presence of 10–25% of HLA-I negative cells.

Only 17 paraffin embedded samples were available (Supporting Information Table S1); out of which 6 tumors (35.3%) showed a complete loss of HLA-I expression. For a more detailed HLA analysis, we followed the protocol suggested by the HLA and Cancer component of the XII International Histocompatibility Workshop.²⁷ We also studied the HLA class II expression using the monoclonal antibody against HLA-DR (GRB-1); 32 out of 40 cryopreserved samples (80%) were negative and six were positive for HLA-DR. These results are presented in Table 2.

Table 1 summarizes different clinico-pathological parameters (histology, pathological stage, nodal status). No significant association was found between HLA-I expression and any of the parameters analyzed.

Immune infiltration pattern in tumor tissues

In 40 frozen tumor samples, we analyzed the composition and localization of the tumor leukocyte infiltration, especially of cytotoxic T cells. For this purpose, we used mAbs against molecules expressed by leukocytes (CD45), cytotoxic T cells (CD3 and CD8), activated memory lymphocytes (CD45RO), M1 (CD64) and M2 (CD206) macrophages, and NK cells (CD56). Lymphocyte/macrophage infiltration was classified into two patterns based on their localization: (a) pattern with immune cells mainly present in stromal tissue and low or moderate intratumoral infiltration by lymphocytes (TILs) and macrophages; (b) stromal pattern when lymphocytes/macrophages reside only outside tumor nests, encapsulating them.

We observed that all of the tumors with HLA-I total loss showed a stromal pattern with absence or very low numbers of TILs. In 16 out of 22 tumors (72.7%) with HLA-I total loss, we detected a stromal pattern with absence of HLA-I positive cells within the tumor. In these cases, all positive cells for leukocyte/lymphocytes/macrophage markers were outside the tumor islet, in the stromal tissue. In 5 HLA-I negative tumors (22.7%), we observed a very low presence of CD8+ T cells inside tumor nests (≤ 20 TILs per field at 40x magnification). Only one HLA-I negative tumor (P11) showed a moderate presence of TILs (20–70 TILs per field at 40x magnification). Interestingly, this tumor was also positive for DR expression (Table 2).

In contrast, in tumors with HLA-I positive or heterogeneous immunolabeling, cellular infiltration was clearly detectable close to tumor cells and the tissue structure was diffuse, with a mixture of both tumor cells and lymphocytes/macrophages. Only one HLA-I positive tumor (P21) presented the stromal pattern observed in the HLA-I negative tumor group, suggesting the existence of a yet unknown HLA-associated tumor escape mechanism. Similarly, this absence of leukocytes (lymphocytes/macrophages) was also detected in 2 out of 3 tumors with selective loss of HLA-A locus expression (P20, P31) (Table 2), whereas the remaining case (P42) showed the presence of TILs. Once again, this case showed positive tumor HLA-DR expression (Table 2).

Table 2. Immunohistochemical analysis of HLA expression and leukocyte infiltration in frozen tissues of lung cancer

| Samples | HLA expression ¹ | | | | | | Leukocytes surrounding and infiltrating tumor tissues ² | | | | | |
|---------|---------------------------------|-----------------------|-------|-------|-------------------------|--------|--|------|------|------|--------|------|
| | HLA-ABC-β _{2m} complex | β _{2m} chain | HLA-A | HLA-B | HLA-BC free heavy chain | HLA-DR | Tumor infiltrating lymphocytes (TILs) | CD45 | CD3 | CD8 | CD45RO | CD64 |
| P4 | + | + | + | + | + | - | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| P7 | + | + | + | + | + | - | + | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| P10 | + | + | + | + | + | - | + | ++++ | +++ | +++ | ++++ | +++ |
| P13 | + | + | + | + | + | + | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| P14 | + | + | + | + | + | - | + | ++++ | +++ | ++ | +++ | + |
| P18 | + | + | + | + | + | - | + | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| P21 | + | + | + | + | + | - | - | +++ | ++ | + | +++ | ++ |
| P24 | + | + | + | + | + | + | + | ++++ | ++++ | +++ | ++++ | + |
| P27 | + | + | + | + | + | + | + | ++ | + | + | ++ | ++ |
| P35 | + | + | + | + | + | - | + | ++++ | ++++ | ++ | +++ | +++ |
| P37 | + | + | + | H | + | - | + | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++ |
| P38 | + | + | + | + | + | - | + | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| P39 | + | + | H | + | + | H | + | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| P41 | + | + | + | + | + | + | + | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| P43 | + | + | + | + | + | - | + | ++++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| P20 | + | + | - | + | + | - | - | ++ | +++ | + | ++ | ++ |
| P31 | + | + | - | + | + | - | - | ++++ | ++++ | +++ | +++ | + |
| P42 | + | + | - | + | + | + | + | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| P1 | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| P5 | - | - | - | - | - | - | - | ++++ | +++ | +++ | ++++ | +++ |
| P6 | - | - | - | - | H | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| P8 | - | - | - | - | - | - | - | ++++ | ++++ | +++ | +++ | +++ |
| P9 | - | - | - | - | - | - | - | ++ | + | + | ++ | ++ |
| P11 | - | - | - | - | + | + | + | +++ | +++ | ++ | + | +++ |
| P16 | - | - | - | - | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| P17 | - | - | - | - | + | - | +/- | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| P19 | - | - | - | + | - | - | - | ++ | ++ | + | ++ | ++ |
| P22 | - | - | - | - | - | - | - | +++ | ++ | ++ | +++ | ++ |
| P23 | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| P25 | - | - | - | + | + | - | - | ++++ | +++ | +++ | + | +++ |
| P26 | - | - | - | - | - | - | - | +++ | +++ | +++ | ++ | +++ |
| P28 | + | - | N | + | + | - | +/- | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| P30 | - | - | N | - | - | - | - | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| P32 | - | - | - | - | - | - | +/- | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| P33 | - | - | - | - | + | - | - | ++ | + | + | + | ++ |
| P34 | - | - | - | + | + | - | - | ++ | ++ | + | ++ | + |
| P36 | - | - | - | - | + | - | +/- | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| P40 | H | - | H | - | - | - | +/- | ++++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| P46 | - | - | + | - | - | - | - | + | + | + | + | + |
| P48 | - | - | - | + | + | - | - | + | + | + | + | + |

NOTE ¹ “-” 75–100% negative tumor cells, “+” >75% positive tumor cells, “H” Heterogeneous, 25–75% positive tumor cells, “N” No results.² We show the global tumor infiltrate by leukocytes (CD45), including T lymphocytes (CD3), cytotoxic T cells (CD8), activated memory lymphocytes (CD45RO) and macrophages (CD64). The tumor infiltration is classified as follows: + (≤ 30 cells/field), ++ (30–70 cells/field), +++ (70–120 cells/field) and ++++ (>120 cells/field). We also classify tumor infiltration by lymphocytes (TILs) (CD3+ CD8+) as follows: “+” (20–70 TILs/ field); “+/-” (≤ 20 TILs/field); “-” (absence of TILs). Absence or few isolated CD56+ NK cells was observed in tumors.

The statistical analysis revealed an association between tumor HLA-I expression and tumor infiltration pattern, i.e., HLA-I total loss was associated with stromal pattern and HLA-I positive expression with the presence of TILs ($p=0.009$) [Supporting Information Fig. S1(a)]. We name these two different situations as permissive and non-permissive TME (see Figs. 1 and 2 and Table 2).

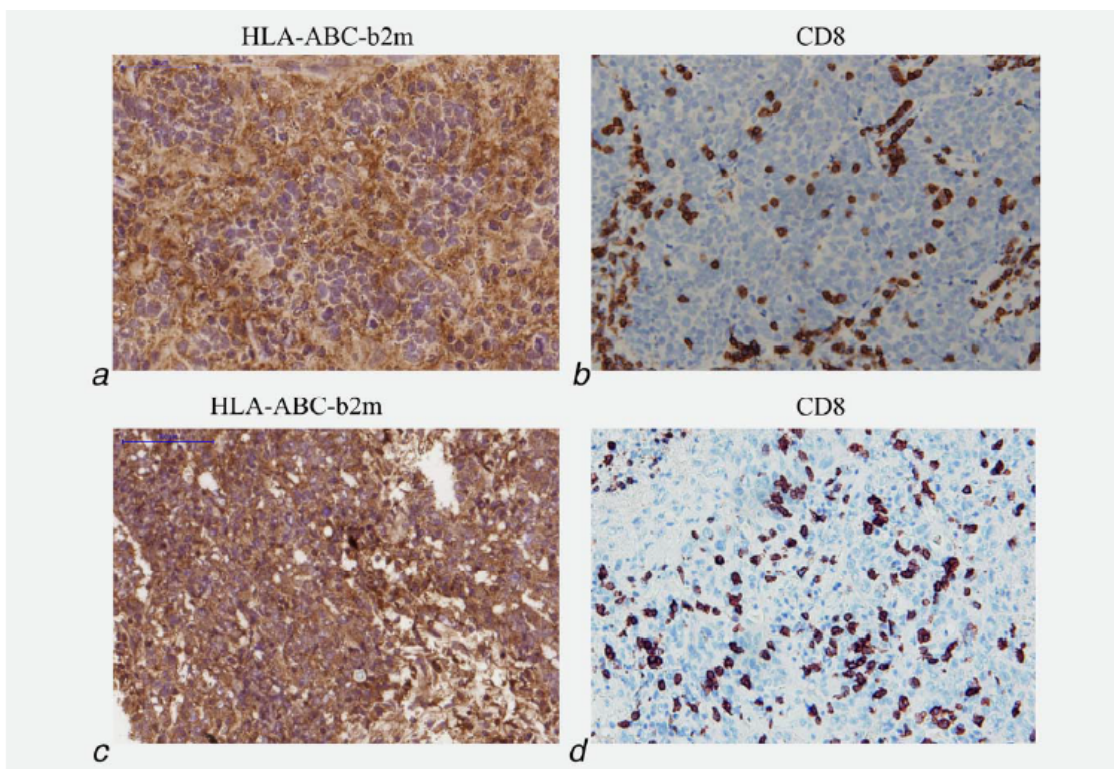


Figure 1. Positive HLA class I expression and CD8+ infiltration patterns in NSCLC tumors. Tumor tissue was stained with anti-HLA-class I and anti CD8 monoclonal antibodies. Most of the cancer cells were HLA-class I positive in both tumor samples, P4 (large cell carcinoma in stage I) (Figs. 1a and 1b) and P24 (squamous cell carcinoma in stage II) (Figs. 1c and 1d). HLA-I positive tumor cells and HLA-I positive immune cells are not clearly distinguishable from each other (Figs. 1a-1d). A significant CD8+ infiltration was observed both within tumor nests and in the tumor-surrounding stroma (Figs. 1b-1d). The tissue structure is “permissive,” allowing TILs to enter the tumor mass and achieve direct contact with cancer cells. This pattern in HLA-I positive tumors differs from that observed in HLA-I negative tissues and described in Figure 2 (see below). Original magnification: Figure 1a x40 (scale bar=50 μm) and Figures 1b-1d x20 (scale bar=100 μm). Images in Figures 1b and 1d are obtained from paraffin-embedded tissues, and those in Figures 1a and 1c from cryopreserved tissue samples.

Furthermore, based on a previous study¹⁰, we quantified the infiltration by leukocytes (CD45), including T lymphocytes (CD3), cytotoxic T cells (CD8), activated memory lymphocytes (CD45RO) and macrophages (CD64) in all cryopreserved tumor samples (Table 2). We found a higher infiltration by CD45RO positive cells in the HLA-I positive tumor group than in HLA-I negative samples ($p=0.007$). CD56 mAb was used to study the presence of NK

cells in cryopreserved tumor tissues. Complete absence or the presence of a few isolated NK cells was observed in both HLA-I positive and negative tumors.

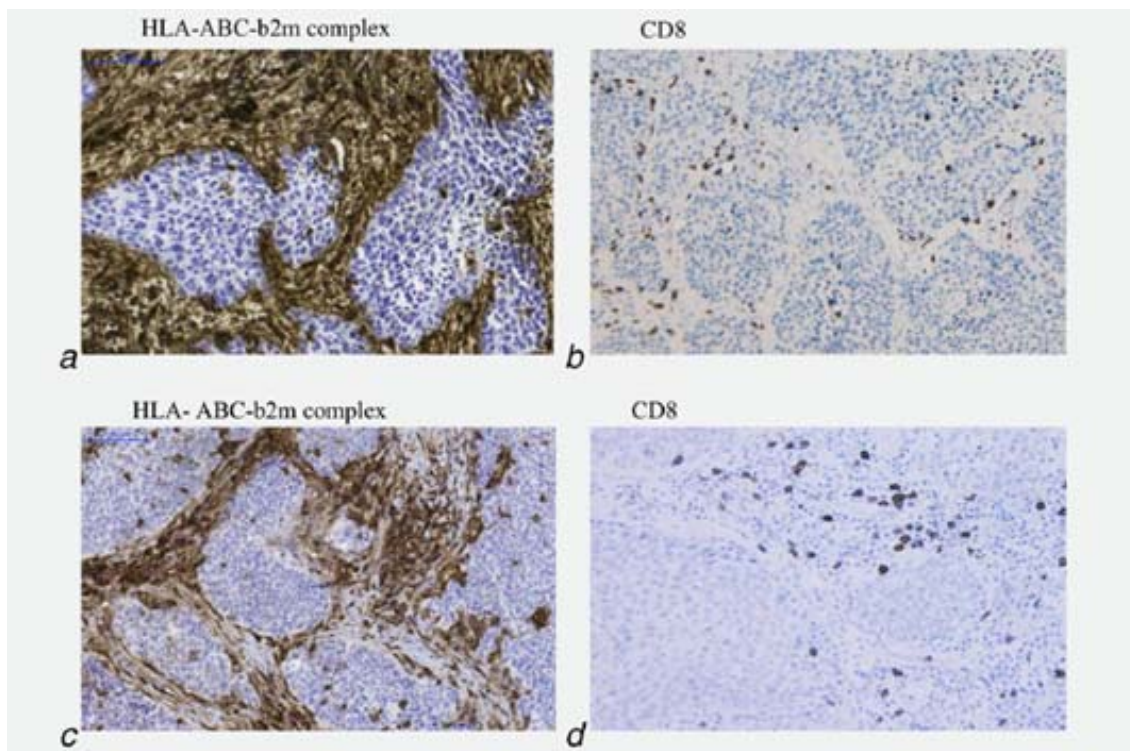


Figure 2. Negative HLA class I expression and CD8+ infiltration patterns in NSCLC tumors. In contrast to Figure 1, tumor tissues of patient P16 (squamous cell carcinoma in stage II) (Figs. 2a and 2b) and P60 (squamous cell carcinoma in stage I) (Figs. 2c and 2d) are HLA class I negative (Figs. 2a and 2c). The CD8+ cells are restricted almost exclusively to the peritumoral stroma that surrounds the tumor nest in a “non-permissive” tissue zone. Original magnification: Figures 2a-2d 320 magnification (scale bar=100 μ m). Figure 2a comes from cryopreserved and Figures 2b-2d from paraffin-embedded tissue samples.

Tumor tissue architecture is associated with macrophage polarization

We also investigated the presence and distribution of FAP+ fibroblasts in the tumor environment in association with tumor HLA-I expression and immune cell infiltration. We observed that in the majority of HLA-I positive tumors with presence of TILs [8 out of 14 (57.1%)], FAP+ fibroblasts were mixed with tumor cells and lymphocytes/macrophages, forming a loose network without clearly defined tumor nests (Figs. 3a and 3b). In contrast, HLA-I negative samples showed a dense network of FAP+ fibroblasts isolating tumor nests with a stromal/encapsulated structure [14 out of 17 (82.3%)] (Figs. 4a and 4b). In this context, we found no statistically significant association between tumor tissue structure (HLA-negative/stromal/encapsulated tumors or HLA-positive/TILs tumors) and type of FAP+ fibroblast localization ($p=0.128$).

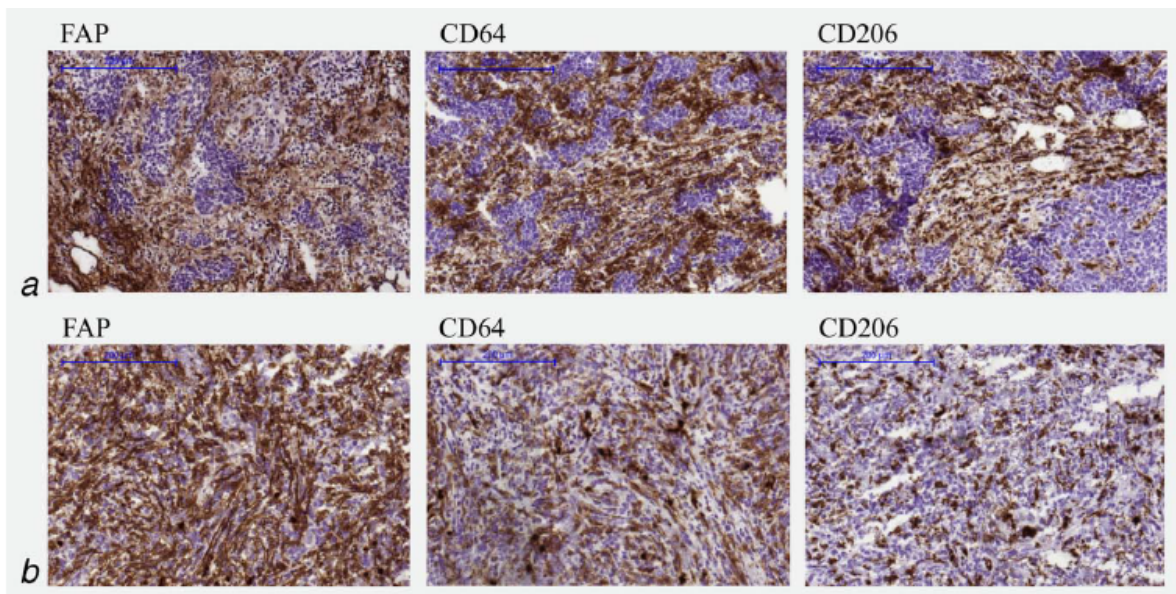


Figure 3. Tumor tissue architecture of HLA class I positive samples is correlated with greater infiltration by M1 macrophages. (a) P4 and (b) P37 are HLA-I positive tumors with presence of TILs. In these HLA-I positive samples, FAP+ fibroblasts are in close contact with neoplastic cells and leukocytes (lymphocytes/macrophages), forming a mixed tissue structure. HLA-I positive tumors with TIL/mixed structure show a predominant infiltration by M1 (CD64+) rather than M2 (CD206+) macrophages (mean ratio M1/M2=1.3). These results contrast with the data obtained from HLA-I negative tumors described in Figure 4 (see below) Original magnification: Figure 3a and 3b x10 (scale bar=200 μ m).

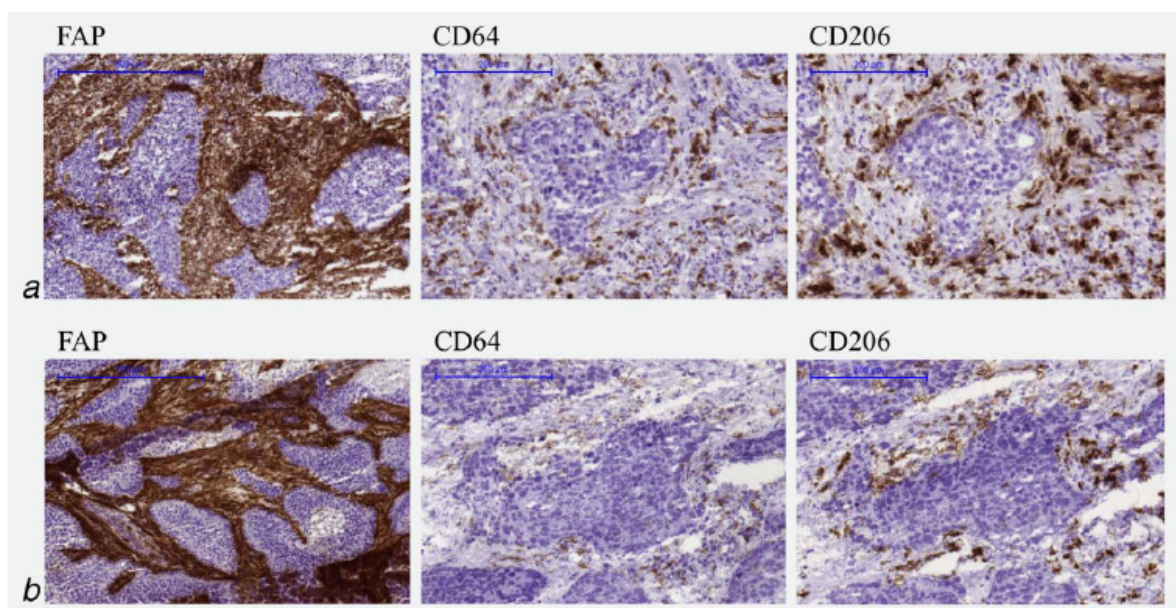


Figure 4. Tumor tissue architecture of HLA class I negative samples is correlated with a greater infiltration by M2 macrophages. (a) P16 and (b) P34 are HLA-I negative tumors with stromal infiltration. In contrast to HLA-I positive tumors (Fig. 3), FAP1 fibroblasts in these HLA-I negative tumors shape a dense network that encapsulates tumor nests. These HLA-I negative tumors with stromal/encapsulated structure show a higher presence of M2 (CD206+) than M1 (CD64+) cells (mean ratio M1/M2=0.72) ($p=0.005$). The dense layer of FAP+ fibroblasts isolating tumor nests in HLA-I negative tumors is correlated with a prevalence of M2/type repair-immunosuppressor macrophages. Original magnification: Figure 4a and 4b FAP staining x5 (scale bar=500 μ m) and Figures 4a and 4b M1 and M2 staining x10 (scale bar=200 μ m).

We observed differences in the infiltration by macrophage subpopulations according to the localization of FAP+ fibroblasts in the tumor environment. All tumors with a mixed network of fibroblasts/tumor cells/leukocytes (predominantly HLA-I positive tumors with presence of TILs) showed a balanced presence of M1 and M2 macrophages or a higher infiltration by M1 cells (mean M1/M2 ratio=1.3). In contrast, tumors with a dense network of fibroblasts around tumor nests (fundamentally HLA-I negative tumors with stromal/ encapsulated structure) showed a predominance of M2 macrophages over M1 cells (mean M1/M2 ratio=0.72) [Figs. 3 and 4 and Supporting Information Fig. S2(b)]. Significant differences in M1/M2 ratio were found between tumors with a dense network of fibroblasts and samples with a mixed network ($p=0.005$). Thus, the pattern of FAP+ fibroblasts described in most HLA-I negative tumors with stromal/encapsulated structure is associated with a marked M2 macrophage polarization, whereas the infiltration by M1 cells is related to HLA-I positive tumors with a mixed network of fibroblasts/tumor cells/leukocytes.

Molecular mechanisms involved in total HLA-I loss

One of the objectives of our work was to investigate the molecular mechanisms involved in total loss of HLA-ABC in HLA-I negative tumors identified by the immunohistochemical study (Supporting Information Material and Methods). We performed a study of gene expression using tumor mRNA from five HLA-I-negative tumors using laser capture microdissection. mRNA from six PBL samples was used as Controls. We analyzed the expression of Heavy-Chain HLA-I (HC) genes, B2M genes, antigen processing machinery (APM) genes (TAP1, TAP2, Tapasin, LMP2, LMP7, Calnexin and Calreticulin) and NLRC genes involved in regulation of HLA-I expression. We found a strong downregulation of B2M gene in tumor tissues compared to PBL group (controls) ($p<0.006$) (Supporting Information Table S2). LMP2 and LMP7 gene mRNA levels were also reduced in lung tumors as compared to Controls (LMP2, $p<0.008$; LMP7, $p<0.041$). We also detected a lower expression of HC and TAP1 genes in tumor samples, but the difference with the control did not reach statistical significance. Similarly, the observed upregulation of TAP2, Tapasin, Calreticulin and Calnexin and NLRC5 in lung tumor samples was not statistically significant (Supporting Information Table S2).

Furthermore, we performed HLA-I genomic typing using tumor and normal autologous DNA from 10 HLA-I negative lung tumors to evaluate the presence of HLA-I gene losses. We observed that 6 out of 10 tumors showed a hemizyosity pattern compatible with a HLA-I haplotype loss. Only one tumor retained six HLA-I alleles typed using normal autologous DNA, whereas in three other cases the results were not conclusive (Supporting Information Table S3).

We confirmed these typing results with a LOH study using six STRs (Short Tandem Repeats) associated with HLA region (6p21). Tumors with HLA haplotype loss showed LOH in 1–4 microsatellite markers of chromosome 6. However, no LOH in chromosome 6 was detected in a tumor without haplotype loss (P25) (Supporting Information Table S3). We also included in this study two microsatellite markers flanking the B2M gene. We detected LOH in at least one marker flanking B2M gene in 5 out of 10 HLA-I negative tumors. Interestingly, we did not detect mutations affecting the B2M gene after sequencing exon 1 and 2 in 10 HLA-ABC-negative tumors (Supporting Information Table S3).

Discussion

Lung cancer (NSCLC) is one of the most immunogenic tumors, and multiple peptides derived from non-synonymous mutations can potentially be recognized by cytotoxic T-CD8 lymphocytes.²⁸ However, malignant lesions attempting to escape immunosurveillance establish a complex immunosuppressive network that evolves towards the selection of low immunogenic HLA-I negative or deficient clones and culminates in complete resistance to T-cell attack.^{16,19,29,30} No published data are available on the possible relationship between the immune contexture (density and localization of leukocyte infiltration) and tumor HLA-I expression. The present findings indicate that tumor HLA-I expression is strongly correlated with the lymphocyte/macrophage infiltration pattern and tumor tissue architecture and reveal how an immuneprivileged compartment with ineffective anti-tumor immunity is generated in the development of lung cancer. We observed a significant percentage of lung tumors with total loss or down-regulation of HLA-I molecules. Moreover, HLA-I negative tumors could be correlated with a reproducible and particular distribution of different leukocytes and macrophages in stromal tissue.

We reported in 1991 that lung cancer cells downregulated HLA-I antigens in 25% of the studied patients.^{31,32} In the present series, the percentage of HLA-I deficient tumor samples rose to 56.1%, consistent with previous publications.^{33,34} The reasons for the discrepancy in the percentage of alterations (i.e., tumors with HLA loss) between our previous study and the present investigation are unknown, although it may be attributable to the utilization of more sensitive immunohistochemistry methods or to changes in the epidermoid/adenocarcinoma ratio in the patient population. We observed that LOH at 6p21.3 is an important cause of HLA haplotype loss in a significant number of cases analyzed. Haplotype loss of HLA-I antigens was found in 40% of lung cancer cell lines,^{35,36} and is one of the most common causes of abnormal HLA-I expression in various tumor types.^{18,36} In this context, our group reported an immune selection process in a human metastatic melanoma in which early onset of HLA-I loss caused by sequential mutations of the B2M gene led to a gradual decrease in immunogenicity.^{29,37,38}

Interestingly, we found no B2M mutations in our DNA analyses of HLA-I negative lung tumors in the present study. In contrast, the RT-PCR experiments revealed a strong down-regulation of B2M and heavy chain gene transcription. We can conclude that lung cancer possesses two independent molecular mechanisms responsible for the HLA-I total loss: HLA haplotype loss, and transcriptional downregulation of HLA-I genes.

The possibility that the heavily infiltrated HLA class I positive and TIL-free HLA class I negative tumors are completely different tumor types cannot be ruled out. However, we favor the proposition that, in most cases, the distinct tumor tissue structures and T cell infiltration patterns represent different phases of tumor development. Our hypothesis is based on the observation that NSCLC originates from healthy HLA I positive cells. A dynamic interaction between tumor cells and CD8 positive cells is reflected in the observation of heterogeneous tumor samples with different percentages of HLA I positive and negative tumor cells.²⁷ Additionally, we have consistent data pointing to the existence of a chronological sequence in the appearance of tumor HLA class I loss variants in successive metastatic lesions obtained from patients with melanoma and bladder cancer.^{29,38,39} These observations support our hypothesis, based on our ongoing research, that there are two phases of tumor evolution with distinct patterns of immune cell infiltration. In phase 1, when the tumor is HLA-I positive or heterogeneous, it contains lymphocytes and macrophages, and there is an immune-permissive TME in which tumor and infiltrating T cells are in close contact with each other (Fig. 1). In this phase, stroma cannot be distinguished from tumor tissue when staining for HLA-I (Fig. 1). We observed a positive correlation between the presence of tumor infiltrating CD8+ T cells (TIL pattern) and positive tumor HLA-I expression [Supporting Information Fig. S2(a)], and a similar observation has previously been reported in lung cancer.³³ In the present study, HLA-I expression was also found to be correlated with the intra- and peritumoral distribution of CD8+ T lymphocytes, which is in turn associated with different tumor evolution phases with distinct tissue reorganization patterns and M1/M2 ratios.

In phase 1, it is likely that tumor cells with a “normal” HLA-I expression are destroyed by CTLs during antigen presentation via the tumor cell surface HLA-b2m-peptide complex. We highlight that all HLA-DR positive tumor tissues (six cases) contained TILs, regardless of their HLA-I status (Table 2). We support the idea that HLA I positive tumor cells are actively killed by CTLs in phase I, leading to a progressive T-cell immune selection of HLA-I deficient tumor cells (phase II). We do not know precisely how long it may take to pass from phase I to phase II, but we could speculate that this period would not be prolonged. Phase II (Fig. 2) is characterized by the absence of tumor infiltrating cells and a clear-cut separation between tumor and stroma cells. T lymphocytes and other leukocytes remain outside the tumor mass, probably

because all HLA-I positive tumor cells have been eliminated. We believe that the peripheral distribution of leukocytes in the stroma, outside tumor tissues, is frequent in various types of cancer and is associated with HLA-I loss or downregulation, i.e., an immune escape phenotype (Fig. 2). In this case, tumor escape variants are “encapsulated” and surrounded by different leukocytes, with a clear barrier between tumor and stroma, in a non-immune-permissive TME (Fig. 2). In this regard, it can be theoretically proposed that NK cells attack HLA-I negative tumors and destroy them, but we found no significant presence of NK cells in the studied tumors. It is difficult to explain the lack of NK cells at the tumor site, but it is possible that the immunosuppressive tumor microenvironment alters NK activity and limits NK cell recruitment from healthy distal lung tissue to the tumor nest.⁴⁰

We also observed major quantitative changes in the M2/M1 macrophage ratio in phase II, with a predominance of M2 repair-type over M1/inflammatory macrophages. These M2 cells promote wound healing and tissue repair, tumor progression and stroma deposition, and inhibit adaptive immunity through their production of growth factors, cytokines and angiogenic/chemotactic factors.⁴¹ In addition, a dense matrix reaction containing numerous FAP+ cancer associated fibroblasts is also present in HLA-I negative tumor samples (Figs. 4a and 4b). It has been reported that IL-10 and TGF-beta produced by these cells are responsible for HLA-I downregulation, protecting tumor cells from immune recognition by specific CTLs.⁴² We favor the notion that this stromal reaction contributes to the creation of an immuneprivileged compartment around HLA-I negative tumor nests, generating an encapsulated tumor and excluding and limiting the capacity of T-cells to infiltrate and accumulate among tumor cells.

We hypothesize that the Phase II pattern is likely the most commonly observed one because of its longer duration during the natural history of tumor development. This may also explain why this tissue structure linked to the absence of HLA-I is frequently observed in the routine pathological diagnosis of tumor tissues. In fact, our group and other researchers observed the same tissue structural organization in various human tumors with HLA-I loss, including HLA-I deficient melanomas, colorectal, breast, bladder and prostate cancers, and other types of malignancy.^{10,13,21} It is noteworthy that this immune escape type of tumor tissue structure (Fig. 2) resembles that observed in different TH2 granulomas, in which the pathogen cannot be destroyed but is isolated from the body by a biological barrier.⁴³

An alternative hypothesis that must be considered is that these are two distinct types of tumor (HLA class I-positive and HLA class I-negative) rather than different development phases, with profoundly different biological characteristics associated with the anti-tumoral

efficacy of the local immunity response. It is possible that some HLA-I positive tumors use escape methods other than HLA-loss related mechanisms, in which case the additional loss of tumor HLA would not appear to offer a selective advantage; therefore, the hypothesis of two development phases would not be supported in these cases.

Finally, immune checkpoint therapy requires the molecular integrity of HLA-I molecules and only benefits a fraction of patients with different types of cancer, including NSCLC.^{44,45} Interestingly, the response rate to pembrolizumab was reported to be 45.2% in one series of NSCLC patients,⁴⁶ similar to the rate of HLA-I loss mediated by reversible and non-reversible (LOH) mechanisms in the present study. We suggest that HLA class I positive tumors may be more susceptible to treatment with immune checkpoint inhibitors because the mechanism of antigen recognition remains unaltered and the pattern of stromal reactivity and tumor infiltration is “permissive”. In contrast, HLA-negative tumors (especially those with loss-of-function irreversible truncating mutations in the genes encoding HLA, B2M, APM and IFNG signaling pathway^{24,47-49}) do not have signal 1 for lymphocyte activation or an adequate infiltration with CD8+ T cells, which are trapped outside the tumor nest in the stroma and have no direct contact with cancer cells (non-permissive pattern). This pattern may be related to the acquired resistance to PD-1 blockade reported in cancer patients. In fact, truncating mutations in the B2M, and JAK1/JAK2 genes have recently been described in recurrent lesions from four patients with metastatic melanoma.⁵⁰

Given these observations of a stromal rearrangement in HLA-I negative tumors that limits T cell trafficking within the tumor, a combination of checkpoint blockade therapy with regimens targeting stroma and the upregulation of antigen presentation may be beneficial for patients harboring soft HLA-I molecular lesions.

Acknowledgments

The authors thank Eva M^a García and Svetlana Zinchenko for technical assistance and Dr. Natalia Aptsiauri for critical review of the manuscript. This study is part of the doctoral thesis of F. Perea.

References

1. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 521-30.504.
2. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, et al. Prognostic significance of activated CD81 T cell infiltration within esophageal carcinomas. *Cancer Res* 2001; 61:3932–36.
3. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. CD81 T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:3491–4.

4. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 2006; 313:1960–4.
5. Bernal M, Concha A, Saenz-Lopez P, et al. Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity. *Cancer Immunol Immunother* 2011; 60:869–82.
6. Ryschich E, Notzel T, Hinz U, et al. Control of T cell mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11:498–504.
7. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med* 2003; 348:203–13.
8. Nakakubo Y, Miyamoto M, Cho Y, et al. Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2003; 89:1736–42.
9. Menard S, Tomasic G, Casalini P, et al. Lymphoid infiltration as a prognostic variable for early-onset breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 1997; 3:817–9.
10. Carretero FJ, Del Campo AB, Flores-Martín JF, et al. Frequent HLA class I alterations in human prostate cancer: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Immunol Immunother* 2016; 65:47–59.
11. Johnson SK, Kerr KM, Chapman AD, et al. Immune cell infiltrates and prognosis in primary carcinoma of the lung. *Lung Cancer* 2000; 27:27–35.
12. Galon J, Mlecnik B, Bindea G, et al. Towards the introduction of the 'Immunoscore' in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014; 232:199–209.
13. Salmon H, Franciszkiwicz K, Damotte D, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012; 122:899–910.
14. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science* 2015; 348:74–80.
15. Garrido F, Cabrera T, Concha A, et al. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 1993; 14:491–9.
16. Marincola FM, Jafee EM, Hicklin DJ, et al. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000; 74:181–273.
17. Bodmer W, Browning MJ, Krausa P, et al. Tumour escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 690:42–49.
18. Koopman LA, Corver WE, Van Der Slik AR, et al. Multiple genetic alterations at chromosome 6p cause frequent and heterogeneous HLA class I antigen loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000; 191:961–76.
19. Seliger B, Stoehr R, Handke D, et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009; 59:529–40.
20. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, et al. Combined genetic inactivation of b2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* 2011; 20:728–40.
21. Garrido F, Cabrera T, Lopez-Nevot MA, et al. HLA class I antigens in human tumors. *Adv Cancer Res* 1995; 67:155–95.
22. Kloor M, Becker C, Benner A, et al. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 6418–24.
23. Angell TE, Lechner MG, Jang JK, et al. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin Cancer Res* 2014; 20:6034–44.
24. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. “Hard” and “Soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2010; 127:249–56.
25. Travis WD, Colby TV, Corrin B, eds. *Histological typing of lung and pleural tumours*, 3rd ed. Heidelberg: Springer, 1999. 156p.
26. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours UICC 2009*, 7th edn. Chichester: Wiley, 2010. 310p.
27. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS, et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication. Proc. Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. II. France: EDK, Sevres; 1997. 445–52.*
28. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339:1546–58.

29. del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, et al. Immune escape of cancer cells with beta2- microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2014; 134:102–13.
30. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18:89–95.
31. Redondo M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Altered HLA class I expression in non-small cell lung cancer is independent of c-myc activation. *Cancer Res* 1991; 51:2463–8
32. Redondo M, Concha A, Oldiviela R, et al. Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer Res* 1991; 51:4948–54.
33. Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T, et al. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2007; 98: 1424–30.
34. Baba T, Shiota H, Kuroda K. Clinical significance of human leukocyte antigen loss and melanoma-associated antigen 4 expression in smokers of non-small cell lung cancer patients. *Int J Clin Oncol* 2013; 18:997–1004.
35. So T, Takenoyama M, Mizukami M, et al. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res* 2005; 65:5945–52.
36. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004; 56:244–53.
37. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Implication of the b2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1359–71.
38. Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, et al. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 2003; 103:759–67.
39. Carretero R, Cabrera T, Gil H, et al. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer* 2011; 129:839.
40. Valenzuela-Membrives M, Perea-García F, Sanchez-Palencia A, et al. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget*, 2016; doi:10.18632/oncotarget.12264.
41. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A breakthrough: macrophage-directed cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2016; 76:513–6.
42. Chen XH, Liu ZC, Zhang G, et al. TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol Immunol* 2015; 65:34–42.
43. Mukhopadhyay S, Farver CF, Vaszar LT, et al. Causes of pulmonary granulomas: a retrospective study of 500 cases from seven countries. *J Clin Pathol* 2012; 65:51–57.
44. Spranger S, Koblisch HK, Horton B, et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA- 4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2014; 2:3.
45. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PDL1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2015; pii: S0140-6736(15)01281–7.
46. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015; 372:2018–28.
47. Aptsiauri N, Carretero R, Garcia-Lora A, et al. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008; 57:1727–33.
48. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2016; 39:44–51.
49. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* 2008; 101:249–76.
50. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations associated with acquired resistance to PD-1 blockade in melanoma. *N Engl J Med* 2016; 375:819–29.

Supporting Information

Material and Methods

Sequencing of *B2M* gene

Tumor DNA was used for sequencing exon 1 and exon 2 of β 2-m gene. Primers used for amplification were exon 1: B2-1Fw 5'-TGCAGGTCCGAGCAGTT AAC-3' and B2-1Bw 5'-CAGAGCGGGAGGGTAGGAGA-3'; Exon2: B2-C (Fw) 5'-CGATATTCCTCAGGTACT-3' and B2-NC (Bw) 5'-CAACTTTCAGCAGCTTAC-3'.

PCR product was purified by using QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN Wetsburg, Leusden, the Netherlands). Sequencing was performed by using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the same primers as in the amplification reaction. The sequencing reaction purification was performed using DyeEx 2.0 Spin kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations. ABI 3130x/Genetic Analyzer and Sequencing Analysis v5.2 software (Applied Biosystem) were used for the analyses.

HLA class I Tumor Typing

DNA from microdissected tumor and normal autologous cells were used to perform HLA class I genomic typing with the LIFECODES HLA-A, -B and -C Typing Kits – Rapid (IMMUCOR, Stanford, EE.UU) following the manufacturer's instructions. The Luminex 100/200™ System, based in xMAP Technology (Luminex®, Austin, Texas, EE.UU), was used to analyze HLA class I typing, and consequently, to detect haplotype, locus or allele loss in HLA class I genes in tumor samples compared with normal HLA typing.

LOH Analysis on DNA from Tumor Tissue

To confirm the results obtained from the HLA typing whether cells we also analyzed microsatellite region surrounding HLA class I region. We determined the status of heterozygosity of specific microsatellite markers associated with HLA region of chromosome 6q21 (*D6S105*, *D6S265*, *D6S276*, *D6S291*, *D6S473*) and *B2M* gene on chromosome 15p21 (*D15S126*, *D15S153*) (33, 34). These microsatellite markers were amplified from microdissected tumor DNA and normal autologous PBLs. The 5' end of one primer of each primer set was tagged with a fluorescent label (Applied Biosystems). We employed a multiplex PCR strategy for combinations of several markers (with different staining) using 10 pmol of each primer (forward and reverse).

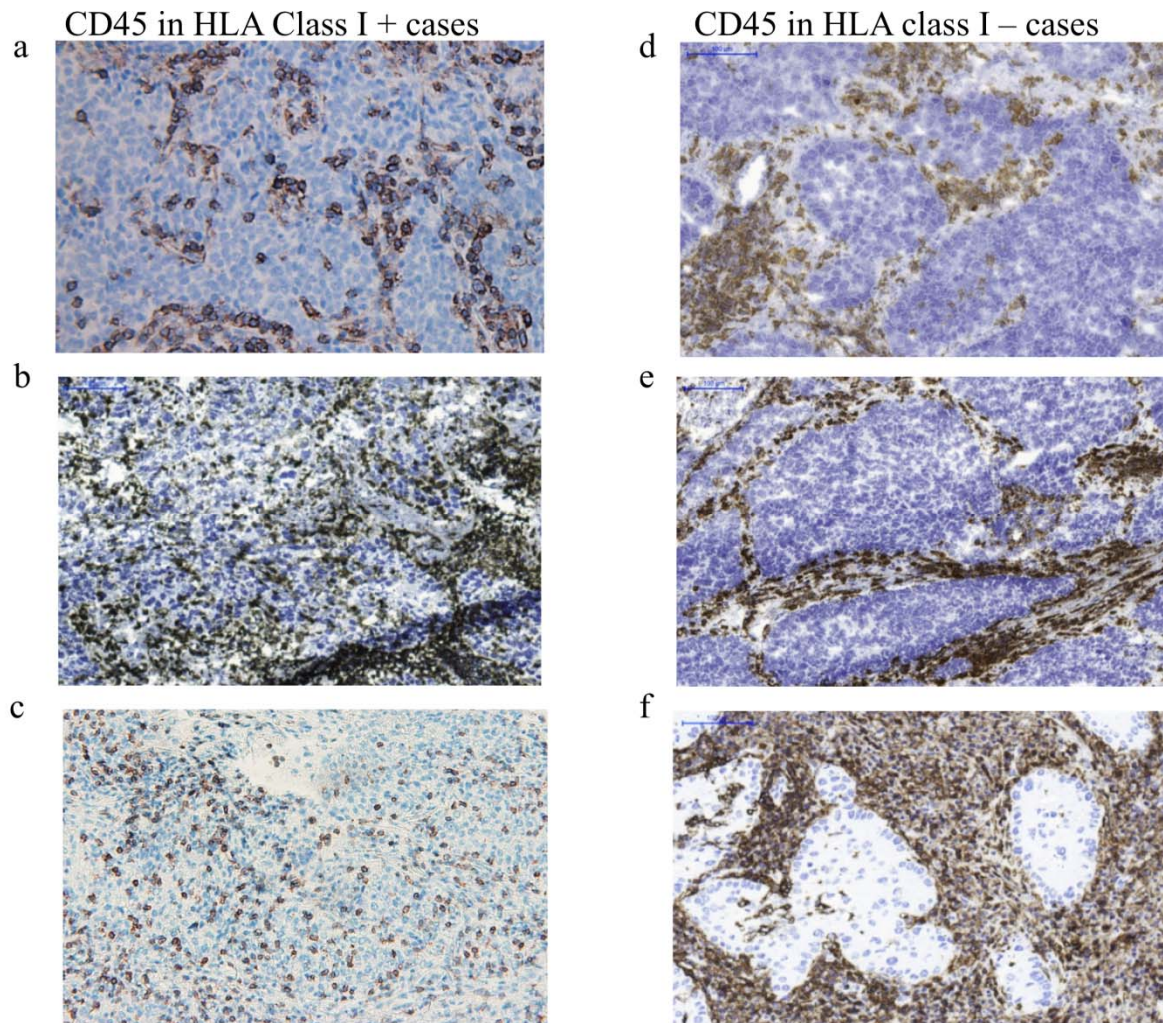
LOH analysis was determined using the ABI 3130x/Genetic Analyzer with 16 capillaries and GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems). A probe was considered to be LOH-positive in case of a signal reduction of >25% in the microsatellite marker. Details on the data analysis were described previously.³⁸

Gene expression study by Real Time RT-PCR

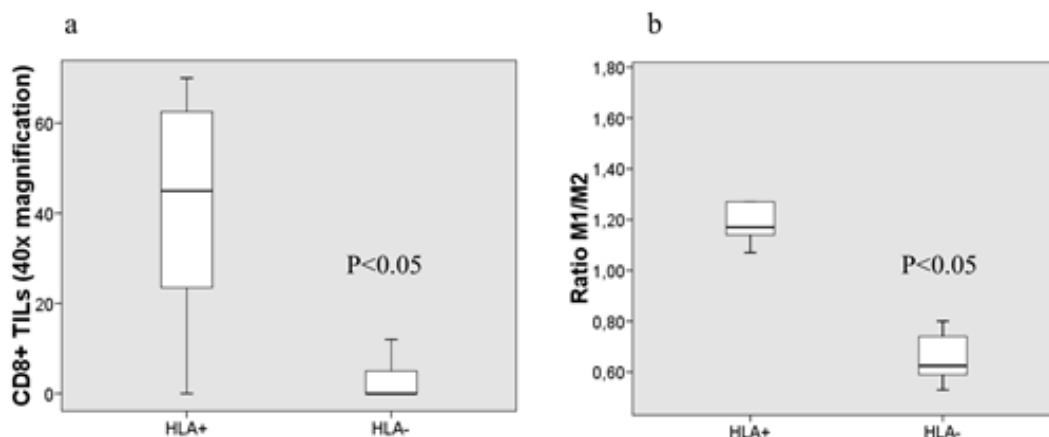
5 tumor samples HLA class I-negative and 8 PBL samples (Controls) were used in the gene expression study. Tumor RNA was extracted from microdissected tumor fragments using miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's recommendations. Normal RNA was isolated from PBL samples also using the QIAGEN RNA isolation kit. cDNA synthesis was performed with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) following the manufacturer's instructions.

RT-PCR products were analysed for the expression of *B2M* and Heavy-Chain genes, components of the Antigen Processing Machinery (APM) such as TAP1, TAP2, Tapasin, LMP2, LMP7, Calnexin; Calreticulin and *NLRC5* regulator gene by quantitative Real Time PCR (Q-PCR). All reactions were performed using 7500 Fast Real-time PCR System using TaqMan PCR master mix and target-specific primers/probes from Applied Biosystems (UK). The final expression levels of target genes in tumor and stromal samples were given relative to the expression levels of β -Glucuronidase (*GUSB*) gene to control for variations in amounts of mRNA.

Figure legend



Supporting information figure S1 legend. Representative images of leukocyte (CD45+) infiltration patterns in HLA Class I positive and negative NSCLC specimens. Tumors with positive HLA class I expression, P4, P35, and P24 (a, b and c, respectively), showed a high degree of intra-tumor infiltration with immune cells permitting their direct contact with cancer cells, while most of the immune cells in HLA class I negative tumors P16 , P23 and P8 (d, e and f, respectively) remained in the stroma surrounding the tumor nests. (magnification x20). Figures b,d,e and f come from cryopreserved and Figures a and c from paraffin-embedded tissue samples.



Supporting information figure S2 legend. (a) Density of CD8+ tumor infiltrating cells (TILs) in tumors with positive and negative HLA class I expression. HLA class I positive tumors showed significantly higher density of CD8+ TILs than HLA class I negative tumors. (b) M1/M2 ratio was determined in tumors with different tissue structures: a “permissive pattern” was observed in HLA class I positive tumors, characterized by a diffused tissue structure in which leukocytes are in a direct contact with tumor cells; a “non-permissive pattern” was observed in HLA class I negative tumors, with stromal/encapsulated tissue structure in which leukocytes are located outside tumor nests. HLA class I positive tumors showed a higher M1/M2 ratio in comparison to HLA class I negative tumors, with a larger proportion of M2 macrophages (lower M1/M2 ratio). P-values were calculated using the Mann Whitney U-test.

Supporting Information Table S1. Immunohistochemical analysis of HLA-ABC expression in paraffin embedded samples of lung cancer.

| Samples | HLA class I Expression | | |
|---------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| | HLA-ABC heavy chain | HLA-BC free heavy chain | β ₂ m chain |
| P49 | N | + | + |
| P50 | + | + | + |
| P51 | N | + | + |
| P52 | - | - | + |
| P53 | N | + | + |
| P54 | - | - | - |
| P55 | + | + | + |
| P56 | + | + | + |
| P57 | + | + | + |
| P58 | + | + | + |
| P59 | - | + | + |
| P60 | - | - | - |
| P61 | - | - | + |
| P62 | - | - | - |
| P63 | H | H | H |
| P64 | - | - | - |
| P65 | N | + | + |

Note: “+” >75% positive tumor cells; “-“ 100% negative tumor cells; “H” Heterogeneous, “N” No data.

Supporting Information Table S2. Summarized results of quantitative real-time RT-PCR analysis in lung tumors.

| Target Gene | ^a Ratio Tumor | ^a Ratio PBL | P-value |
|--------------|--------------------------|------------------------|---------|
| <i>LMP2</i> | 123.79 | 1263.64 | 0.008 |
| <i>LMP7</i> | 49.87 | 246.99 | 0.041 |
| <i>B2M</i> | 1315.12 | 24002.5 | 0.006 |
| HC HLA | 601.93 | 13409.6 | 0.14 |
| <i>TAP1</i> | 46.82 | 105.81 | 0.190 |
| <i>TAP2</i> | 53.09 | 30.89 | 0.204 |
| Tapasin | 1058.63 | 891 | 0.615 |
| Calnexin | 2759.18 | 280.69 | 0.201 |
| Calreticulin | 6353.84 | 428.89 | 0.176 |
| <i>NLRC5</i> | 71.19 | 40.66 | 0.237 |

Expression results of target genes by RealTime RT-PCR showed a down-regulation of *B2M*, *LMP2* and *LMP7* genes in tumor samples compared to PBL samples (Controls) ($p < 0.05$). HC HLA and *TAP1* genes were also down-regulated in lung tumors as compared to Control, but no significant differences were found. Similarly, the expression of other gene sequences in tumors did not show any significant differences compared to controls.

^a Mean values of target gene mRNA copy numbers normalized against *GUSB* mRNA copy numbers.

Supporting Information Table S3. Summary of the microsatellite analysis (LOH affecting *B2M* and HLA class I genes) and *B2M* gene sequencing

| Tumor Samples | ^a LOH Study | | | | | | | | ^d Mutation Study |
|---------------|-------------------------|-------------|-------------|--------------------------|-------------|-------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | HLA class I PBLs Typing | | | HLA class I Tumor Typing | | | Microsatellite markers | | |
| | A* | B* | C* | A* | B* | C* | ^b Chromosome 6 | ^c Chromosome 15 | <i>B2M</i> gene |
| P8 | 03:01/03:01 | 35:01/44:03 | 02:02/04:01 | 03:01 | 35:01 | 04:01 | + | + | - |
| P11 | 35:03/35:08 | 04:01/04:01 | 02:01 | 35:08 | 04:01 | + | N | - | - |
| P16 | 02:01/66:01 | 15:03/45:01 | 05:01/12:03 | 66:01 | N | 12:03 | + | + | - |
| P19 | 29:02/32:01 | 07:02/44:03 | 16:01/07:02 | 29:02 | N | N | + | + | - |
| P23 | 26:01/30:02 | 14:01/18:01 | 05:01/08:02 | 30:02 | 18:01 | 05:01 | + | N | - |
| P25 | 18:01/35:02 | 04:01/12:03 | 24:02/24:02 | 18:01/35:02 | 04:01/12:03 | - | + | - | - |
| P26 | 02:01/03:01 | 27:07/40:01 | 03:04/15:02 | 03:01 | N | 03:04 | + | + | - |
| P32 | 02:01/68:01 | 44:02/51:01 | 02:02/05:01 | 68:01 | 44:02 | 05:01 | N | N | - |
| P33 | 02:01/68:02 | 44:02/53:01 | 04:01/05:01 | 68:02 | 44:02 | 05:01 | N | N | - |
| P34 | 33:01/68:01 | 15:17/27:02 | 02:02/07:01 | 68:01 | 27:02 | 02:02 | + | N | - |

NOTE ^a “N” No results

^b “+” LOH in 1-4 microsatellite markers at chromosome 6; “-” Retention of Heterozygosity (ROH); “N” no results

^c “+” LOH in at least one marker at chromosome 15; “N” No results

^d “-” No mutations detected in exon 1 and exon 2 of *B2M* gene

HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape

Francisco Perea¹, Abel Sánchez-Palencia², Mercedes Gómez³, Mónica Bernal¹, Ángel Concha⁴, Míguela Méndez García¹, Amanda Rocío González-Ramírez^{5,7}, Martín Cherick⁶, Javier Martín⁶, Federico Garrido^{1,7,8}, Francisco Ruiz-Cabello^{1,7,8}, Natalia Aptsiauri^{1,7,8}

¹ Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC Laboratorio Clínico; Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

² Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

³ Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada, Spain

⁴ Servicio de Anatomía Patológica y Biobanco, Complejo Hospitalario Universitario, La Coruña, Spain

⁵ Fundación de Investigación Biosanitaria Alejandro Otero, FIBAO, Granada, Spain

⁶ Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, Spain

⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain

⁸ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada, Granada, Spain.

RESUMEN

Introducción: Los inhibidores de “inmun checkpoints” muestran resultados esperanzadores en el tratamiento del cáncer, pero el beneficio clínico se limita exclusivamente a una parte de los pacientes. **Objetivos:** Nuestro objetivo fue profundizar en las posibles causas de esas diferencias observadas en el tratamiento de los pacientes y proponer una mejor estrategia a la hora de seleccionar los pacientes para tratamiento con inmunoterapia. **Material y Métodos:** Analizamos la densidad y composición de la infiltración tumoral de células T en NSCLC en relación con la expresión de HLA-I y PD-L1. Se analizó la expresión de HLA-I en 68 muestras tumorales y de PD-L1 en 52. También se estudiaron en 6 líneas celulares tumorales de pulmón la expresión de HLA-I y PD-L1 y se analizó la pérdida de heterocigosidad de genes HLA-I mediante un array de SNPs (Inmunochip). **Resultados:** Descubrimos que la expresión positiva de HLA-I, independientemente de PD-L1, es un factor clave que determina un aumento del infiltrado inmunitario. Cuando ambos marcadores se analizaron simultáneamente, identificamos 4 fenotipos de co-expresión de HLA-I y PD-L1. Estos, demostraron diferentes patrones de infiltración tumoral y diferentes características clinicopatológicas, incluyendo el tamaño tumoral (T) y afectación linfática (N). Todos los tumores HLA-I⁺ PD-L1⁺ tuvieron una alta infiltración

con linfocitos T CD8⁺, mientras que la pérdida de HLA-I se asoció con un número reducido significativo de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) con la mayoría de células restringidas al estroma rodeando los nidos tumorales. Los tumores HLA-I PD-L1⁺ tuvieron un tamaño tumoral mayor (T) y un bajo grado de infiltración de células T CD8⁺ representando un fenotipo de inmuno escape que combina dos mecanismos independientes de inmuno evasión: pérdida de HLA-I y aumento de expresión de PD-L1. Mediante un análisis de array de SNPs (ImmunoChip) de líneas tumorales de pulmón descubrimos que la pérdida de heterocigosidad (LOH) con delección completa o parcial de genes HLA-I es el principal mecanismo de alteraciones HLA-I. Este defecto irreversible, que potencialmente podría disminuir la eficacia clínica de la inmunoterapia de cáncer de pulmón, parece estar infravalorado. **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que el análisis de HLA-I puede mejorar la selección de pacientes potencialmente respondedores a inmunoterapia del cáncer.

HLA class I loss and PD-L1 expression in lung cancer: impact on T-cell infiltration and immune escape

Francisco Perea¹, Abel Sánchez-Palencia², Mercedes Gómez³, Mónica Bernal¹, Ángel Concha⁴, Míguela Méndez García¹, Amanda Rocío González-Ramírez^{5,7}, Martín Cherick⁶, Javier Martín⁶, Federico Garrido^{1,7,8}, Francisco Ruiz-Cabello^{1,7,8}, Natalia Aptsiauri^{1,7,8}

¹ Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, UGC Laboratorio Clínico; Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

² Servicio de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

³ Departamento de Anatomía Patológica, Universidad de Granada, Spain

⁴ Servicio de Anatomía Patológica y Biobanco, Complejo Hospitalario Universitario, La Coruña, Spain

⁵ Fundación de Investigación Biosanitaria Alejandro Otero, FIBAO, Granada, Spain

⁶ Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, Spain

⁷ Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain

⁸ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Universidad de Granada, Granada, Spain.

Keywords: Lung Cancer, HLA class I loss, Programmed death ligand 1 (PD-L1), Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs)

Conflict of interest: The authors do not have any conflicts of interest

ABSTRACT

Immune-checkpoint inhibitors show encouraging results in cancer treatment, but the clinical benefit is limited exclusively to a subset of patients. We analyzed the density and composition of tumor T-cell infiltration in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) in relation to PD-L1 and HLA class I (HLA-I) expression. We found that positive HLA-I expression, independently on PD-L1 status, is the key factor determining the increased density of the immune infiltrate. When both markers were analyzed simultaneously, we identified four phenotypes of HLA-I and PD-L1 co-expression. They demonstrated different patterns of tumor infiltration and clinicopathologic characteristics, including the tumor size and lymphatic spread. All HLA-I+/PD-L1+ tumors had a high degree of intratumoral infiltration with CD8+T-lymphocytes, whereas HLA-I loss was associated with a significantly reduced number of tumor infiltrating T-lymphocytes mostly restrained in the stroma surrounding the tumor nest. HLA-I-negative/PD-L1- positive tumors had bigger size (T) and lower grade of infiltration with CD8+T-cells. It represents a cancer immune escape phenotype that combines two independent mechanisms of immune evasion: loss of HLA-I and upregulation of PD-L1. Using GCH-array analysis of

human lung cancer cell lines we found that the loss of heterozygosity (LOH) with complete or partial deletion of HLA-I genes is the principal mechanism of HLA-I alterations. This irreversible defect, which could potentially decrease the clinical efficacy of lung cancer immunotherapy, appears to be underestimated. In conclusion, our results suggest that the analysis of HLA-I is very important for the selection of potential responders to cancer immunotherapy.

INTRODUCTION

Immunotherapy with antibodies blocking immune checkpoints, including anti-PD-L1, showed durable tumor regression in advanced human cancers [1]. Nevertheless, since only a minority of the patients demonstrates a positive clinical response to check-point inhibitors, the identification of predictive markers and the mechanisms of resistance to immunotherapy become essential. Several studies have proposed that tissue PD-L1 expression, the mutational load, the composition of the inflammatory infiltrate, the presence of Tregs or MDSCs are some of the factors influencing the response to immunotherapy with anti-CTLA-4 and anti-PD-L1 blocking antibodies [2, 3]. There are reasons to believe that the leading cause of the resistance to immunotherapy is the lack of tumor cell immunogenicity, including the loss of tumor expression of HLA class I (HLA-I) antigens, which has been reported in the majority of human malignancies. The expression of HLA-I molecules on tumor cells is an essential factor for the activation of cytotoxic T-lymphocytes. There are only few studies that have analyzed the expression of HLA in the tumor tissue in patients undergoing immunotherapy with “immune checkpoint” inhibitors and only limited data are available on the correlation between the expression of PD-L1 and HLA-I in cancer. It has been known since long time ago that tumors, and particularly non-small cell lung cancer (NSCLC), frequently present alterations in the expression of HLA-I genes, which leads to partial or total absence of these molecules on the surface of tumor cells. This immune escape mechanism is well documented and has been reported and confirmed by us and other groups [4–8]. It has been demonstrated in mouse experimental models and in human cancers that during natural cancer progression tumors gradually lose MHC-I expression as a result of a T-cell mediated immune selection. At early cancer stages MHC-I positive malignant cells are destroyed by cytotoxic T-cells (CTLs), while tumors at more advanced stages become MHC-I negative. This transition to MHC-I negative tumors is also characterized by important changes in tumor microenvironment and tissue reorganization [9, 10]. It has been also shown that the pre-existing CD8+T cells at the invasive tumor margin are closely associated with PD-1/PD-L1 expression and may predict the response to the treatment with antibodies [11]. Hence, density and localization of the CD8+T-cells may substantially affect the clinical efficacy of the anti- PD-1/PD-L1 therapies. Interestingly, a new

classification of cancer has been proposed based on the pattern of T-cell infiltration and expression of PD-L1 [12] and four different tumor microenvironment phenotypes have been identified in association with the clinical response to anti-PD-L1 therapy. Recent findings have demonstrated different immune profiles in non-responders, suggesting a potential role of the tumor immune microenvironment in the response to anti-PD-L1 therapy [13].

Recently, Zou and colleagues proposed a definition of two different tumor microenvironment profiles related to the clinical response to anti-PD-1 therapy: ‘inflamed cancer’ characterized by an active response to treatment, and ‘non-inflamed cancer’ with limited or zero response. An ‘inflamed cancer’ responsive to PD-1 pathway blockade could be characterized by several biomarkers, including high levels of PD-L1 expression, Th1-type chemokines, infiltrating T-cells, mutations, and low levels of immune suppressive elements [9,20]. Although all these elements are important for predicting the possible objective responses to immunotherapy, we believe that one of the most essential and critical predictive factors of a positive response to immunotherapy is an intact antigen presentation machinery in tumor cells. In this context, in a recent study we found a close association between the HLA-I expression and an inflammatory pattern in tumor tissues [21]. We characterized two types/stages of tumor tissue organization: so-called “permissive” type, with T-cells infiltrating tumor mass in a direct contact with HLA-I positive cancer cells; and a “non-permissive” structure with TIL-free HLA-I negative tumor encapsulated by stroma. The latter one is an example of tumor escape phenotype with high probability of resistance to immunotherapy, since it is negative for HLA-I expression and has a dense mesh of stromal tissue surrounding tumor nest, which restrains CD8⁺ T-lymphocytes and other immune cells [21].

Here we examined the density of tumor infiltration, its composition and association with the expression of PD-L1 and HLA-I in both freshly collected cryopreserved and paraffin-embedded tissues from patients with NSCLCs. We analyzed the correlation between the obtained data and patients’ clinicopathologic characteristics in order to identify potential predictive biomarkers of response to cancer immunotherapy.

RESULTS

Immunohistochemical analysis of PD-L1 and HLA-I expression in human NSCLCs samples.

The expression of HLA-I antigens was evaluated in 68 tissue lung cancer tissue samples by immunohistochemical staining using antibodies against monomorphic determinants of HLA-ABC complex, locus-specific antibodies and anti- β 2-microglobulin (B2M) antibodies. The

most frequent alteration detected in cryopreserved sections was a total loss or downregulation of HLA-ABC molecules, which was detected in 30 out of 68 cases (44%), although we also observed partial losses of HLA-A and HLA-B loci. No significant association was found between HLA-I expression and clinicopathologic characteristics of the patients (Table 1). Figure 1 depicts representative images of different HLA-I immunolabeling patterns in the studied tumor samples.

The expression of PD-L1 by immunohistochemistry was evaluated in 52 tumors (Table 2) and three different patterns of expression were observed: negative for PD-L1 (31 samples out of 52), positive PD-L1 expression and heterogeneous PD-L1 expression (21 tumors altogether). In PD-L1 negative tumor samples some stromal cells, morphologically similar to macrophages, were labeled positively for PD-L1. In tumors with heterogeneous PD-L1 expression some tumor cells and macrophages were labeled positively. In PD-L1 positive tumors the majority of tumor cells were positive with various intensity of immunolabeling. For statistical analysis we classified all the tumors in two groups: PD-L1-negative tumors and positive/heterogeneous tumors. Representative immunolabeling patterns of PD-L1 expression in the studied tumors are shown in Figure 2. Correlation between the PD-L1 expression and clinical characteristics of the patients are summarized in Table 2. We did not see any significant correlation between PD-L1 expression and most of the clinical parameters. However, we found an association between positive PD-L1 expression and tumor stage. The majority of PD-L1 positive/heterogeneous tumors were at more advanced stages II+III as compared to PD-L1-negative tumors (Table 2).

We did not find any significant correlation between HLA-I and PD-L1 expression. There were both HLA-I positive/PD-L1 negative and HLA-I negative/PD-L1 positive cases. Although there was no direct association between tumor stage/grade and HLA-I or PD-L1 expression analyzed separately, we saw interesting results when we combined HLA-I and PD-L1 expression and classified tumors into the following four groups: 1) HLA-I+/PD-L1+, 2) HLA-I+/PD-L1-, 3) HLA-I-/PD-L1+ and 4) HLA-I-/PD-L1-. We found an association between HLA-I/PD-L1 expression and tumor grade (Table 3) and were able to demonstrate what impact has HLA-I expression in PD-L1-positive tumors, as well as the value of PD-L1 expression in HLA-I negative tumors. Thus, HLA-I expression appeared to be an important factor associated with primary tumor size (T) in PD-L1-positive tumors: the majority of HLA-I-/PD-L1+ tumors had larger tumor size (T3+T4), as compared to HLA-I+/PD-L1+ tumors ($p < 0.023$) and HLA-I-/PD-L1- tumors ($p < 0.008$) (Table 3). Interestingly, HLA-I+/PD-L1- tumors demonstrated phenotype most favorable for tumor rejection with the majority of these cases (64%) having stage I (not shown).

Table 1: Clinical features of lung cancer patients and tumor HLA class I expression

| Clinical Features | HLA-I expression | | p-value |
|-----------------------------------|---|--------------------------|---------|
| | Positive or heterogeneous n = 38 (56%) | Negative n = 30 (44%) | |
| Age | | | |
| Mean: 67 (45–82) | | | |
| Sex | | | |
| Male: 53 (78%) | 26 (68%) | 27 (93%) | 0.014 |
| Female: 15 (22%) | 12 (32%) | 3 (7%) | |
| Smoking History | | | |
| Smoker: 59 (88%) | 34 (90%) | 25 (86%) | 0.719 |
| No smoker: 9 (12%) | 4 (10%) | 5 (14%) | |
| Primary Tumor | | | |
| T1:19 (30%) | 11 (31%) | 8 (28%) | 0.790 |
| T2: 36 (56%) | 20 (57%) | 16 (55%) | |
| T3 and T4: 9 (14%) | 4 (12%) | 5 (17%) | |
| Nodal status | | | |
| N0: 49 (78%) | 28 (80%) | 21 (75%) | 0.635 |
| N1 and N2: 14 (22%) | 7 (20%) | 7 (25%) | |
| Tumor stage | | | |
| I: 34 (54%) | 20 (57%) | 14 (50%) | 0.572 |
| II and III: 29 (46%) | 15 (43%) | 14 (50%) | |
| Grade | | | |
| Well/moderate: 37 (57%) | 23 (64%) | 14 (48%) | 0.206 |
| Poor: 28 (43%) | 13 (36%) | 15 (52%) | |
| Histology | | | |
| Squamous cell carcinoma: 32 (49%) | 17 (47%) | 15 (52%) | 0.432 |
| Adenocarcinoma: 31 (48%) | 17 (47%) | 14 (48%) | |
| Large cell carcinoma: 2 (3%) | 2 (6%) | 0 (0%) | |

HLA-I/PD-L1 tumor expression and immune infiltration

We analyzed inflammatory infiltrate in immunolabeled NSCLC samples, including the distribution and quantification. Figure 1 depicts representative images of tumor infiltration with CD8+ T-cells. None of the analyzed cell populations (CD45+, CD45RO+, CD3+ and CD8+) showed any association with the clinicopathologic characteristics of the tumors/patients. However, analysis of the association between HLA-I expression and tumor infiltration revealed that the mean rank of CD8+ cell numbers was significantly higher in HLA-I positive tumors than in HLA-I negative ones, ($p < 0.0001$) (Figure 3A). Similar results were obtained using the CD45RO memory T cell which prevail in HLA-I positive as compared to HLA-I negative tumors, ($p < 0.007$) (data not shown). There were no significant differences for other studied markers (CD45, CD3 and T regulatory Foxp3+ cells, data not shown).

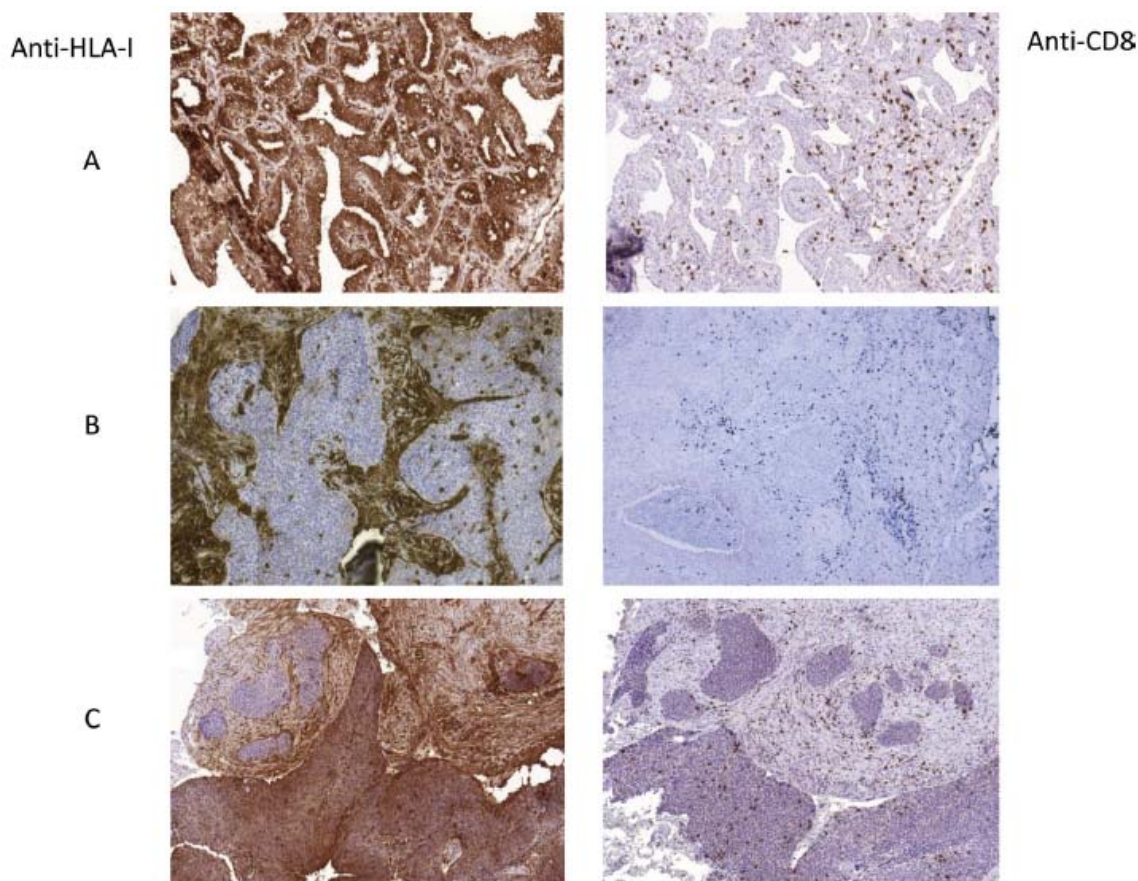


Figure 1: Representative images of tumor HLA-I expression and CD8+ T-cell infiltration patterns. (A) HLA-I positive and highly infiltrated cryopreserved tumor, (B) HLA-I negative tumor with mostly peritumoral stromal infiltration pattern, (C) tumor with heterogeneous HLA-I expression and heterogeneous pattern of infiltration. Intratumoral T-cells in HLA-I positive zone and stromal/peritumoral T-cell localization in HLA-negative areas. In B and C the samples were paraffin-embedded. All Images are at 10× magnification.

The analysis of the association between PD-L1 expression and infiltration did not reveal statistically significant correlations. We found a greater infiltration in PD-L1 positive/heterogeneous than PD-L1 negative tumor, but the differences were not statistically significant ($p=0.250$, Figure 3B). Importantly, when we combined the expression of HLA-I and PD-L1 we found that the phenotypes with the highest degree of tumor infiltration with CD8+ T-cells were HLA+/PDL+ and HLA+/PDL1-, while HLA-/PDL+ tumors almost did not have any intratumoral lymphocytes (Figure 4).

Table 2: Clinical features of lung cancer patients and tumor PD-L1 expression

| Clinical Features | PD-L1 expression | | p-value |
|-----------------------------------|---|--------------------------|---------|
| | Positive or heterogeneous n = 21 (40%) | Negative n = 31 (60%) | |
| Age | | | |
| Mean: 67 (45–82) | | | |
| Sex | | | 0.142 |
| Male: 39 (75%) | 18 (86%) | 21 (68%) | |
| Female: 13 (25%) | 3 (4%) | 10 (32%) | |
| Smoking History | | | 0.382 |
| Smoker: 46 (88%) | 20 (95%) | 26 (84%) | |
| No smoker: 6 (12%) | 1 (5%) | 5 (16%) | |
| Primary Tumor Grade | | | 0.494 |
| T1: 12 (25%) | 4 (22%) | 8 (27%) | |
| T2: 26 (55%) | 9 (50%) | 17 (59%) | |
| T3 and T4: 9 (20%) | 5 (28%) | 4 (14%) | |
| Nodal status | | | 0.181 |
| N0: 33 (72%) | 10 (59%) | 23 (79%) | |
| N1 and N2: 13 (28%) | 7 (41%) | 6 (21%) | |
| Tumor stage | | | 0.037 |
| I: 20 (44%) | 4(24%) | 16 (55%) | |
| II and III: 26 (56%) | 13 (76%) | 13 (45%) | |
| Grade | | | 0.962 |
| Well/moderate: 26 (53%) | 10 (53%) | 16 (53%) | |
| Poor: 23 (47%) | 9 (47%) | 14 (47%) | |
| Histology | | | 0.345 |
| Squamous cell carcinoma: 23 (46%) | 11 (57%) | 12 (39%) | |
| Adenocarcinoma: 25 (50%) | 7 (38%) | 18 (58%) | |
| Large cell carcinoma: 2 (4%) | 1 (5%) | 1 (3%) | |

In a previous study we were able to distinguish different patterns of infiltration and localization of different immune cell subpopulations in relation to tumor nest and stroma: 1) pattern of intratumoral infiltration with T-cells and macrophages and only few immune cells in the stroma; 2) stromal pattern with lymphocytes/macrophages residing only outside the tumor nest in the surrounding stroma [21]. We also observed a significant correlation between tumor HLA-I expression, the infiltration pattern and tumor/stroma tissue organization. Tumors with HLA-I expression demonstrated a “permissive” tissue architecture when tumor cells have a direct contact with infiltrating CD8+ T-cells and are not surrounded by highly organized stromal margin. On the contrary, tumors with lost or significantly reduced HLA-I expression showed predominantly peritumoral localization of activated immune cells with tumor nest encapsulated by well-formed stromal tissue.

Here we investigated the association of these two types of tumor tissue patterns with the expression of PD-L1. Based on the obtained results we classified tumors into following groups based on the expression of HLA-I and PD-L1: 1) HLA-I+/PD-L1+, 2) HLA-I+/PD-L1-, 3) HLA-I-/PD-L1+ and 4) HLA-I-/PD-L1-. We discovered that the infiltration pattern depends on the HLA-I phenotype more than on the expression of PD-L1. Interestingly, in tumors with

heterogeneous HLA-I expression we were also able to see such an HLA-I-dependent distribution of CD8+ T-lymphocytes (Figure 1), where TILs can be seen only in HLA-I-positive tumor nests, while in HLA-I negative areas tumor-infiltrating cells are restricted only to the stromal area in the tumor margin. Among all the observed HLA-I/PD-L1 combinations (Table 3), HLA-I negative tumors demonstrated higher incidence of a stromal infiltration along the tumor border without TILs, while all double positive tumors had intratumoral infiltration. Thus, 100% of the HLA-I+/ PD-L1+ tumors had TILs, while in tumors with loss of HLA-I and positive expression of PD-L1 (HLA-I-/PD-L1+) the percentage of tumors with TILs was reduced to 37% ($p<0.003$, Table 3). Similarly, a comparative analysis of HLA-I+/PD-L1+ and HLA-I-/PD-L1- tumors demonstrated that double negative tumors have lower incidence of intratumoral lymphocyte infiltration compared to double positive ones ($p<0.001$) (Table3).

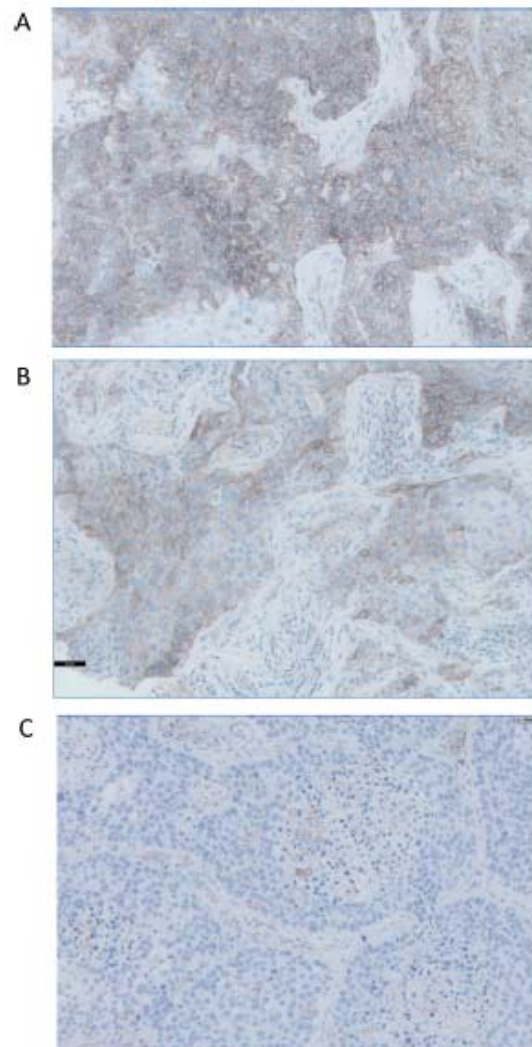


Figure 2: Representative images of three paraffin-embedded tumors with different patterns of PD-L1 expression. (A) homogeneously positive, (B) heterogeneous pattern with PD-L1-positive and -negative cell, and (C) negative PD-L1 expression. Immunohistochemistry kit PD-L1 22C3 pharmDx was used to detect the expression of PD-L1, which was defined as positive when tumor cells showed a membranous staining of any intensity. All Images are at 40x magnification.

Table 3: Correlation between primary tumor (T), HLA-I/PD-L1 expression and lymphocyte infiltration pattern

| HLA-I Expression | Positive | | Negative | | p-value |
|----------------------|-----------|----------|-----------|----------|--------------------|
| | *Positive | Negative | *Positive | Negative | |
| Primary Tumor (T) | | | | | |
| T1:12 | 1 (10%) | 6 (43%) | 3 (38%) | 2 (13%) | ^b 0.023 |
| T2: 26 | 8 (80%) | 5 (36%) | 1 (12%) | 12 (80%) | ^c 0.008 |
| T3 and T4: 9 | 1 (10%) | 3 (21%) | 4 (50%) | 1 (7%) | |
| Infiltration pattern | | | | | |
| TILs: 34 | 13 (100%) | 11 (73%) | 3 (37%) | 7 (44%) | ^d 0.003 |
| Stromal : 18 | 0 (0%) | 4 (27%) | 5 (63%) | 9 (56%) | ^e 0.001 |

^aPD-L1 positive tumor group includes tumors with both heterogeneous and homogeneous expression patterns.

^bp-value for the difference between HLA-I-/PD-L1+ with HLA-I+/PD-L1+ tumor phenotypes and T2 and T3+T4 grades.

^cp-value for the difference between HLA-I-/PD-L1+ with HLA-I-/PD-L1- tumor phenotypes and T2 and T3+T4 grades.

^dp-value for the difference between HLA-I+/PD-L1+ with HLA-I-/PD-L1+ tumor phenotypes.

^ep-value for the difference between HLA-I+/PD-L1+ with HLA-I-/PD-L1- tumor phenotypes.

Analysis of HLA-I and PD-L1 expression in human lung cancer cell lines

As shown in Supplementary Table 1, all the studied cell lines demonstrated positive but variable levels of expression of HLA-I y PD-L1 as measured by flow cytometry. HLA-I expression was positively correlated with qRT-PCR levels of expression of B2M y NLRC5, a transcriptional factor regulating HLA-I expression (Supplementary Figure S1). However, we did not see a correlation with mRNA expression levels of HLA-I heavy chain and components of the antigen presentation machinery (APM), including TAP1/2, LMP2/7, tapasin, and calreticulin (data not shown). Notably, loss of HLA-I haplotype detected in some cell lines (Supplementary Table 2) did not result in reduced cell surface expression of HLA-I. Thus, SK-LU-1 y CALU-6 cell lines have second and third highest MFI numbers despite the loss of one HLA-I heavy chain gene copy due to the haplotype loss. IFN-gamma treatment increased HLA-I expression in all studied cell lines except for SK-LU-1 cells. PD-L1 expression both in baseline conditions and after incubation with IFN-gamma also varied between the cell lines (Supplementary Table 1).

Loss of heterozygosity (LOH) in HLA-I region of chromosome 6 in human lung cancer cell lines

The results of HLA genotyping in the studied cell lines showed homozygosity for the HLA-A/B/C and HLA-DR/DP/DQ genes in 3 out of 6 cell lines and homozygosity for HLA-B/C in cell line A-427 (Supplementary Table 2). Since we did not have autologous normal DNA corresponding to the studied cell lines we investigated the possibility of loss of heterozygosity (LOH) in the chromosome 6 using Infinium Global Screening Array-24 (Figure 5). A joined analysis of copy number (CN) and beta-allele frequencies of chromosome 6 using a genotyping array demonstrated extended LOH in SK-LU-1 and CALU-6 (not shown) on both arms of

chromosome 6. LOH was also observed in A427 cells, but restricted to the HLA-B and HLA-C region. SK-MES cells showed intermediate results, with extensive LOH only on the short arm of chromosome 6. LOH analyzed together with the CN data uncovered a complex pattern. A427 cells showed no CN changes in LOH regions, while SKLU-1 showed deletions in LOH regions of HLA Class I and II genes. SK-MES have the most CN aberrations with deletions in all classical HLA alleles (A/B/C/DR/DP/DQ). Taken together, obtained results of HLA genotyping and gene arrays suggest a pattern of hemizyosity indicating the deletion of all or part of the HLA region. These results are comparable with the data previously obtained from microdissected tumor nests of HLA-I negative tumors [21].

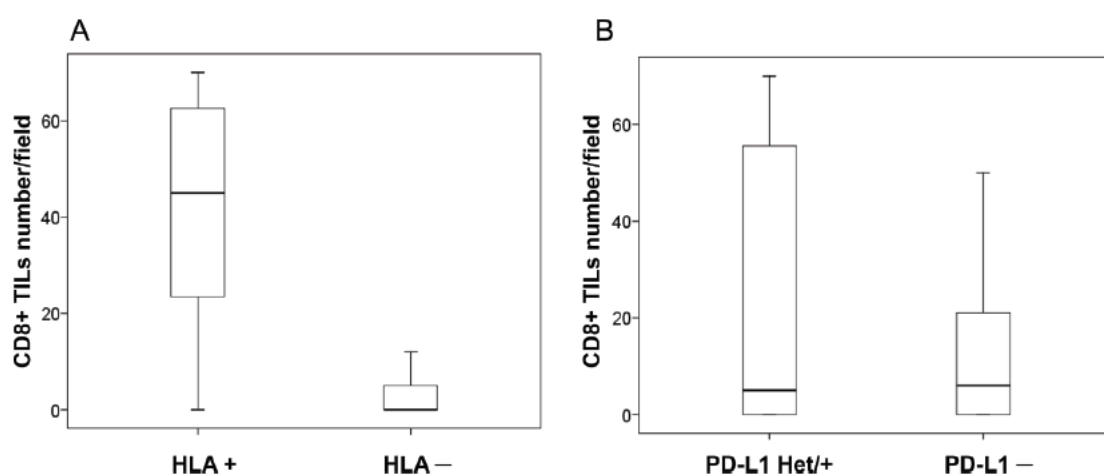


Figure 3: Immune infiltration and HLA-I and PD-L1 expression in cryopreserved tumor samples. (A) HLA-I positive tumors with higher degree of CD8+T-cell infiltration according to cell counts ($p < 0.05$); (B) no statistically significant difference in CD8+ infiltration between PD-L1 positive/heterogeneous and PD-L1 negative tumors ($p = 0.250$). U Mann Whitney test was used to evaluate statistical differences.

DISCUSSION

Reduced expression of tumor HLA-I is an important immune escape mechanism from cytotoxic T-cells (CTL) described in various types of cancer, which frequently is associated with poor prognosis and resistance to immunotherapy [10-14,22]. In addition, a specific mechanisms through which cancer adapts to evade an antitumor immune response, is upregulation of inhibitory checkpoint molecules, including PD-L1, a molecule also expressed by tumor cells which induces inhibition of CTL activation by binding to its receptor PD-1[1-4]. The development of novel immunotherapy agents, such as antibodies blocking immune checkpoint inhibitors PD-1 and PD-L1, improves the capacity of the immune system to attack tumors cells, including lung cancer. However, many patients either do not show any clinical

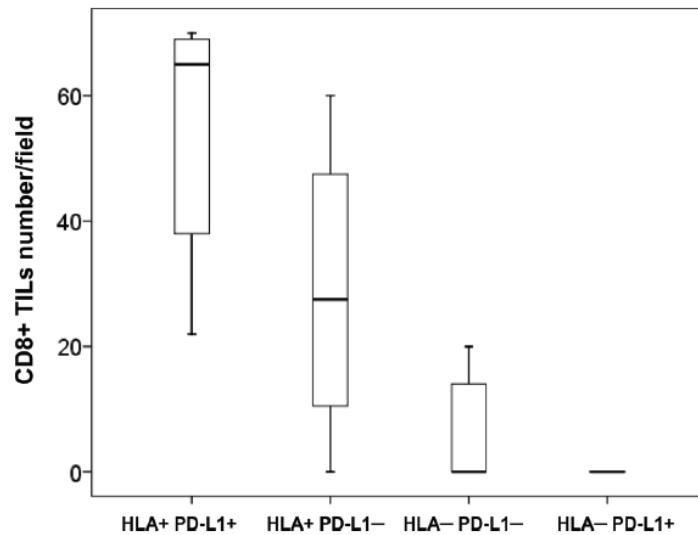


Figure 4: Combined HLA-I/PD-L1 expression phenotypes and CD8+ T-cell infiltration in cryopreserved NSCLC tumors. HLA-I+ tumors (with or without PD-L1 expression) showed a greater infiltration with CD8+ cells than HLA-I-/PD-L1+ tumors (measured as number of cells per field at 40x magnification) ($p = 0.000036$). Kruskal- Wallis test was used to evaluate statistical differences between the groups.

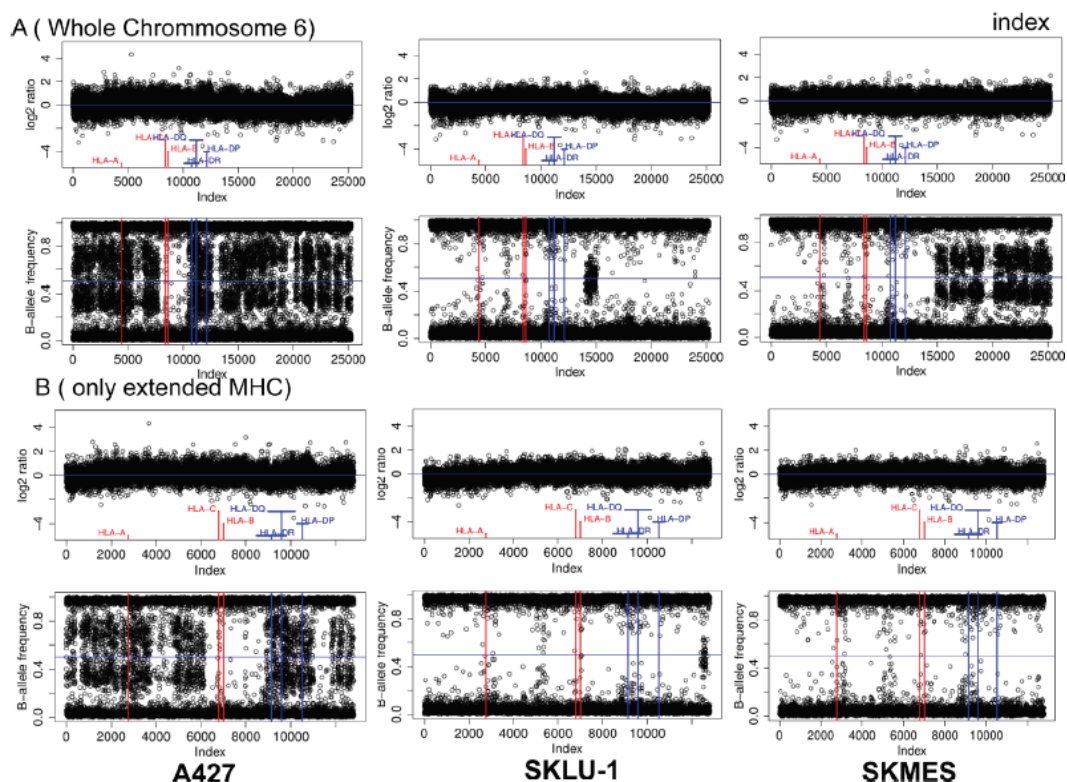


Figure 5: HLA-I gene deletion in human lung cancer cell lines. Joined copy number (CN) and loss of heterozygosity (LOH) analysis of (A) chromosome 6 and as a zoom B) the extended MHC region of three cell lines (A427, SKLU-1, SKMES). The upper part of each subfigure depicts the CN analysis in the form of Log2-ratios while the lower part shows the corresponding LOH analysis in the form of B-allele frequencies. Log2 ratios were calculated by comparing the samples fluorescence values (Illuminas Genome Studio: “R”) to a standard obtained as the median of 1632 unrelated samples. All values have been plotted equidistant ordered by chromosomal position to facilitate the detection of LOH and CN aberrations.

response or do not develop durable response [23]. Hence, identification of the factors that can predict the efficacy of these treatments is yet to be defined. Tumor expression of PD-L1 has been suggested as one of such predictive biomarkers along with tumor immunogenicity and tumor microenvironment with T-cell infiltration, which had been already recognized as positive prognostic indicators in a variety of cancers [8,24-28]. However, the efficacy of “immune checkpoint” blocking antibodies targeting PD-1/PD-L1 axis depends on tumor expression of HLA-I molecules and the limited clinical efficacy of immunotherapy could be partially explained by the tumor HLA-I loss. Only very limited data have been reported to date on the correlation between the expression of PD-L1 and HLA-I in different human tumors.

In this study, we aimed to analyze NSCLC for the expression of tumor PD-L1 and HLA-I in association with the pattern of immune cell infiltration to identify prognostic and predictive markers of cancer progression and response to immunotherapy. Based on the obtained results we grouped studied tumors in four distinct phenotypes of HLA-I and PD-L1 expression, which potentially could have a different association with the response to cancer immunotherapy with antibodies blocking the PD-1/PD-L1 axis. These tumor immunophenotypes showed considerably different patterns of tumor inflammatory infiltration (both the type and the density of the infiltrating immune cells) associated with certain clinicopathologic characteristics, including primary tumor size (T).

Based on the existing knowledge of the mechanisms of cancer immune escape and modulation of the immune response, loss of tumor HLA-I along with positive expression of PD-L1 represent two routes of natural adaptive tumor immune evasion mechanisms and might contribute to the resistance to anti-tumor immunity [22,29-32]. However, the consequence of any of these immune evasion mechanisms can be fundamentally different in the context of immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. In this study, tumor expression of PD-L1, of HLA-I and the immune infiltrate subsets (when all studied separately) did not show a correlation with the clinicopathologic parameters. When we analyzed the HLA-I and PD-L1 expression together (as a reflection of tumor immunogenicity), we saw a significant correlation with clinical characteristics of the patients. Thus, tumors with HLA-I-/PD-L1+ phenotype have more tumor primary extension (T) (Table 3), and less intra-tumor infiltration with CD8+ T-cells (Figure 4) than HLA-I+/PD-L1+ tumors ($p < 0.023$), which makes this phenotype (HLA-I-/PD-L1+) more aggressive from the immunological point. Furthermore, HLA-I-/PD-L1- tumors had smaller size (T) than HLA-I-/PD-L1+ tumors ($p < 0.008$, Table 3), which confirms more aggressive tumor immunophenotype of HLA-I-/PD-L1+ phenotype, which is associated with two mutually exclusive immune-evasion mechanisms: down-regulation of T-cell mediated immunity by PD-L1 expression and silencing of self-antigen presentation by down-regulation

of the HLA-I complex [33]. This phenotype can be responsible for the resistance to immune checkpoint therapy in some patients with high expression of PD-L1 in tumor samples [34].

Remarkably, we also found differences between these immunophenotypes in relation to the localization of CD8+ T-cell infiltrate. HLA-I+/PD-L1+ tumors more frequently show a pattern of intratumoral infiltration, which allows a direct contact with tumor cells (Figure 1). On the contrary, the localization of T-cells in HLA-I-/PD-L1+ tumors is mostly peritumoral/stromal ($p < 0.003$). These two immunophenotypes (HLA-I+/PD-L1+ versus HLA-I-/PD-L1+) could potentially be associated with the response versus resistance to immunotherapy with tumor HLA-I expression being a pivotal factor and a driving force of tumor ejection in response to immunotherapy. In fact, in an earlier study, expression of HLA-I in NSCLC was clearly associated with the pattern of inflammatory infiltration, which we previously classified into two main types and named them as "permissive" (HLA-I positive and highly infiltrated) and "non-permissive" (HLA-I negative with immune infiltrate restrained in the marginal zone of tumor nest) [21].

Teng and co-authors have recently proposed a classification of tumors based on the pattern of tumor PD-L1 expression and infiltration with T-cells [18]. In general, assessment of PD-L1 and the tumor immune contexture as potential predictive markers of the response to checkpoint blockade have some controversies and limitations. It could be attributed to the limitations of the immunohistochemical analysis when only T-cell infiltration is evaluated, and which is not enough to define the complexity of the tumor microenvironment [35-38]. This complexity of the immunoscore evaluation increases due to the fact that infiltration patterns are often heterogeneous even within the same tumor specimen (Figure 1). In addition, the difference in the response may be also associated with the requirement of an increased density of CD8 + T cells in close proximity to PD-1/PD-L1 expressing cells at the invasive tumor margin and inside the tumors [17,39]. Furthermore, the optimal level of tumor PD-L1 expression necessary for an adequate anti-tumor immune response remains to be established.

We strongly believe that tumor HLA-I expression should be included into the evaluation of patients for therapy selection for several reasons. First of all, the recognition of tumor peptides presented by HLA-I to CD8+ T- lymphocytes is the most critical stage during their activation. Second, HLA-I expression is frequently altered in tumors of different histological types [10,33,40]. Third, the emergence of HLA-I negative tumor variants by B2M mutations and defects in genes that regulate the IFN-gamma signaling, occurs during the natural history of cancer [32,41] or after immunotherapy as a result of immune selection [25,42,43]. Finally, natural resistance to cytotoxicity may be irreversible if is caused by mutations in B2M gene or LOH in chromosome 6 harboring HLA-I heavy chain genes.

We have data demonstrating that HLA-I loss caused by B2M mutations is not very common in NSCLC [21] in contrast to what has been reported in colorectal cancer and melanoma [40]. However, LOH seems to have relevance as a mechanism of HLA-I loss in NSCLC. This alteration is unnoticed in the majority of HLA-I studies if only immunohistochemistry is used. We have previously observed a total HLA-I loss associated with two simultaneous defects, LOH in chromosome 6 and a downregulation of HLA-I and APM genes [21]. We do not have data on the frequency of LOH at chromosome 6 in tumors with positive HLA-I expression according to immunohistology. However, we have reasons to believe that the frequency of LOH in cancer, especially in NSCLCs, is substantially underestimated. In this context, the data obtained in this study from flow cytometry of six lung cancer cell lines demonstrated that HLA-I positive cells have notable variations in the levels of cell surface expression of HLA-I complex (Supplementary Table 1). However, neither flow cytometry nor immunohistochemical analysis using monomorphic monoclonal antibodies alone can disclose the complexity of all possible alterations in the MHC genes in NSCLCs. In fact, in our study 4 out of 6 cell lines showed total or partial HLA haplotype loss (Figura 5). Furthermore, SK-MES harbored two different alterations: complete LOH of HLA class I and II genes and loss of response to IFN-gamma (Figure 5 and Supplementary Table 1).

These data emphasize the complexity of predicting patients' responses to immunotherapy with high enough probability if all the indicated parameters are not taken into account. In addition, we believe that since HLA losses have been demonstrated in patients in the course of immunotherapy, it is likely that they can explain the delayed relapses observed in some patients after initial tumor regression and despite continuous therapy.

MATERIAL AND METHODS

Clinical and histopathological characteristics of tumor samples

68 NSCLC (non-small cell lung cancer) patients were included in this study. Informed consent approved by the Ethics Committee of our institution was signed by all patients included in this study. Before the study, all medical records and tumor sections were reviewed by an oncologist and a pathologist. Tumor samples were obtained from the Biobank of the Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain) and Complejo Hospitalario Universitario, A Coruña. The specimens included 49% of squamous cell carcinomas (SCC), 48% of adenocarcinomas and 3% of large cell carcinomas based on WHO criteria of the histopathological classification. The tumors were classified as stage I (55% of tumors), and

stage II and III (45% of tumors) based on the American Joint Committee on Cancer guidelines for postsurgical, tumor-node-metastasis (TNM) [44].

Immunohistological analysis of HLA-I, and PD-L1 expression in tumor tissue samples

We analyzed 68 NSCLC tumors in total. All 68 samples were analyzed for HLA expression (Table 1) and 52 samples for PD-L1 expression (Table 2). Most of the tumor specimens were cryopreserved and in some cases both frozen and paraffin-embedded samples were used for PD-L1 expression. Tumor samples were taken from primary malignant lung tumors by excision of a fragment of tumor mass during the initial surgery. After thoracotomy and lung resection, half of the piece was immediately stored at -80°C. Frozen 4–8- μ m-thick tissues sections were cut using a microtome-cryostat (Bright), allowed to dry at room temperature for 4–18 hours, fixed in acetone at 4°C for 10 min, and stored at -40°C. Immunohistological analysis was performed using the Biotin-Streptavidin System (supersensitive Multilink HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands).

The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used in cryopreserved tumor tissues to analyze HLA-I expression: W6/32 against HLA-A, B, and C heavy chain/B2M complex (a gift from Dr. Bodmer, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK); GRH-1, which recognizes free and HLA class I heavy chain-associated β 2-m chain, produced and characterized in our laboratory [45]; HC-10 against free heavy chain of HLA-B and C molecules (Nordic-MUBio, Rangeerweg, The Netherlands), anti-HLA-A which recognizes a subset of HLA-A locus-encoded gene products (1082C5) [46] and 42IB5 against HLA-B locus-encoded gene products 42-IB) [47]. Total loss of HLA-I molecules was defined by negative staining with W6/32 and GRH-1 mAbs according to the criteria established by the HLA and Cancer component of the 1996 International Histocompatibility Workshop [48]. PD-L1 expression was analyzed in 52 tumor samples. We used monoclonal anti-PD-L1 antibody (clone 22C3) and IHC kit PD-L1 22C3 pharmDx (DAKO) and EnVision FLEX System (DAKO, Santa Clara, USA) on 2,5 μ m sections following the manufacturer's recommendations. The sections were dried during 24 hours at 37°C followed by one hour of incubation at 60°C. Antigen retrieval was done using PT LINK reagent (DAKO) at low pH. The immunolabeled sections were digitally analyzed using Ultrafast Scanner 1.6 (Philips) and the images were visualized and photographed using the Intellisite Pathology solution Image Management System 2.4 (Philips). We classified tumors into 2 groups: PD-L1 negative tumors and tumors with positive or heterogeneous PD-L1 expression. Positive PD-L1 expression was defined as positive in tumor cells showing a membranous staining of any intensity.

Study of tumor infiltration by immunohistochemistry

All 68 frozen tumor specimens were analyzed for the presence of tumor infiltrating cells using immunohistochemistry with a panel of specific antibodies. Positive labeling was evaluated by two independent observers who did not know the clinico-pathological characteristics of the corresponding patients. The observers evaluated tissue tumor infiltrates with 10x and 40x objectives by analyzing tissue immunolabeling with the following antibodies: anti-CD45 (clone GRT2 produced in our laboratory) [49], anti-CD45RO (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA), anti-CD8 (clone C8/144B DAKO, Glostrup, Denmark), and anti-CD3 (clone F7.2.38, DAKO, Glostrup, Denmark). Whole tumor sample infiltration was evaluated in 5 different fields under 40x objective and scored as: + (≤ 30 cells/field), ++ (30–70 cells/field), +++ (70–120 cells/field) and ++++ (≤ 120 cells/field). We determined an infiltration score (1–4) for each marker per tumor sample by assigning one point to each cross (+) for subsequent statistical analysis. In addition, for we counted the number of CD8 positive T cells per microscopic field at a 400x magnification. We calculated the average value of the five representative fields examined for each slide.

Baseline and IFN-gamma induced upregulation of HLA-I and PD-L1 in human lung cancer cell lines

The following human lung cancer cell lines were used in this study: A549 (adenocarcinoma), A427 (epidermoid carcinoma), CALU-1 (epidermoid carcinoma), CALU-6 (large cell carcinoma), SK-LU-1 (adenocarcinoma), and SK-MES (adenocarcinoma). All cell lines were obtained from the American Type Tissue Collection. Cells were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Sigma-Aldrich) or RPMI medium supplemented with 10% FBS (Life Technologies), 2 mmol/L glutamine (Sigma-Aldrich), and antibiotics. In some experiments, cell lines were treated with 500 U/mL IFN- γ for 48 hours (Sigma-Aldrich) before FACS analysis. PE-conjugated anti-CD274 (BD Bioscience, San José, California, USA) and APC-conjugated anti HLA-ABC monoclonal antibody, (purchased from e-Bioscience) were used for PD-L1 and HLA-I analysis, respectively (eBioscience, Sandiego, California, USA). Cells were incubated with primary antibodies for 30 min at 4 °C and analyzed on a FACSCanto cytometer (BD Biosciences). Isotype-matched nonimmune mouse IgGs conjugated with FITC and APC served as controls. The results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

HLA-I genomic typing in human cancer cell lines

DNA from NSCLC cell lines were used to perform HLA-I genomic typing with the LIFECODES HLA-A, -B and -C Typing Kits – Rapid (IMMUCOR, Stanford, USA) following the manufacturer's instructions. The Luminex 100/200™ System, based in xMAP Technology

(Luminex®, Austin, Texas, USA) was used to analyze HLA-I typing, and consequently, to detect haplotype, locus or allele losses in HLA-I genes in tumor samples.

Array-based comparative genomic hybridization (array-CGH)

DNA samples from lung cancer cell lines and controls were genotyped using the Illumina Infinium assay on the Immunochip according to manufacturer protocol, which detects about 200,000 SNPs selected based on GWAS of the diseases of the immune system. Data for loss of heterozygosity (LOH) analysis and copy number (CN) analysis were obtained from the Illumina Genome studio software as "theta" and "R" values. "Theta" represents the B-allele frequency and "R" the joined fluorescence intensity of both channels. While "theta" can be interpreted directly to detect LOH using e.g. BCFtools [PMID:26826718], "R" needs to be compared to a standard to detect regions of copy number loss or gain. We used immunochip data from 1632 unrelated samples of European ancestry to obtain a median fluorescence value per probe to create such a standard and to subsequently obtain Log-ratios. A Log-ratio distribution around zero can be regarded as CN neutral, while chromosomal intervals of mainly positive (or negative) log-ratios can be interpreted as CN gains (or loss). Chromosomal stretches of B-allele frequencies with values of mainly zero or one can be interpreted as LOH.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using the Statistical Package for the IBM-SPSS Statistics Ver.21. To check for normality we used Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests. Variables with normal distribution are expressed as means with standard deviation. Variables with non-normal distribution are expressed as medians and interquartile range. In the case of quantitative variables, differences among all study groups were evaluated by using a t-test in case of normality or a non-parametric test (Wilcoxon or Mann Whitney Test) for non-normal variables, when two groups were compared. We performed Kruskal-Wallis test in case of non-normal variables when more than two groups were compared.

Categorical variables, such as sex, smoking history, tumor stage, PD-L1 expression were coded in two groups and analyzed using the chi-square (X^2) or Fisher's exact test in case when the validity criteria were not reached. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Svitlana Zinchenko for technical assistance. This work was supported by the grants from Spanish Institute of Health Carlos III (ISCIII, Instituto Carlos III) co-financed

by European Union (FEDER-Fondo Europeo de Desarrollo Regional) (PI12/02031, PI08/1265, PI11/01022, PI11/01386, RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165, PT13/0010/0039, PI14/01978, PI16/00752) and by the Junta de Andalucía in Spain (Groups CTS-143, CTS-695, CTS-3952, CVI-4740, PI 09/0382 grant). This study is part of the doctoral thesis of Francisco Perea.

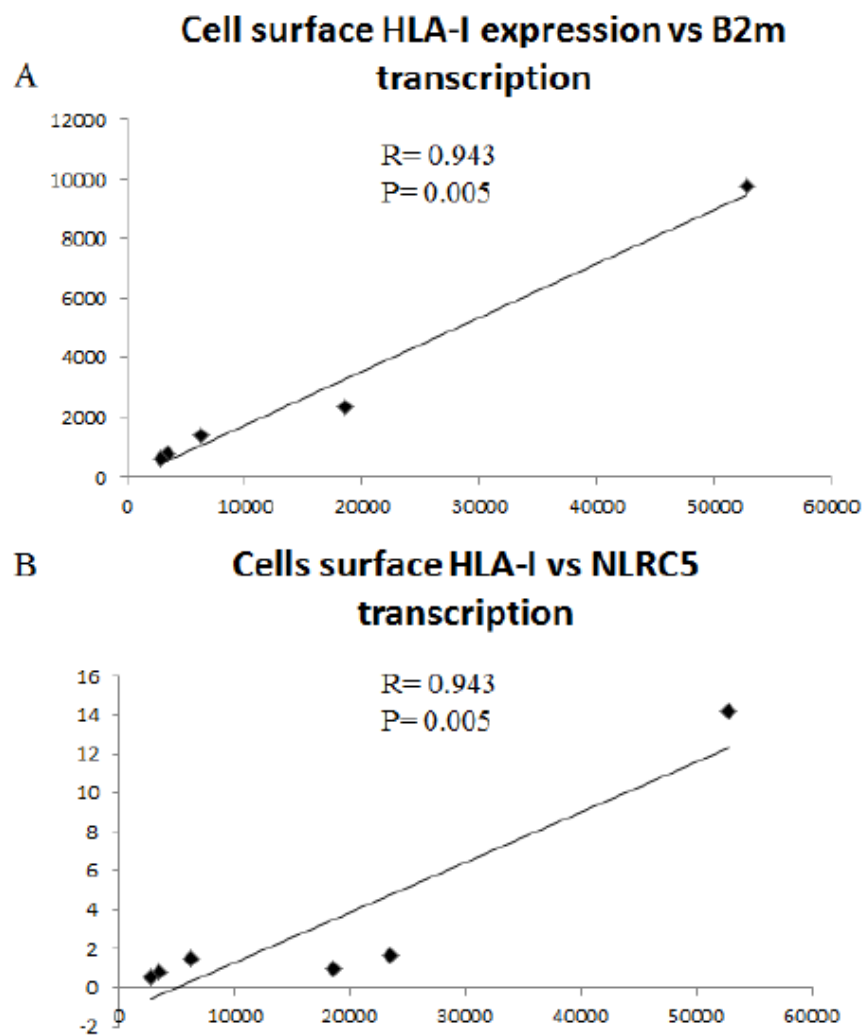
REFERENCES

1. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, 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*. 2000; 192:1027-1034.
2. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001; 2:261-268.
3. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012; 12:252-264.
4. Topalian S, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24:207-212.
5. Nomi T, Sho M, Akahori T, Hamada K, Kubo A, Kanehiro H, Nakamura S, Enomoto K, Yagita H, Azuma M, Nakajima Y. Clinical significance and therapeutic potential of the programmed death-1 ligand/programmed death-1 pathway in human pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:2151-2157.
6. Thompson RH, Dong H, Lohse CM, Leibovich BC, Blutte ML, Cheville JC, Kwon ED. PD-1 is expressed by tumor-infiltrating immune cells and is associated with poor outcome for patients with renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:1757-1761.
7. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kaluh J, Odunsi K, Pito HC, Hamid O, Bhatia S, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med*. 2012; 366:2455-2465.
8. Charoentong P, Finotello F, Angelova M, Mayer C, Efremova M, Rieder D, Hackl H, Trajanoski Z. Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. *Cell Rep*. 2017; 18:248-262.
9. Zito Marino F, Ascierto PA, Rossi G, Staibano S, Montella M, Russo D, Alfano R, Morabito A, Botti G, Franco R. Are tumor-infiltrating lymphocytes protagonists or background actors in patient selection for cancer immunotherapy? *Expert Opin Biol Ther*. 2017; 17:735-746.
10. Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today*. 1993; 14:491-499.
11. Marincola FM, Jafee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000; 74:181-273.
12. Koopman LA, Corver WE, Van Der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations at chromosome 6p cause frequent and heterogeneous HLA class I antigen loss in cervical cancer. *J Exp Med*. 2000; 191:961-976.
13. Seliger B, Stoehr R, Handke D, Mueller A, Ferrone S, Wullich B, Tannapfel A, Hofstaedter F, Hartman A. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 59:529-540.
14. Challa-Malladi M, Lieu YK, Califano O, Holmes AB, Bhagat G, Murty VV, Domínguez-Sola D, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Combined genetic inactivation of β 2-Microglobulin and CD58 reveals frequent escape HLA-I loss expression and tissue structure in lung cancer from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2011; 20:728-740.
15. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol Immunother*. 2017; 66:259-271.
16. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol*. 2016; 39:44-51.
17. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJM, Robert L, Chmielowski B, Spasic M, Henry G, Ciobanu V, West AN, Carmona M, Kivork C, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014; 515:568-571.

18. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, Smyth MJ. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res.* 2015; 75:2139–2145.
19. Herbst RS, Soria JC, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, Sosman JA, McDermott DF, Powderly JD, Gettinger SN, Kohrt HEK, Horn L, Lawrence DP, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature.* 2014; 515:563–567.
20. Zou W, Wolchok JD, Chen L. PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: mechanisms, response biomarkers and combinations. *Sci Transl Med.* 2016; 8:328rv4.
21. Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, Carretero J, Torres C, Bayarri C, Gómez-Morales M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *International Journal of Cancer.* 2017; 140:888-899.
22. Restifo NP, Smyth MJ, Snyder A. Acquired resistance to immunotherapy and future challenges. *Nat Rev Cancer.* 2016; 16:121-127.
23. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon RA, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, et al. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N Engl J Med.* 2013; 369:122–133.
24. O'Donnell JS, Long GV, Scolyer RA, Teng MW, Smyth MJ. Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition. *Cancer Treat Rev.* 2017; 71-81.
25. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, Escuin-Ordinas H, Hugo W, Hu-Lieskovan S, Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Sandoval S, Barthly L, Saco J, Homet Moreno B, Mezzadra R, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med.* 2016; 375:819-29.
26. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, Lee W, Yuan J, Wong P, Ho TS, Miller ML, Rekhtman N, Moreira AL, et al. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science.* 2015; 348:124–128.
27. Hugo W, Zaretsky JM, Sun L, Song C, Moreno BH, Hu-Lieskovan S, Berent-Maoz B, Pang J, Chmielowski B, Cherry G, Seja E, Lomeli S, Kong X, et al. Genomic and Transcriptomic Features of Response to Anti-PD-1 Therapy in Metastatic Melanoma. *Cell.* 2016; 165:35-44.
28. Smyth MJ, Ngiow SF, Ribas A, Teng MW. Combination cancer immunotherapies tailored to the tumour microenvironment. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:143-158.
29. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol Immunother.* 2017; 66:259-271.
30. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, Garcia Lora AM, van Hall T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2016; 39:44-51.
31. del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, Zinchenko S, Méndez R, González-Aseguinolaza G, Ruiz-Cabello F, Aamdal S, Gaudernack G, Garrido F, Aptsiauri N. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer.* 2014; 134:102-113.
32. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010; 127:249-256.
33. Aust S, Felix S, Auer K, Bachmayr-Heyda A, Kenner L, Dekan S, Meier SM, Gerner C, Grimm C, Pils D. Absence of PD-L1 on tumor cells is associated with reduced MHC I expression and PD-L1 expression increases in recurrent serous ovarian cancer. *Sci Rep.* 2017; 7:42929.
34. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med.* 2015; 373:23-34.
35. Del Mar Valenzuela-Membrives M, Perea-García F, Sanchez-Palencia A, Ruiz-Cabello F, Gómez-Morales M, Miranda-León MT, Galindo-Angel I, Fárez-Vidal ME. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016; 7:71608-71619.
36. Chevrier S, Levine JH, Zanotelli VRT, Silina K, Schulz D, Bacac M, Ries CH, Ailles L, Jewett MAS, Moch H, van den Broek M, Beisel C, Stadler MB, Gedye C, et al. An Immune Atlas of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Cell.* 2017; 169:736-749.
37. Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, Amir ED, Elefant N, Bigenwald C, Remark R, Sweeney R, Becker CD, Levine JH, Meinhof K, Chow A, Kim-Shulze S, et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. *Cell.* 2017; 169:750-765.
38. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, Blay JY, Bonneville M, Butterfield LH, Caignard A, Castelli C, Cavallo F, Celis E, et al. Consensus nomenclature for CD8(+) T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology.* 2015; 4:e998538.
39. Bethmann D, Feng Z, Fox BA. Immunoprofiling as a predictor of patient's response to cancer therapy-promises and challenges. *Curr Opin Immunol.* 2017; 45:60-72.

40. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61:1359-1371.
41. Paschen A, Méndez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer.* 2003; 103:759-767.
42. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst.* 1996; 88:100-108.
43. Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jiménez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, et al. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens.* 1998; 52:520-529.
44. Rami-Porta R, Asamura H, Travis WD, Rusch VW. *AJCC Cancer Staging Manual Eighth Edition.* Chichester: Wiley, 2017: 431-456.
45. Lopez-Nevot MA, Cabrera T, De La Higuera B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Production and characterization of monoclonal antibodies against leukemic cells. *Immunologia.* 1996; 5: 51-59.
46. Lozano F, Santos-Aguado J, Borche L, Places L, Domenech N, Gaya A, Vilella R, Vives J. Identification of the aminoacid residues defining an intralocus determinant in the a1 domain of HLA-A molecules. *Immunogenetics.* 1989; 30:50-53.
47. Lozano F, Borche L, Places L, Alberola-Ila J, Gayá A, Vilella R, Vives J. Biochemical and serological characterization of a public antigenic determinant present on HLA-B molecules. *Tissue Antigens.* 1990; 35:193-195.
48. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS, Bensa JC, Bodmer W, Dohr G, Drouet M, Fauchet R, Ferrara GB, Ferrone S, Giacomini P, Kageshita T, Koopman L, et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, ed. *Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication.* Proc. Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. II. France: EDK, Sevres; 1997; 445-452.
49. Huelin C, Gonzalez M, Pedrinaci S, De La Higuera B, Piris MA, San Miguel J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Distribution of the CD45R antigen in the maturation of lymphoid and myeloid series: the CD45R negative phenotype is a constant finding in T CD4 positive lymphoproliferative disorders. *British Journal Cancer.* 1996; 74:1801-1804.

SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure 1: Correlation between HLA surface expression and transcription levels of B2M and NLRC5. (A) Spearman correlation analysis between cell surface HLA-I expression and B2M transcription levels in lung cancer cell lines. (B) Spearman correlation analysis between cell surface HLA-I expression and NLRC5 transcription levels in lung cancer cell lines. HLA-I expression is shown as mean fluorescence intensity (MFI) and the levels of mRNA expression of the B2M and NLRC5 genes as Ct normalized against the housekeeping gene GUS used as a control

Supplementary Table 1: Baseline and IFN-gamma induced cell surface HLA-I and PD-L1 expression in lung tumor cell lines (presented as Medium Fluorescence Intensity, MFI)

| Cell line | | Baseline | IFN-gamma |
|-----------|-------|----------|-----------|
| A-427 | HLA | 2801 | 10687 |
| | PD-L1 | 257 | 271 |
| SKMES | HLA | 3421 | 19534 |
| | PD-L1 | 256 | 378 |
| A-549 | HLA | 6226 | 22585 |
| | PD-L1 | 1197 | 1335 |
| CALU-6 | HLA | 18568 | 41943 |
| | PD-L1 | 1530 | 2702 |
| SKLU-1 | HLA | 23412 | 26438 |
| | PD-L1 | 474 | 356 |
| CALU-1 | HLA | 52825 | 71168 |
| | PD-L1 | 2394 | 6696 |

Supplementary Table 2: HLA genomic typing of lung cancer cell lines

| Line cell | A1 | A2 | B1 | B2 | C1 | C2 | DRB1 1 | DRB1 2 | DQB1 1 | DQB1 2 |
|-----------|----------|----------|----------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| A-427 | 3:01 | 33:01:00 | 35:03:00 | 35:03:00 | 12:03 | 12:03 | 4:04 | 13:02 | 3:04 | 6:03 |
| A-549 | 25:01:00 | 30:01:00 | 18:01 | 44:03:00 | 12:03 | 16:01 | 7:01 | 11:04 | 2:02 | 3:01 |
| CALU-1 | 26:01:00 | 29:02:00 | 15:01 | 44:03:00 | 3:04 | 16:01 | 7:01 | 14:04 | 2:02 | 5:03 |
| CALU-6 | 1:01 | 1:01 | 8:01 | 8:01 | 7:01 | 7:01 | 3:01 | 3:01 | 2:01 | 2:01 |
| SKLU-1 | 24:02:00 | 24:02:00 | 40:02:00 | 40:02:00 | 2:02 | 2:02 | 13:01 | 13:01 | 6:03 | 6:03 |
| SKMES | 3:01 | 3:01 | 7:02 | 7:02 | 7:02 | 7:02 | 16:01 | 16:01 | 5:02 | 5:02 |

The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture

Federico Garrido ^{1,2,3,*}, Francisco Perea ¹, Mónica Bernal ¹, Abel Sánchez-Palencia ⁴, Natalia Aptsiauri ^{2,3} and Francisco Ruiz-Cabello ^{1,2,3}

¹ Servicio de Analisis Clínicos e Inmunología, UGC Laboratorio Clínico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

² Instituto de Investigación Biosanitaria IBS.Granada, Granada, Spain.

³ Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología III, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain.

⁴ Unidad de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

RESUMEN

El escape inmunitario del tumor se asocia con la pérdida de expresión de HLA de clase I (HLA-I) comúnmente encontrada en células malignas. Hay evidencia suficiente que sugiere que la eficacia de la inmunoterapia depende de los niveles de expresión de moléculas HLA-I en las células tumorales. También depende de los mecanismos moleculares que subyacen en la pérdida de expresión de HLA, que puede ser reversible “soft” o irreversible “hard” debido a alteraciones genéticas en genes HLA, β 2-microglobulina o IFN. La selección inmunitaria de las células tumorales HLA-I negativas que albergan alteraciones estructurales irreversibles se ha demostrado tras inmunoterapia en pacientes con cáncer y en modelos experimentales de cáncer. En esta revisión, resumimos descubrimientos recientes indicando que la pérdida de HLA-I tumoral también se asocia con una infiltración de células T intratumoral reducida y con una reorganización específica del tejido tumoral. La selección inmunitaria de células T de los tumores HLA-I negativos resulta en una separación clara entre el estroma y el parénquima tumoral con leucocitos, macrófagos y otras células mononucleares restringidas de la masa tumoral. Un mejor entendimiento de los cambios funcionales y estructurales que tienen lugar en el microambiente tumoral podría ayudar a superar el escape inmunitario y mejorar la eficacia de las diferentes estrategias inmunoterapéuticas. También destacamos la urgencia para el diseño de estrategias para potenciar la expresión de HLA-I del tumor que podría mejorar el rechazo tumoral por los linfocitos T citotóxicos (CTLs).

The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture

Federico Garrido ^{1,2,3,*}, Francisco Perea ¹, Mónica Bernal ¹, Abel Sánchez-Palencia ⁴, Natalia Aptsiauri ^{2,3} and Francisco Ruiz-Cabello ^{1,2,3}

¹ Servicio de Analisis Clinicos e Inmunologia, UGC Laboratorio Clinico, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

² Instituto de Investigacion Biosanitaria ibs.Granada, Granada, Spain.

³ Departamento de Bioquimica, Biologia Molecular e Inmunologia III, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain.

⁴ Unidad de Cirugía Torácica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

Received: 18 November 2016; Accepted: 17 February 2017; Published: 27 February 2017

Abstract: Tumor immune escape is associated with the loss of tumor HLA class I (HLA-I) expression commonly found in malignant cells. Accumulating evidence suggests that the efficacy of immunotherapy depends on the expression levels of HLA class I molecules on tumors cells. It also depends on the molecular mechanism underlying the loss of HLA expression, which could be reversible/“soft” or irreversible/“hard” due to genetic alterations in HLA, β 2-microglobulin or IFN genes. Immune selection of HLA-I negative tumor cells harboring structural/irreversible alterations has been demonstrated after immunotherapy in cancer patients and in experimental cancer models. Here, we summarize recent findings indicating that tumor HLA-I loss also correlates with a reduced intra-tumor T cell infiltration and with a specific reorganization of tumor tissue. T cell immune selection of HLA-I negative tumors results in a clear separation between the stroma and the tumor parenchyma with leucocytes, macrophages and other mononuclear cells restrained outside the tumor mass. Better understanding of the structural and functional changes taking place in the tumor microenvironment may help to overcome cancer immune escape and improve the efficacy of different immunotherapeutic strategies. We also underline the urgent need for designing strategies to enhance tumor HLA class I expression that could improve tumor rejection by cytotoxic T-lymphocytes (CTL).

Keywords: HLA class I loss; tumor infiltrating lymphocytes (TILs); tumor immune escape

1. Introduction

There is a general consensus among immunologists that tumor cells can be recognized and destroyed by CD8⁺ T lymphocytes in vitro and in vivo. Data obtained from different groups support this concept [1–3]. Tumor antigens are presented to CTLs as small peptides via Major Histocompatibility Complex class I molecules (MHC-I, or HLA-I in humans) [4]. It is likely that T cell-mediated immune surveillance is, in fact, destroying nascent tumors during our life time without any noticeable signs of the rejection process. Nevertheless, tumors grow and metastasize without any visible immune control. Different tumor-immune escape mechanisms have been described that could explain the paradox of the absence of a CTL-mediated tumor rejection and the existence of tumor peptides recognized by CD8⁺ T cells [5].

HLA-I loss or downregulation is one of the tumor escape mechanisms widely used by cancer cells to evade T cell-mediated immune destruction [6–9]. Our laboratory has been analyzing in detail different HLA-I-altered phenotypes in human tumors [10] and we have proposed that the molecular mechanism responsible for the HLA-I loss predetermines the possibility to recover normal HLA-I expression and the success of T cell-mediated immunotherapy [11,12]. When the underlying molecular mechanism is reversible, any immunotherapy may activate the release of TH1 type cytokines in the tumor microenvironment, leading to upregulation of HLA-I expression and facilitating tumor rejection. In contrast, if the molecular mechanism is irreversible/“hard”, caused by mutations or Loss of Heterozygosity (LOH) in chromosomes 6 or 15, tumor cells are likely to remain HLA-I negative and subsequently escape immune rejection. This review summarizes these findings, focusing on the newly described association between tumor “rejection” or “escape” phenotypes and corresponding changes observed in tumor tissue architecture.

2. Tumor Immune Escape and HLA Class I Loss

Evidence obtained from different laboratories, including ours, indicate that HLA-I loss is a frequent finding in human primary tumors and in metastases [13,14]. Due to the complexity of the HLA genetic system and the difficulties in measuring the HLA-I expression in human tissue, the available information on tumor HLA-I expression does not always reflect the real pattern and the character of HLA-I alterations [15]. Additional detailed analysis is required to obtain a more accurate picture of HLA-I defects and the underlying molecular mechanisms in a given type of cancer. It is important to keep in mind that initially most tumors are HLA-I positive and the specific T cell-mediated immune reaction should be able to destroy these aberrant cells [13]. This process, called “T-cell immune selection”, generates tumors with a different ratio of HLA-I positive and -negative cancer cells depending on the strength of the immune response [16]. In

1996, our laboratory organized an “HLA and Cancer” component of the International HLA workshop [9]. One of the major tasks of the component was to establish criteria to classify HLA expression in tumor tissues as HLA-I positive (more than 75% cells stained), heterogeneous (between 25% and 75% of cells stained), and HLA-I negative (less than 25% HLA-I positive tumor cells). This tumor classification is in concordance with a progressive immune selection of HLA-I negative tumor variants with successive formation of tumor lesions mainly composed of HLA-I negative cancer cells [17]. In this context, published observations that HLA-I expression in pancreatic and lung cancer inversely correlates with the degree of tumor infiltration with lymphocytes, suggests an active T cell-mediated immune selection in human tumors [18,19].

3. T Cell Immune Selection of MHC Class I Negative Tumor Variants

As indicated earlier, T cell-mediated immune response is an important mechanism of the destruction of HLA-I positive tumor cells [20]. At the same time, this response is also the mechanism of selection of HLA-I negative tumor variants. There is accumulating evidence that T cell immune selection certainly plays an important role in the outgrowth of the MHC/HLA-I negative tumor variants [16,17,21]. We have previously reported that a mouse fibrosarcoma tumor clone (which is MHC-I negative in baseline conditions, but inducible by IFN-gamma), produces “MHC-I positive” spontaneous lung metastasis in immunodeficient nude/nude mice lacking T-cell, while in syngeneic immunocompetent mice it generates “MHC-I negative” metastases [22]. In other mouse models, it has been demonstrated that positive tumor MHC-I expression correlates with tumor immunogenicity and serves as a key predictive marker of the response to immunotherapy [23].

4. Immunotherapy Selects Tumor Cells with Irreversible/“Hard” HLA-I Lesions

The analysis of different subcutaneous metastases obtained from a melanoma patient with mixed response to immunotherapy showed that regression or progression of metastatic lesions is associated with the presence of HLA-I molecules on the tumor cell surface [24–26]. Melanoma lesions with high HLA-I expression level were heavily infiltrated by CD4+ and CD8+ positive T cells and were rejected. In contrast, metastatic lesions with low HLA-I expression were resistant to immunotherapy and progressed. These findings strongly suggest that immunotherapy induces tumor HLA-I upregulation and rejection of cancer cells with “reversible/soft lesions” [12] (Figure 1). Similar results were obtained in spontaneous metastases induced in a mouse fibrosarcoma [22]. In this context, it has been recently reported that the recurrent lesions in four melanoma metastatic patients treated with monoclonal antibodies directed against “immune checkpoint” molecules harbor mutations in β 2-microglobulin and IFN genes, confirming the idea that different types of immunotherapy can

activate T cell-mediated immune response and select tumor cells with irreversible/“hard” lesions [27] (Figure 1). IFNs and other TH1 type cytokines undoubtedly play a major role in the upregulation of tumor MHC-I expression and in the activation of antigen presentation, ultimately leading to tumor rejection [28, 29].

5. Changes in Stromal/Tumor Tissue Organization and HLA Class I Loss

We have recently obtained evidence indicating that tumor tissue architecture changes dramatically with HLA-I loss during cancer progression [13,18]. In lung cancer HLA-I expression strongly correlates with lymphocyte/macrophage infiltration pattern and tumor tissue organization reflecting how an immune-privileged compartment with ineffective anti-tumor immunity is generated during cancer development. These changes also affect the pattern of leucocyte infiltration and its localization within or outside the tumor area. We have classified these phases or types of tumor tissue organization as follows: permissive Phase I with HLA-I positive/heterogeneous expression pattern and tumor infiltrating lymphocytes (TILs); and encapsulated/non-permissive Phase II with HLA-I negative tumor cells and peritumoral localization of leucocytes and other immune cells [18].

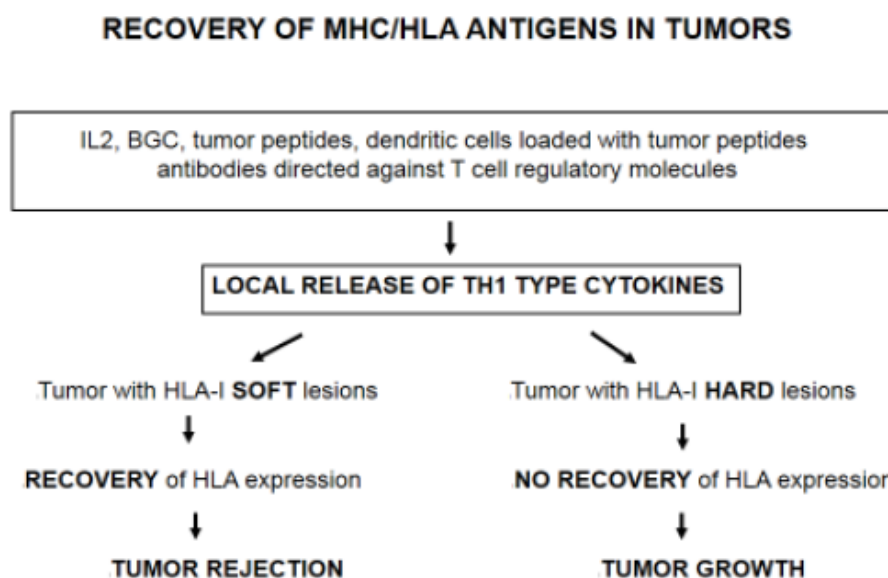


Figure 1. Recovery of major histocompatibility complex (MHC)/HLA-I antigens in tumors. Different Calmette–Guérin (BCG), or tumor peptides, can boost anti-tumor T cell-mediated responses. Currently, monoclonal antibodies against “immune checkpoint” molecules are also being actively used in the clinic. All these therapies can modify the tumor microenvironment and induce the release of TH1 type cytokines. HLA-I deficient tumors can upregulate HLA-I expression depending on the nature of the underlying molecular alteration. If the defect is reversible/“soft”, tumor or metastatic lesion can be rejected after cytokine-mediated recovery of the antigen presentation capacity. If the alteration is irreversible/“hard”, tumor or metastasis will remain HLA-I negative and, most likely, will escape T cell responses and continue to grow.

5.1. A Permissive Tumor Tissue Structure Observed in HLA-I Positive Tumors (Phase I)

When a tumor is HLA-I positive or heterogeneous, it is infiltrated with lymphocytes and macrophages owing to an immune-permissive tumor microenvironment (TME), in which tumor and TILs are in close contact with each other allowing recognition and destruction of the target tumor cells (Figure 2a). Tumors are infiltrated by CD4+ and CD8+ lymphocytes and by other leucocytes/macrophages at various degrees depending on the HLA-I positive/negative tumor cell ratio within the heterogeneous tumor mass. HLA-I expression was found to be correlated with intra or peritumoral distribution of CD8+ T lymphocytes, which, in turn, is associated with different phases of tumor evolution, distinct tissue reorganization patterns and different M1/M2 ratios. HLA-I positive tumor cells are actively killed by CTLs in phase I, leading to a progressive T-cell immune selection of HLA-I deficient tumor cells (phase II).

5.2. Encapsulated Tumor Nodes Observed in HLA-I Negative Tumors (Phase II)

Phase II is characterized by the lack of tumor infiltrating cells and a clear separation between HLA-I negative tumor and HLA-I positive stroma cells. It is very likely that due to the low cytotoxic activity of CD8+ T lymphocytes and the absence of natural killer (NK) cells, in “phase II” the host is trying to isolate tumor cells from the rest of the body, while tumor cells are actively creating an immunosuppressive microenvironment by inducing stromal reorganization and generation of a structure similar to a TH2 granuloma [30]. As a result, tumor architecture changes, generating tumor nodes surrounded by different types of T-cells/leucocytes/macrophages and probably other elements of the tumor microenvironment, including Tregs and MDSCs. Furthermore, this phase is also characterized by a marked peritumoral localization of fibroblasts and alternatively activated macrophages providing a physical barrier and forming a “non-permissive” tissue structure (Figure 2b) [18]. Such tumor tissue organization can be observed in a variety of tumors of different histological type [8], however it has not been previously associated with the absence of HLA-I expression in tumors. Such an encapsulated HLA-I negative tumor without activated tumor infiltrating immune cells (phase II) represents a condition of “immunological silence”.

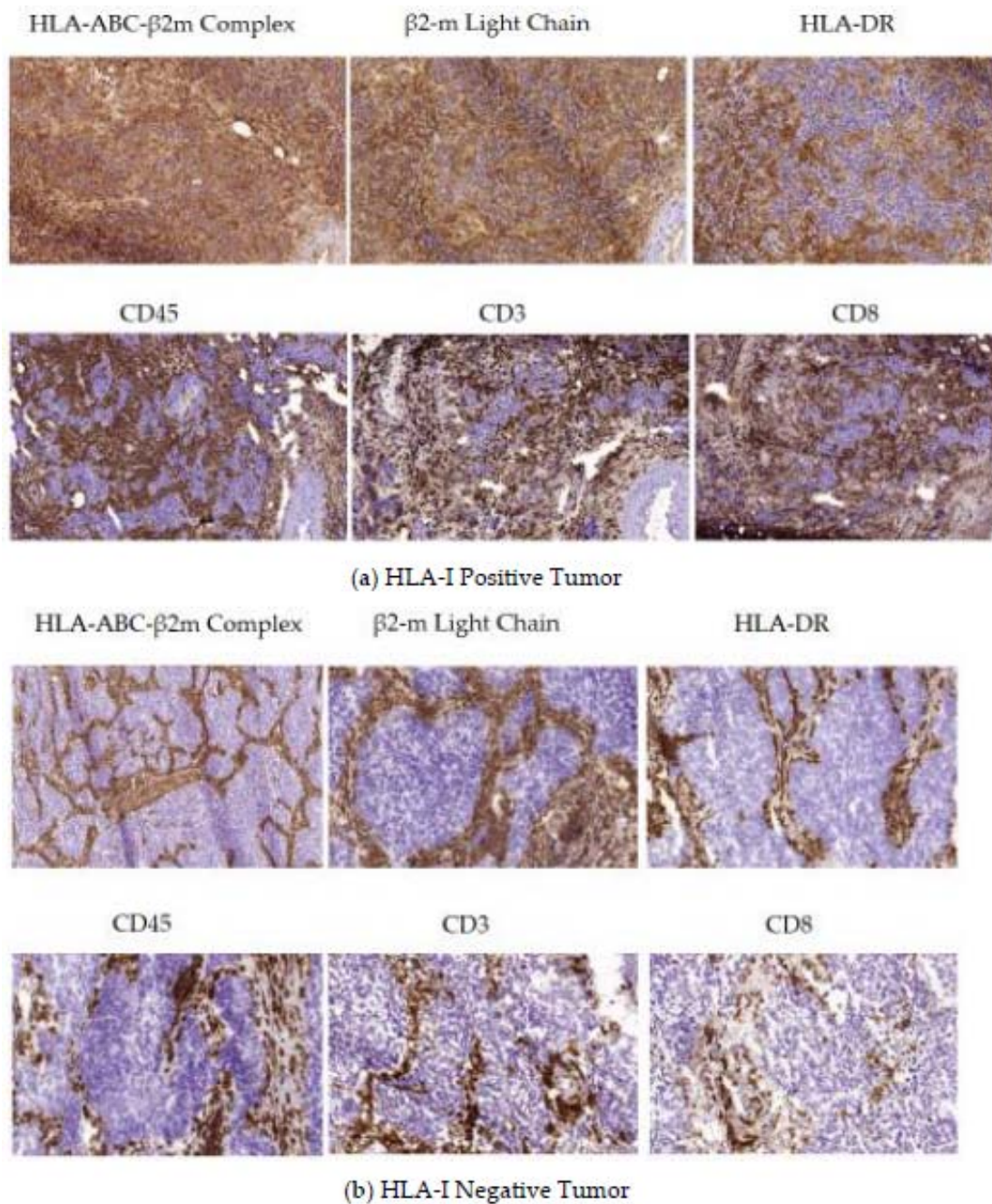


Figure 2. (a) Tissue architecture in HLA-I positive tumors (Phase I). Tumor tissue samples obtained from a patient diagnosed with non-small cell lung cancer (NSCLC) were immunostained with monoclonal antibodies against HLA-I, β 2-microglobulin, HLA class II, CD8, CD3, and CD45 molecules. Most of the cancer cells are HLA-I positive and remain in close contact with HLA-I positive immune cells. The tissue structure is “permissive”, allowing TILs to enter the tumor mass, producing a significant CD8+ infiltration, and permitting a direct contact with cancer cells. Tumor parenchyma and stroma cannot be distinguished when immunostained for HLA-I expression. This tissue organization pattern in HLA-I positive tumors differs from that observed in HLA-I negative tumors depicted in Figure 2b; (b) Tissue architecture in HLA-I negative tumors (Phase II). In contrast to Figure 2a, this lung cancer tissue, obtained from another patient, is negative for both HLA-I and -II. T cells and other leukocytes are restricted exclusively to the peritumoral stroma that surrounds the tumor nest in a “non-permissive” tissue structure. There is a clear separation between tumor parenchyma and surrounding stroma. Tumor nodes are composed exclusively of HLA-I negative tumor cells without any infiltrating immune cells (phase of “immunological silence”).

6. Progressive Exclusion and/or Inactivation of NK and CD8+ T Cells from the Distant Non-Tumor Tissue (DNTT) to the Tumor Tissue (TT)

We have observed significant gradual changes in the composition of the inflammatory infiltrate in three different areas of cancerous lung tissue: tumor tissue (TT), tissue adjacent to the tumor (TAT), and distant non-tumor tissue (DNTT) [31]. Using a combination of flow cytometry and tumor tissue immunohistology, we found a considerable prevalence of activated CD8+DR+ T cells of effector-memory phenotype in tumor tissues (TT) as compared to TAT and DNTT areas. At the same time, we observed a remarkable gradual increase in the numbers of T-reg cells from the DNTT area towards TT (Figure 3) along with a reduction of the CD8/Treg and Th1/Treg ratio in tumor tissue as compared to a healthy counterpart.

The anti-tumor CD8+ T cell-mediated cytotoxicity may be insufficient due to the increased presence of Treg cells and high frequency of CD8+ cells expressing CD39 (a marker associated with immunological exhaustion and paracrine inhibition of IFN- γ). In fact, CD39+ cells have been found to be highly represented in both CD4+ and CD8+ subpopulations in tumor tissues and were linked to immunosuppressive functions [32]. We favor the idea that the most important factor reducing the cytotoxic potential of CD8+ T-cells is associated with the lack of a “direct contact” with HLA-I negative target tumor cells due to an exclusive localization in the “stroma”, which creates a physical barrier between the HLA-I negative tumor cells and the infiltrating leucocytes/macrophages (see Figure 2b). In our study, using flow cytometry analysis of the cellular suspension obtained from the lung tumor samples, we observed that increase in the level of tumor infiltrating lymphocytes correlates with the increase in the proportion of Tregs ($p = 0.012$, $R = 0.443$) and CD8+CD39+ immunosuppressive cells ($p = 0.015$, $R = 0.489$) in this infiltrate. CD39 is an ectoenzyme, which serves as an integral component of the suppressive machinery of Tregs, inactivating and converting extracellular ATP into adenosine and allowing the immune escape of tumors. However, the high level of CD39 expression in both, CD4+ and CD8+ T cells, causes inhibition of the adhesion molecule expression necessary for transendothelial migration into the tumor and may explain the lack of infiltrating T-CD8 cells in the tumor nests [33].

With regards to NK cells, in the same study [31] we observed a significant decrease in the total number of these cells in tumor tissue (TT) as compared to the tissue adjacent to the tumor (TAT) or distant non-malignant tissue (Figure 3). On the other hand, the TT area is enriched with the NK cell subpopulation with the CD56bright CD16 $^{-}$ phenotype and reduced cytotoxic activity (Figure 4). Altogether, the obtained results indicate that tumor nests are poorly infiltrated with NK cells, and even the small percentage of these cells detected within the tumor

mass do not seem to have a cytotoxic potential to reject a tumor. Similar enrichment with CD56bright CD16[−] NK cells has been reported in NSCLC tumors [34]. Prevalence of the CD56⁺ CD16[−] NK subset with pro-angiogenic activity favoring tumor development and increased expression of inhibitory receptors in tumor infiltrating NK cells was reported in other types of cancer [35,36]. Lung adenocarcinoma cells frequently lose HLA-I expression [18] and theoretically should be heavily infiltrated by NK cells capable of eliminating HLA-I negative tumor cells.

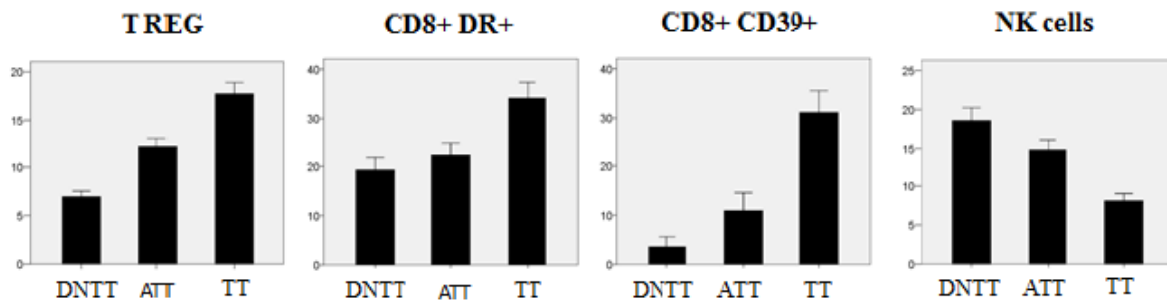


Figure 3. Variations in the percentage of lymphocyte subpopulations and natural killer (NK) cells in different areas of tumor and “normal” adjacent tissues measured by flow cytometry. DNTT—distant non tumor tissue, ATT—adjacent tumor tissue, TT—tumor tissue. The Treg cell subset was defined as CD127^{low} CD25^{bright} CD4⁺. The number of Treg was calculated as a percentage of total number of CD4⁺ cells, while the CD8⁺ DR⁺ and CD8⁺CD39⁺ cell levels are shown as a percentage of CD8⁺ cells. NK cells were determined by the selection of CD45⁺ CD3[−] CD20[−] cells in the FSC^{low}/SSC^{low} gate [31]. Tregs and CD8⁺CD39⁺ lymphocytes show increased presence closer to the tumor nest, while the percentage of NK cells is lower in TT as compared to other areas.

However, NK cells are rarely detected in the lung tumor infiltrate. Our findings point to the existence of alternative immune escape mechanisms influencing NK cells, such as (a) difficulty of homing, which translates to the practical exclusion of NK cells by cancer cells; (b) a progressive alteration in the phenotype of NK cells from healthy tissue to tumor tissue, with the emergence of a non-cytotoxic phenotype; in tumor tissue, we found a prevalence of CD56 bright CD16 negative non-cytotoxic cytokine-producing NK cells and detected non-cytotoxic CD56/CD16 negative cells with immature phenotype; and (c) the location of scarce NK cells in the tumor stroma without a direct contact with cancer cells (particularly in HLA-I negative tumors). Altogether, these results suggest that the observed changes are induced by the tumor microenvironment which locally impairs NK homing and differentiation, rendering these cells less cytotoxic and favoring the immune escape of HLA-I negative tumors.

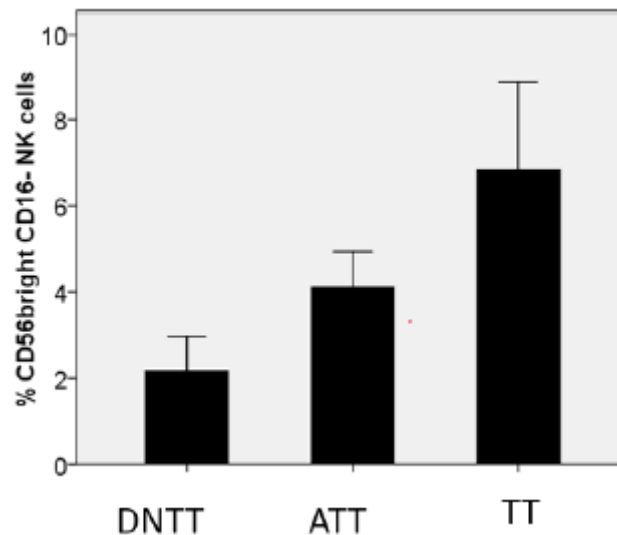


Figure 4. Changes in the percentage of CD56bright CD16[−] NK cells with impaired cytotoxic activity in different areas of the tumor and “normal” adjacent tissues analyzed by flow cytometry. TT is enriched by CD56bright CD16[−] NK cells, the percentage of which gradually increases from DNTT to TT. DNTT—distant non tumor tissue, ATT—adjacent tumor tissue, TT—tumor tissue. Tumor samples were obtained from primary lung tumors of non-treated patients by excision of a tumor mass fragment. ATT samples were taken from tumor-adjacent lung tissue located at approximately 1 cm from the periphery of the tumor without macroscopic signs of a tumor. DNTT and ATT samples were thoroughly analyzed to guarantee the complete absence of epithelial tumor cells. The NK cell subset was determined by the selection of CD45⁺ CD3[−] CD20[−] cells in the FSC^{low}/SSC^{low} gate and calculated as a percentage of all NK cells [31].

7. Conclusions

There is accumulating evidence that tumor immune escape associated with MHC/HLA-I loss is a frequent phenomenon observed in human and experimental tumors. We have recently obtained data suggesting that the location of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) in humans is associated with a particular tumor tissue organization. At the beginning of the T cell-mediated immune response, CD8⁺ T lymphocytes enter the tumor tissue and destroy HLA-I positive tumor cells (a permissive Phase I). Later, as a result of T cell immune selection, HLA-I negative tumor cell variants appear, ultimately generating a tumor composed only of HLA-I negative cells (Phase II). In this phase T lymphocytes and other leucocytes/macrophages reside outside the tumor nest. Such tissue structure provides a biological barrier between the tumor and stroma (a non-permissive Phase II). This well-established “tumor-parenchyma”-stroma architecture has been identified decades ago, but has never been linked to tumor HLA-I loss. We favor the idea that this reorganization of tumor tissue structure during cancer development is associated with the T-cell immune selection of MHC-I negative tumor cell variants and probably can be observed frequently since the percentage of human tumors with HLA-I loss reaches 65%–90% in different types of malignancy [8]. These figures are probably underestimated due to the

difficulties in detailed analysis of HLA expression in tumor tissues. The expression of HLA-I molecules in the tumor cell surface could play a leading role in directing and conducting the TH1 response until the total elimination of transformed cells. In some patients, the appearance of HLA-I negative tumor variants as a result of immune escape from T cell responses may generate tumors composed only of HLA-I negative cells lacking tumor infiltration with immune cells and encapsulated by the stroma (“immunological silence”). The status of MHC/HLA-I expression in tumor samples could represent the “driving force” that determines tumor evolution: either a TH1-mediated tumor rejection or formation of TH2-type granuloma. The recovery of HLA-I expression in tumors is a major task for the future, since MHC/HLA molecules are playing a key role in antigen presentation and tumor rejection [12,37,38].

Acknowledgments: This work was supported by the grants from Spanish Institute of Health Carlos III (ISCIII, Instituto Carlos III) co-financed by European Union (FEDER-Fondo Europeo de Desarrollo Regional) (PI12/02031, PI08/1265, PI11/01022, PI11/01386, RETIC RD 06/020, RD09/0076/00165, PT13/0010/0039, PI14/01978, PI16/00752) and by the Junta de Andalucía in Spain (Groups CTS-143, CTS-695, CTS-3952, CVI-4740, PI 09/0382 grant).

Author Contributions: All authors participated in drafting of the manuscript and contributed substantially to this review.

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

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

| | |
|-------|----------------------------------|
| HLA | human leukocyte antigen |
| β2m | beta-2-microglobulin |
| CTL | cytotoxic T lymphocyte |
| IFN | Interferon |
| LOH | loss of heterozygosity |
| TIL | tumor infiltrating lymphocyte |
| TME | tumor microenvironment |
| NSCLC | non-small-cell lung carcinoma |
| MHC | major histocompatibility complex |

References

1. Boesen, M.; Svane, I.M.; Engel, A.M.; Rygaard, J.; Thomsen, A.R.; Werdelin, O. CD8+ T cells are crucial for the ability of congenic normal mice to reject highly immunogenic sarcomas induced in nude mice with 3-methylcholantrene. *Clin. Exp. Immunol.* **2000**, *121*, 210–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Boon, T.; Coulie, P.; Van Den Eynde, B.J.; Van Der Bruggen, P. Human T cell responses against melanoma. *Annu. Rev. Immunol.* **2006**, *24*, 175–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Romero, I.; Garrido, C.; Algarra, I.; Collado, A.; Garrido, F.; Garcia-Lora, A.M. T lymphocytes restrain spontaneous metastasis in permanent dormancy. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 1958–1968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Kessler, B.M.; Glas, R.; Ploegh, H.L. MHC class I antigen processing regulated by cytosolic proteolysis-short cuts that alter peptide generation. *Mol. Immunol.* **2012**, *39*, 171–179. [[CrossRef](#)]
5. Romero, P.; Coulie, P. Adaptive T cell immunity and tumor antigen recognition. In *Tumor Immunology and Immunotherapy*; Rees, R., Ed.; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014; pp. 1–14.
6. Drake, C.G.; Jaffee, E.M.; Pardoll, D.M. Mechanism of immune evasion by tumors. *Adv. Immunol.* **2006**, *90*, 51–81. [[PubMed](#)]
7. Bodmer, W.; Browning, M.J.; Krausa, P.; Rowan, A.; Bicknell, D.C.; Bodmer, J. Tumour escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *690*, 42–49
8. Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Aptsiauri, N. Rejection versus escape: The tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol. Immunother.* **2016**, *66*, 259–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Koopman, L.A.; Corver, W.E.; Van Der Slik, A.R.; Giphart, M.J.; Fleuren, G.J. Multiple genetic alterations at chromosome 6p cause frequent and heterogeneous HLA class I antigen loss in cervical cancer. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 961–976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Garrido, F.; Cabrera, T.; Accolla, R.S.; Bensa, J.C.; Bodmer, W.; Dohr, G.; Drouet, M.; Fauchet, R.; Ferrara, G.B.; Ferrone, S.; et al. HLA and Cancer. In *HLA, Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implications*; Charron, D., Ed.; EDK Medical and Scientific International Publisher: University of Western Australia, Perth, Australia, 1997; pp. 445–452.
11. Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Cabrera, T.; Perez-Villar, J.J.; Lopez-Botet, M.; Duggan-Keen, M.; Stern, P.L. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol. Today* **1997**, *18*, 89–95. [[CrossRef](#)]
12. Garrido, F.; Cabrera, T.; Aptsiauri, N. “Hard” and “Soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: Implications for immunotherapy. *Int. J. Cancer* **2010**, *127*, 249–256. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Garrido, F.; Aptsiauri, N.; Doorduyn, E.; Garcia-Lora, A.; van Hall, T. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **2016**, *39*, 44–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Khong, H.T.; Restifo, N.P. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 999–1005. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Angell, T.E.; Lechner, M.G.; Jang, J.K.; LoPresti, J.S.; Epstein, A.L. MHC class I loss is a frequent mechanism of immune escape in papillary thyroid cancer that is reversed by interferon and selumetinib treatment in vitro. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 6034–6044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Chang, C.C.; Campoli, M.; Restifo, N.P.; Wang, X.; Ferrone, S. Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component down regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J. Immunol.* **2005**, *174*, 1462–1471. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sucker, A.; Zhao, F.; Real, B.; Heeke, C.; Bielefeld, N.; Maen, S.; Horn, S.; Moll, I.; Maltaner, R.; Horn, P.A.; et al. Genetic evolution of T-cell resistance in the course of melanoma progression. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 6593–6604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Perea, F.; Bernal, M.; Sánchez-Palencia, A.; Carretero, J.; Torres, C.; Bayarri, C.; Gómez-Morales, M.; Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 888–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ryschich, E.; Notzel, T.; Hinz, U.; Autschbach, F.; Ferguson, J.; Simon, I.; Weitz, J.; Fröhlich, B.; Klar, E.; Büchler, M.W.; et al. Control of T cell mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. *Clin. Can. Res.* **2005**, *11*, 498–504.
20. Kikuchi, E.; Yamazaki, K.; Torigoe, T.; Cho, Y.; Miyamoto, M.; Oizumi, S.; Hommura, F.; Dosaka-Akita, H.; Nishimura, M. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 1424–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Paschen, A.; Méndez, R.M.; Jiménez, P.; Sucker, A.; Ruiz-Cabello, F.; Song, M.; Garrido, F.; Schadendorf, D. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: A result of successive mutation events. *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 759–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Garcia-Lora, A.; Martinez, M.; Algarra, I.; Gaforio, J.J.; Garrido, F. MHC class I deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int. J. Cancer* **2003**, *106*, 521–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lechner, M.G.; Harimi, S.S.; Barry-Holson, K.; Angel, T.E.; Murphy, K.A.; Church, C.H.; Ohlfest, J.R.; Hu, P.; Epstein, A.L. Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *J. Immunother.* **2013**, *36*, 477–489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Restifo, N.P.; Marincola, F.M.; Kawakami, Y.; Taubenberger, J.; Yannelli, J.R.; Rosenberg, S.A. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 100–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Aptsiauri, N.; Carretero, R.; Garcia-Lora, A.; Real, L.M.; Cabrera, T.; Garrido, F. Regressing and progressing metastatic lesions: Resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol. Immunother.* **2008**, *57*, 1727–1733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Carretero, R.; Wang, E.; Rodriguez, A.I.; Reinboth, J.; Ascierto, M.L.; Engle, A.M.; Liu, H.; Camacho, F.M.; Marincola, F.M.; Garrido, F.; et al. Regression of melanoma metastases after immunotherapy is associated with activation of antigen presentation and interferon-mediated rejection genes. *Int. J. Cancer* **2012**, *131*, 387–395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zaretsky, J.M.; Angel Garcia-Diaz, B.S.; Shin, D.S.; Escuin-Ordinas, H.; Hugo, W.; Hu-Lieskovan, S.; Torrejon, D.Y.; Abril-Rodriguez, G.; Sandoval, S.; Barthly, L.; et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *75*, 819–829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dunn, G.P.; Koebel, C.M.; Schreiber, R.D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *11*, 836–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Ikeda, H.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. The role of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev.* **2002**, *13*, 95–109. [[CrossRef](#)]
30. Hams, E.; Aviello, G.; Fallon, P.G. The schistosoma granuloma: Friend or foe? *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Del Mar Valenzuela-Membrives, M.; Perea-García, F.; Sanchez-Palencia, A.; Ruiz-Cabello, F.; Gómez-Morales, M.; Miranda-León, M.T.; Galindo-Angel, I.; Fárez-Vidal, M.E. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71608–71619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Cai, X.Y.; Wang, X.F.; Li, J.; Dong, J.N.; Liu, J.Q.; Li, N.P.; Yun, B.; Xia, R.L. Overexpression of CD39 and high tumoral CD39(+)/CD8(+) ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 14757–14764. [[PubMed](#)]
33. Sundström, P.; Stenstad, H.; Langenes, V.; Ahlmanner, F.; Ndah, T.G.; Fredin, K.; Börjesson, L.; Gustavsson, B.; Bastid, J.; Quiding-Järbrink, M. Regulatory T cells from colon cancer patients inhibit effector T-cell migration through an adenosine-dependent mechanism. *Cancer Immunol. Res.* **2016**, *3*, 183–193. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Carrega, P.; Morandi, B.; Costa, R.; Frumento, G.; Forte, G.; Altavilla, G.; Ratto, G.B.; Mingari, M.C.; Moretta, L.; Ferlazzo, G. Natural killer cells infiltrating Human Nonsmall-Cell Lung Cancer are enriched in CD56brightCD16- cells and display an impaired capability to kill tumor cells. *Cancer* **2008**, *112*, 863–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Bruno, A.; Focaccetti, C.; Pagani, A.; Imperatori, A.S.; Spagnoletti, M.; Rotolo, N.; Cantelmo, A.R.; Franzi, F.; Capella, C.; Ferlazzo, G.; et al. The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer. *Neoplasia* **2013**, *15*, 133–142. [[CrossRef](#)]
36. Jin, S.; Deng, Y.; Hao, J.W.; Li, Y.; Liu, B.; Yu, Y.; Shi, F.-D.; Zhou, Q.-H. NK cell phenotypic modulation in lung cancer environment. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e109976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Garrido, F.; Algarra, I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv. Cancer Res.* **2001**, *83*, 117–158. [[PubMed](#)]
38. Aptsiauri, N.; Cabrera, T.; Garcia-Lora, A.; Lopez-Nevot, M.A.; Ruiz-Cabello, F.; Garrido, F. MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int. Rev. Cytol.* **2007**, *256*, 139–189. [[PubMed](#)]

VII. DISCUSIÓN

VII. DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón representa una de las principales causas de morbilidad y mortalidad relacionada con el cáncer en todo el mundo (244). Los dos principales tipos, el cáncer de pulmón microcítico, y el más frecuente, el cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC), representan aproximadamente el 95% de todos los casos (245). Alrededor del 20-25% de NSCLC son resecables en etapas tempranas, (etapa I-IIIa) en el momento del diagnóstico y potencialmente son curables. Sin embargo, hay considerables diferencias en el pronóstico entre los estadios I y IIIa basados en los criterios de la International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC) (246). Otro de los factores asociados a pronóstico, como la histopatología del tumor, el grado de diferenciación y la invasión linfática han proporcionado datos contradictorios. Finalmente, el genotipado molecular ha permitido la estratificación de los pacientes con NSCLC fundamentalmente con implicaciones terapéuticas (246, 247). La clasificación TNM es importante, nos da una aproximación del grado de progresión tumoral en el momento de la intervención quirúrgica, pero no proporciona información adecuada relativa al pronóstico. De aquí que nuevas estrategias se estén implementando para la mejora del pronóstico de los pacientes. En particular, desde hace algunos años se ha venido observando la importancia que tiene la evaluación de la respuesta inmunitaria contra el tumor, lo que se ha llamado “Immunoscore”, (TNM-I) (198, 248-251). Algunos tumores presentan una baja infiltración por células inmunitarias, mientras otros están sin embargo muy infiltrados. Entre estos últimos, la arquitectura de la matriz extracelular (TME), la localización y densidad de las células inmunitarias en el frente invasivo y el centro del tumor, el tipo de células, la presencia o no de agregados linfoides organizados como tejido linfoide terciario constituyen en sí mismo el “contexto inmunitario” que ha demostrado ser una herramienta de estratificación pronóstica muy importante, independiente de la TNM y de otros factores clásicamente relacionados con el pronóstico en cáncer (251, 198). La composición del microambiente inmunológico (células T, células B, células dendríticas, células NK, células supresoras de origen linfoide y mieloide, neutrófilos, y macrófagos) es diferente entre pacientes en cánceres del mismo tipo. El sistema inmunitario, a través de la interacción con las células neoplásicas favorece la selección de variantes tumorales menos inmunogénicas, que finalmente conducen al sobrecrecimiento del tumor. En la mayoría de tumores humanos, la capacidad para escapar de la respuesta inmunitaria anti-tumoral está a menudo asociada con alteraciones en la expresión de antígenos HLA sobre la superficie de la célula neoplásica (53, 55, 252-254). El conocimiento de que los antígenos tumorales puedan ser reconocidos por los CTLs, vía HLA de clase I, ha reforzado el desarrollo de distintas estrategias de inmunoterapia dirigidas a potenciar la respuesta de las células T citotóxicas (IL-2, IFN- α , vacunas con antígenos específicos, DCs cargadas con péptidos, transferencia adoptiva). Sin embargo, es una realidad, que la mayoría de tratamientos

inmunoterapéuticos, hasta hace poco, han reportado escasos resultados. Más recientemente, la utilización de la inmunoterapia frente a los puntos de control inmunitario ha representado ser uno de los avances en biomedicina más importantes en los últimos años. Sin embargo, un porcentaje significativo de pacientes no se benefician de este tipo de terapias. Se ha establecido que mecanismos genéticos (mutaciones en la célula tumoral) y no genéticos (extrínsecos, relacionados con el microambiente) pueden estar detrás de la ausencia de respuesta en un porcentaje significativo de pacientes. Nuestra hipótesis de trabajo establece que entre estos factores deben de estar necesariamente aquellos que contribuyen de forma natural al escape inmunológico. Por este motivo nos planteamos como objetivo general analizar e identificar cambios en las células tumorales o en el microambiente tumoral que puedan explicar la evolución clonal del cáncer de pulmón no microcítico en un contexto de inmunoevasión. También evaluar, así mismo, si estas alteraciones podrían explicar la ausencia de respuesta de los pacientes sometidos a inmunoterapia antígeno-específica.

1. Papel de las moléculas HLA de clase I en el inmunoescape tumoral en cáncer de pulmón no microcítico.

1.1 Expresión tumoral de HLA-I en cáncer de pulmón no microcítico

El cáncer de pulmón es uno de los tumores más inmunogénicos y múltiples péptidos derivados de mutaciones no sinónimas pueden ser potencialmente reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ (6). Sin embargo, en el microambiente tumoral se establece una compleja red inmunosupresora que evoluciona hacia la selección de clones deficientes en HLA de clase I o de baja inmunogenicidad que culmina en la resistencia completa al ataque de células T (57, 254, 255). Entre los tumores que utilizan la pérdida de expresión de moléculas HLA-I como mecanismo de evasión de la respuesta inmunitaria, el de pulmón es uno de los que presenta este mecanismo en un número significativo de casos. En nuestro estudio encontramos un 48% de alteraciones en la expresión de HLA-I, un resultado similar al encontrado en otro estudio (256) y parecido a lo detectado para otros tipos de cáncer con la excepción del cáncer renal (257-259).

En este estudio, observamos un porcentaje significativo de tumores con pérdida total o parcial de moléculas HLA-I. Anteriormente, en 1991, nuestro grupo reportó que las células de cáncer de pulmón disminuían la expresión de antígenos HLA-I en un 25% de los pacientes estudiados (253, 254), que contrasta con el resultado actual. Las razones de esta discrepancia son desconocidas, aunque puede haber influido la distinta técnica inmunohistoquímica usada y,

más probablemente, el cambio en la ratio carcinoma epidermoide/adenocarcinoma entre los dos estudios. La mayor proporción de adenocarcinomas actualmente se interpreta en los cambios habidos en el hábito tabáquico, lo cual a su vez puede tener relación con los mecanismos de carcinogénesis (256, 258).

1.2 Expresión de HLA-I y características clínicas de los pacientes de cáncer de pulmón no microcítico

En nuestro estudio analizamos la expresión de HLA-I y las características clínicas de los pacientes, entre ellas hábitos de tabaquismo, estadio tumoral, tipo histológico, supervivencia, etc. Como discutiremos posteriormente, la expresión de HLA-I favorece el infiltrado por CTLs, lo cual puede facilitar la eliminación del tumor y, por lo tanto, se esperaría un resultado clínico favorable de la enfermedad. Sin embargo, no encontramos ninguna asociación estadística de la expresión de HLA-I con ninguno de los parámetros clínicos analizados. No obstante, hay varios estudios que han encontrado que la expresión de HLA-I se asocia a una mejora de la supervivencia en NSCLC (256-258). En general, tumores con pérdida severa o heterogénea presentaron estadios más avanzados de la enfermedad y peor pronóstico. Es probable que los resultados negativos en cuanto a supervivencia de nuestro estudio se deban al menor tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el registro de fallecimientos actual.

También, se ha encontrado asociación de la expresión de HLA-I del tumor con el estatus fumador de los pacientes: sólo un 2,5% de los pacientes que nunca habían fumado presentaron tumores con expresión negativa de HLA-I, mientras que el 41% de los pacientes con historia fumadora presentaron tumores con pérdida de la expresión de HLA-I (258). Hay otro estudio en el que de los 26 casos que se analizaron como pérdida severa de HLA-I, el 2% de los pacientes presentaron una historia no fumadora, mientras que el resto (98%) eran fumadores activos o alguna vez habían fumado (256).

1.3 La expresión tumoral de HLA-I está asociada a la infiltración inmunitaria en cáncer de pulmón no microcítico

Uno de los datos más importantes de nuestro estudio está relacionado con la asociación encontrada entre la expresión HLA-I y la densidad y el patrón de infiltración leucocitaria. La pérdida de expresión HLA-I se asocia a un cambio en el desarrollo estromal que conforma un compartimento que podríamos denominar inmuno-privilegiado que no permite una respuesta antitumoral efectiva al encontrarse los linfocitos y macrófagos fuera de los nidos tumorales sin posibilidad de contactar con las células cancerígenas. Este patrón contrasta con lo que frecuentemente se observa en tumores que expresan HLA-I, los cuales presentan un patrón de

infiltración de TILs en el que los linfocitos y macrófagos se encuentran en estrecho contacto con las células tumorales. Estos dos tipos de estructura diferenciados los hemos denominado en nuestro estudio como Fase I y Fase II, respectivamente, al entender que puede tratarse de un proceso progresivo en el que, al principio, el tumor expresa moléculas de HLA-I que permitirían el reconocimiento y eliminación de la células tumorales por linfocitos T citotóxicos (Figura 16). En una fase posterior, como consecuencia de la inestabilidad genética van apareciendo y seleccionándose variantes tumorales con pérdidas de expresión de moléculas HLA-I, el tumor se expande y los linfocitos quedan confinados en el estroma peritumoral (Figura 17).

Una hipótesis alternativa contemplaría que estos dos tipos de patrones de infiltración y desarrollo estromal se deban a características biológicas distintas intrínsecas a los tumores HLA-I positivos y HLA-I negativos. Es decir, que los tumores HLA-I positivos y negativos tengan un mecanismo de evolución clonal divergente antes que lineal (modelo de 2 fases). En este caso, es posible que algunos tumores HLA-I positivos usen otros métodos de escape inmunológico, en los que la pérdida adicional de HLA del tumor no suponga una ventaja selectiva adicional. La posibilidad de que tumores densamente infiltrados HLA-I positivos y tumores libres de TILs (HLA-I negativos) sean tumores completamente diferentes no puede ser descartada. Sin embargo, nosotros favorecemos la hipótesis de un modelo bifásico en el que las diferentes estructuras del tejido tumoral y los patrones de infiltración de células T representan diferentes fases de desarrollo tumoral.

Nuestra hipótesis se basa en que NSCLC se origina a partir de células normales HLA-I positivas. Una interacción dinámica entre las células tumorales y células CD8⁺ se refleja en la observación de muestras tumorales heterogéneas con diferentes porcentajes de células tumorales positivas y negativas (260). Adicionalmente, tenemos datos consistentes destacando la existencia de una secuencia cronológica en la aparición de las variantes tumorales con pérdida de HLA-I en sucesivas lesiones metastásicas obtenidas de pacientes con melanoma y cáncer de vejiga (60, 261, 262) y tras respuesta a inmunoterapia (263). Nuestro grupo observó en pacientes con diferentes metástasis subcutáneas con respuesta variable a inmunoterapia que la regresión o progresión de las lesiones metastásicas se asocia a la presencia de moléculas HLA-I en la superficie de la célula tumoral. Las lesiones de melanoma con altos niveles de expresión HLA-I estaban densamente infiltradas por células T CD4⁺ y CD8⁺ y fueron rechazadas. Mientras tanto, las lesiones con baja expresión de HLA-I fueron resistentes a la inmunoterapia y progresaron (263), poniendo de manifiesto el papel que juega HLA en el transcurso del proceso.

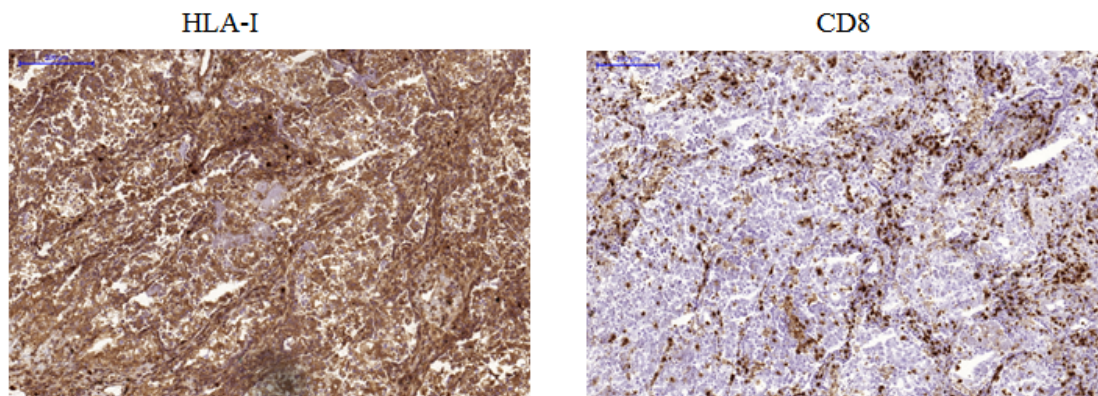


Figura 16. Infiltración de linfocitos T CD8⁺ en un tumor con expresión positiva de HLA-I en cáncer de pulmón. Se observa de manera homogénea la positividad para HLA-I en el tumor y como los linfocitos CD8⁺ muestran un patrón de infiltración de TILs de manera que están en estrecho contacto con las células tumorales formando una estructura “permisiva” que favorece el rechazo tumoral por parte de los linfocitos T.

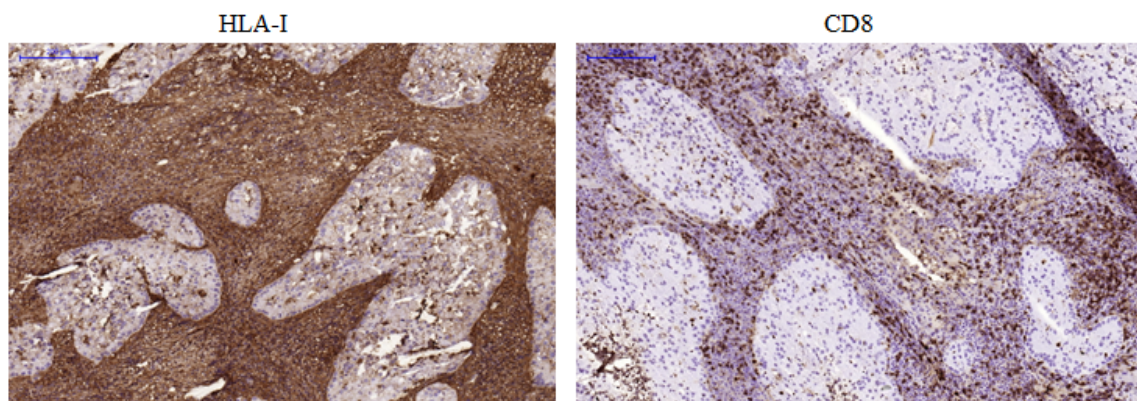


Figura 17. Infiltración de linfocitos T CD8⁺ en un tumor con expresión negativa de HLA-I. A diferencia del tumor positivo para la expresión de HLA-I, en este si se puede observar la diferencia entre el tumor y el infiltrado inmunitario donde el tumor ha perdido la expresión de moléculas HLA-I y se muestra claramente una barrera entre el tumor y los linfocitos T CD8⁺ presentando un patrón de infiltración estromal, en el que los linfocitos se quedan en la periferia tumoral circunscritos al estroma del tejido sin mantener contacto alguno con los linfocitos T CD8⁺ formando una estructura “no permisiva” que favorece el escape tumoral.

Estas observaciones apoyan nuestra hipótesis de que en la fase I existe un microambiente tumoral permisivo, en el que las células tumorales HLA-I positivas y las células T infiltrantes están en estrecho contacto las unas con las otras (Figura 1 Perea et al. IJC 2017). En contraste, la Fase II (Figura 2 Perea et al. IJC 2017) se caracteriza por la ausencia de células infiltrantes tumorales y una clara separación entre células tumorales y estromales, en un microambiente tumoral no permisivo (Figuras 2 y 4 Perea et al. IJC 2017). En esta fase, los linfocitos se encuentran atrapados en una densa malla estromal de fibroblastos FAP⁺. Esta estructura como discutiremos posteriormente puede ser el resultado de un cambio en la polarización funcional del macrófago hacia M2 que favorecería la diferenciación y secreción de citoquinas Th2, y la mayor proliferación de fibroblastos. La producción de citoquinas de

IL-10 y TGF- β podría a su vez justificar la baja expresión de moléculas HLA de clase I en los nidos tumorales (264).

La misma organización estructural se puede observar en otros tipos de tumores incluyendo melanomas, cáncer colorrectal, mama, vejiga y próstata, entre otros (265-267). Sin embargo, desconocemos su posible asociación con la expresión HLA. Es interesante destacar que reacciones estromales parecidas son llevadas a cabo también por el sistema inmunitario en un intento de aislar y evitar la diseminación de patógenos y que dan lugar a la formación de granulomas (268).

Además de la relación con la reacción estromal, hemos encontrado una asociación entre la expresión de HLA-I clase I y el nivel de infiltración por linfocitos CD8⁺ (Figura Supporting Information S2 Perea et al IJC 2017). Otros estudios, han reportado también esta asociación con HLA-I en cáncer de pulmón para los TILs CD8⁺. Los autores encontraron significación pero sólo cuando se reflejaba el número de linfocitos T en los nidos tumorales, cuando llevaron a cabo también el conteo de linfocitos en el estroma del tejido, la asociación con HLA-I se perdía (258). En otro estudio de infiltración en NSCLC, también observaron un infiltrado mayor en el tejido tumoral que en el estroma pero sin alcanzar significación estadística, probablemente por el número reducido de casos estudiados (269).

1.4 Mecanismos de alteración de la expresión de HLA de clase I

Otro de los objetivos de nuestro estudio fue profundizar en los mecanismos responsables de la pérdida de expresión de moléculas HLA-I. A partir de tumores con expresión negativa de HLA-I se aisló mediante microdissección láser las células tumorales de las que se extrajo ADN y ARN para análisis genéticos. Observamos que la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región p21.3 del cromosoma 6 (6p21.3) es una causa importante de pérdida de haplotipo de HLA en un número significativo de casos analizados. Además, el análisis mediante RT-PCR reveló una disminución de expresión de genes β 2M, genes de cadena pesada HLA (HC HLA) y genes de la maquinaria de procesamiento del antígeno LMP2 y LMP7 (Supporting Information Table S2 Perea et al. IJC 2017). La conclusión de este estudio es que la pérdida total de expresión de moléculas de HLA-I en cáncer de pulmón es producida por un doble mecanismo: la LOH en genes HLA, y la disminución de expresión de genes de la maquinaria de presentación antigénica, APM. En consonancia con nuestros resultados, en otro estudio se encontró la pérdida de haplotipo de antígenos HLA-I en un 40% de líneas de cáncer de pulmón (270, 271). La frecuencia de LOH puede ser muy alta en cáncer de pulmón, como lo revela nuestro estudio (264) y otro más reciente (272), y puede incluso encontrarse subestimada. De

hecho, en nuestro estudio el 100% de los casos estudiados que fueron caracterizados como HLA-I negativos presentaron LOH en el cromosoma 6, pero desconocemos cual es la frecuencia de LOH en tumores HLA-I positivos, que creemos que pueda ser también alta. De hecho, hemos podido profundizar en este mecanismo en 6 líneas de cáncer de pulmón con expresión aparentemente normal en HLA-I (Figura 18). El tipaje genómico en 3 de ellas reveló la existencia de homo-hemizigosis compatible con una pérdida de haplotipo. Otra resultó

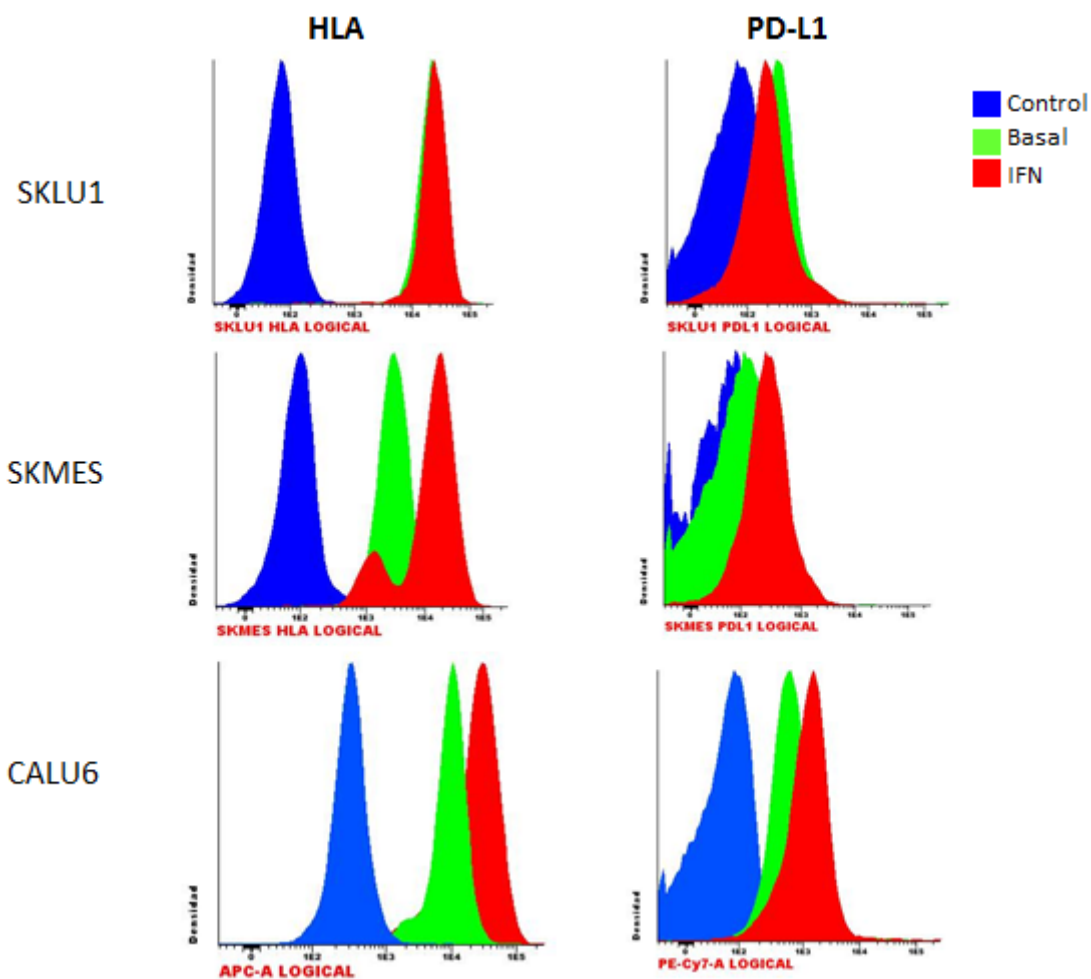


Figura 18. Expresión de HLA-I y PD-L1 en líneas tumorales de pulmón con alteraciones HLA-I en condiciones basale e inducción con IFN- γ . A pesar de tener alteraciones genéticas HLA, se observa que todas ellas expresan la molécula en superficie y además se induce la expresión tanto de HLA-I como PD-L1 tras el tratamiento con IFN en las líneas estudiadas excepto la línea SKLU1. La expresión se mide como intensidad media de fluorescencia.

también homocigota para los loci HLA-B y C (Tabla S2 Supporting Information Perea et al. Oncotarget 2017). El análisis de hibridación genómica con un array de SNPs (immunochip) corroboró los resultados del tipaje genómico, las línea SKLU-1 (Figura 5 Perea et al. Oncotarget 2017) y SKMES (Figura 5, Perea et al. Oncotarget 2017) presentaron una pérdida

de gran parte del cromosoma 6 y la línea A427 presentó una delección de parte del brazo corto del cromosoma 6 afectando a los loci B y C (Figura 5 Perea et al. Oncotarget 2017).

Esto indica que la alteración de la expresión de HLA-I en tumores es frecuente y que puede pasar desapercibida por el uso de estudios comunes: inmunohistoquímica, citometría de flujo y secuenciación, que no detectan estas grandes delecciones.

Nuestro grupo descubrió el mecanismo de LOH como mecanismo de escape tumoral en diferentes tipos de cáncer incluido pulmón (243, 273), indicando que es probablemente el mecanismo genético más relevante en la producción de variantes HLA negativas y por tanto en el inmunoescape.

Finalmente pensamos que el gen $\beta 2m$ no parece ser diana relevante en la generación de variantes no inmunogénicas en el cáncer de pulmón como sí ocurre en el melanoma y en el cáncer de colon con fenotipo de inestabilidad de microsatélites. En ninguno de los casos HLA-I negativos de pulmón que secuenciamos encontramos mutaciones en este gen. Sin embargo, los experimentos de RT-PCR revelaron una fuerte disminución en la transcripción de los genes $\beta 2m$ y otros genes de la maquinaria APM (Tabla 2 Supporting Information Perea et al. IJC 2017).

Estos mecanismos de pérdida de HLA tienen evidentes implicaciones para la inmunoterapia específica. En la actualidad la inmunoterapia con inhibidores frente a los “inmun checkpoints” es la primera línea de tratamiento en el cáncer de pulmón metastásico no microcítico. La terapia de “inmun checkpoints” requiere la integridad de las moléculas HLA-I pero beneficia sólo a una fracción de pacientes con NSCLC (274, 275). Interesantemente, la tasa de respuesta a pembrolizumab estuvo en torno al 45.2% en una serie de pacientes de NSCLC (276), similar a la tasa de pérdida de HLA-I observada en este trabajo. Las consecuencias de cara a la inmunoterapia de nuestros resultados van a depender del mecanismo intrínseco de pérdida HLA-I. La existencia de LOH en el cromosoma 6 y la ausencia de mutaciones en el gen $\beta 2m$ dificultan la realización de estrategias de rescate antigénico realizadas por nuestro grupo y otros investigadores para la recuperación de la expresión de antígenos HLA-I (259, 277). Si los defectos en la expresión de HLA-I en los tumores son leves (“soft lesions”), como una desregulación transcripcional de los diferentes genes como $\beta 2m$, HLA-ABC o APM, su expresión podría ser recuperada tras el tratamiento mediante citoquinas Th1 (259). Sin embargo, si se trata de “hard lesions” como la LOH, el tratamiento con citoquinas no tendría ningún efecto en la recuperación de la expresión de los

alelos HLA-I y se necesitaría restituir la expresión de los alelos HLA que probablemente sean los portadores de péptidos antitumorales.

Estas observaciones ponen de manifiesto la complejidad de predecir con suficiente seguridad los pacientes que van a responder o no a la inmunoterapia. Además, creemos que dado que las pérdidas de HLA-I se han puesto de manifiesto en pacientes en el curso de inmunointervención, es probable que puedan explicar la resistencia a los tratamientos en algunos individuos. Por tanto, creemos que tumores HLA-I positivos podrían ser más susceptibles a tratamiento con inhibidores de “inmun checkpoints” porque el mecanismo de reconocimiento antigénico permanece inalterado y el patrón de reactividad estromal e infiltración tumoral es “permisivo”. Por el contrario, los tumores HLA-I negativos (especialmente aquellos que portan mutaciones truncadoras irreversibles de pérdida de función en los genes HLA (LOH), $\beta 2m$, APM y ruta de señalización IFN- γ , (55, 278-281), pueden explicar la resistencia adquirida a la inmunoterapia con anti PD-1.

Como conclusión de este apartado, creemos que la expresión de HLA-I del tumor debería ser definitivamente incluida en la selección de pacientes al margen de los parámetros que actualmente se están considerando. El reconocimiento del péptido tumoral presentado por el HLA-I a los linfocitos CD8⁺ es la fase crítica durante la activación de los linfocitos T. Es imposible, por tanto, que con el screening actual (medida de PD-L1) se pueda predecir de manera fiable los pacientes que van a responder o no a la inmunoterapia específica.

2. Influencia de la expresión tumoral de PD-L1 en las características clínicas e infiltración inmunitaria en cáncer de pulmón no microcítico.

PD-L1 es uno de los marcadores de “inmun checkpoints” que en los últimos años ha cobrado mucha importancia. El estudio de la ruta de señalización PD-1/PD-L1 en el control de la respuesta del sistema inmunitario es de vital importancia en el desarrollo del cáncer, ya que representa una vía de escape tumoral. En nuestro estudio el análisis de la expresión tumoral de PD-L1 y las características clínicas de los pacientes presentó una tendencia no significativa con el estadio de la enfermedad. De los tumores que presentaron expresión positiva para PD-L1, el 23% se encontraban en estadio I mientras que el 77% se encontraban en estadios más avanzados II y III de la enfermedad. Mientras, los tumores con expresión negativa de PD-L1, el 55% se encontraban en estadio I y el 45%, menos de la mitad, presentaron estadios tumorales más avanzados ($p=0.055$, Figura 19). Interesantemente, obtuvimos una asociación estadística con la afectación linfática (N): el 18% de tumores con expresión negativa de PD-L1

se encontraron en fases N1+N2 mientras que los tumores en esas fases aumentaron hasta el 40% en los que eran PD-L1 positivos (p=0.027, Figura 20).

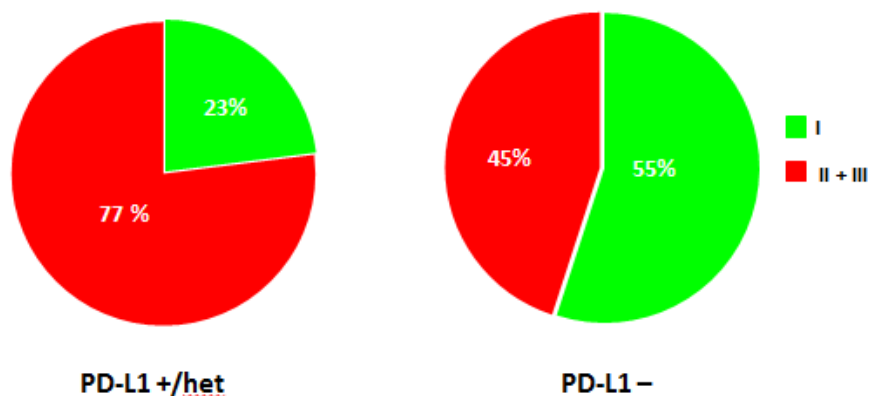


Figura 19. Expresión de PD-L1 y estadio tumoral (según la AAJC) de los tumores de NSCLC. Se observa una mayor frecuencia de tumores PD-L1+ en estadios más avanzados (II+III) respecto a los tumores que no expresan PD-L1. La diferencia fue analizada mediante el test Chi-cuadrado χ^2 usando el programa SPSS. La diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.055).

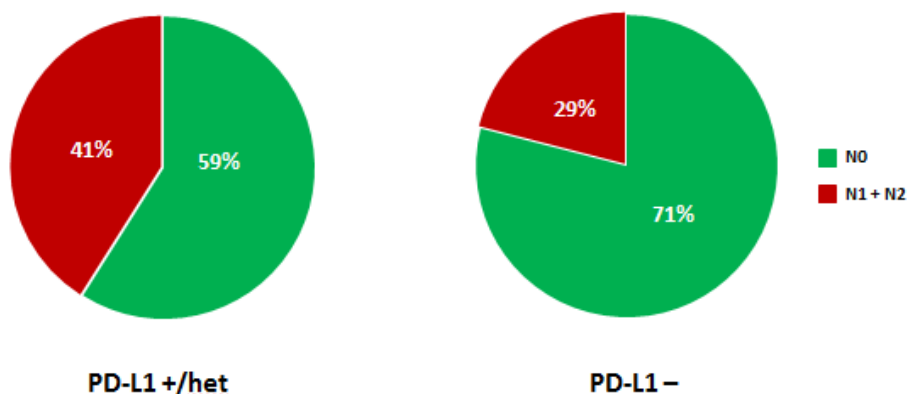


Figura 20. Expresión de PD-L1 y afectación linfática (N) en tumores de NSCLC. Se observa sobre un 20% de los casos con expresión negativa de PD-L1 en fases N avanzadas (N1+N2), mientras que la frecuencia en los tumores PD-L1+ aumenta hasta el 40%. La diferencia se evaluó usando el test Chi-cuadrado χ^2 usando el programa estadístico SPSS a un nivel de significación $p < 0.05$.

El resto de características clínicas no se asociaron con la expresión de PD-L1, entre ellas la supervivencia. A diferencia de nuestro estudio, la expresión de PD-L1 no se encontró asociada a ningún parámetro clínico, excepto la supervivencia, en otro estudio. Aquellos pacientes que tenían tumores con expresión positiva de PD-L1 tenían una supervivencia menor que aquellos que eran negativos para su expresión (282). Las razones para estas discrepancias todavía hoy patentes en numerosos estudios reflejan la dificultad para estandarizar los patrones y el umbral de detección de positividad de PD-L1 en tejidos. Estas dificultades han llevado a consensuar internacionalmente la clona de anticuerpos utilizada, el patrón de expresión

periférica y considerar positiva cualquier intensidad observada en los estudios inmunohistoquímicos. Las diferencias más notables entre nuestro trabajo y éste, se encuentran en la proporción de casos considerados positivos que fue significativamente menor en este estudio en relación al nuestro, y también en el tiempo de recogida de datos para los estudios de supervivencia que, como hemos considerado anteriormente, fue menor en nuestro estudio. En general, el consenso de muchos estudios, es que la expresión de PD-L1 puede ser considerada como factor pronóstico independiente asociándose a la supervivencia de los pacientes. Así, se ha observado no sólo en cáncer de pulmón (283, 284), también en otros tipos de cáncer como cáncer esofágico (285), de mama (286) y ovárico (287), los pacientes presentaban una supervivencia pobre si los tumores eran positivos para la expresión de PD-L1.

Cuando fue considerada conjuntamente la expresión de PD-L1 y la infiltración, si encontramos una asociación estadística con la supervivencia. En este caso, la supervivencia fue peor en el grupo de pacientes con tumores con presencia de TILs y expresión positiva de PD-L1 (PD-L1⁺ TILs⁺) comparado con los que presentaban tumores con TILs pero sin expresión de PD-L1 (PD-L1⁻ TILs⁺) (p=0.025, Figura 21).

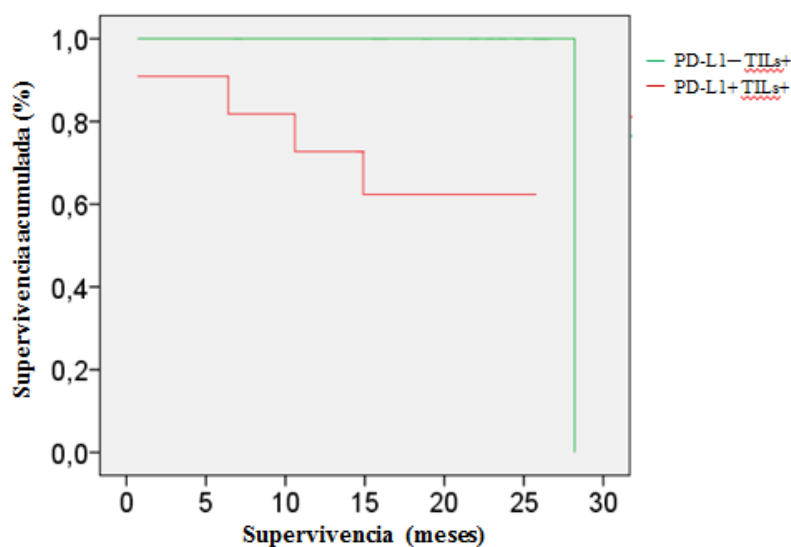


Figura 21. Asociación de la expresión de PD-L1 y presencia de TILs con la supervivencia de los pacientes de cáncer de pulmón. La supervivencia de los grupos de pacientes fue comparada usando el método de Kaplan-Meier. La diferencia en la supervivencia de los pacientes se analizó usando el test log-Rank mediante el programa estadístico SPSS. La diferencia fue considerada significativa a un nivel $p < 0.005$.

Respecto a la infiltración por linfocitos T CD8⁺, en nuestro estudio, los tumores con expresión positiva de PD-L1 mostraron mayor infiltración que los tumores con expresión negativa, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (Figura 3B Perea et al. Oncotarget 2017).

3. HLA⁻ PD-L1⁺ define el fenotipo más agresivo relacionado con características clínicas e infiltración inmunitaria adversas en cáncer de pulmón no microcítico.

Hemos querido analizar también el impacto que pudiera tener la presencia conjunta de dos mecanismos de evasión a la respuesta inmunitaria independientes, como es la pérdida de expresión de HLA y la expresión de PD-L1. Según su expresión los tumores pudieron clasificarse en 4 grupos i) HLA⁺ PD-L1⁺, ii) HLA⁺ PD-L1⁻, iii) HLA⁻ PD-L1⁺, iv) HLA⁻ PD-L1⁻. Como hemos mencionado en los apartados anteriores al considerar la expresión de HLA-I por separado no encontramos asociación estadística con ninguno de los parámetros clínicos analizados. Sin embargo, sí obtuvimos diferentes asociaciones significativas al estudiar conjuntamente la expresión de HLA-I y PD-L1, y que están relacionadas con el significado biológico de estas moléculas en el contexto del inmunescape. Así, la expresión de PD-L1 parece ser un factor importante asociado con el tamaño tumoral en tumores HLA⁻, la mayoría de los tumores HLA⁻ PD-L1⁺ estaban en fases T3+T4, en comparación a los tumores HLA⁻ PD-L1⁻ (p=0.006) y HLA⁺ PD-L1⁻ (p=0.066, en este caso la diferencia no fue significativa, Tabla 2), haciendo al fenotipo HLA⁻ PD-L1⁺ más agresivo desde el punto de vista inmunológico. Interesantemente, encontramos que la mayoría de tumores con fenotipo de rechazo tumoral (HLA⁺ PD-L1⁻) presentaron estadios tumorales menos avanzados en comparación con los tumores HLA⁺ que además expresaban PD-L1 (HLA⁺ PD-L1⁺) aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa (p=0.055, Tabla 2). Cabe destacar también la asociación entre la expresión de HLA y PD-L1 con la afectación ganglionar (N): una alta proporción de pacientes con tumores de fenotipo HLA⁻ PD-L1⁺ (40%) presentaron afectación de uno o varios ganglios linfáticos (fases N1+N2) mientras que sólo un 6% de los pacientes con tumores de fenotipo HLA⁺ PD-L1⁻ (fenotipo de rechazo tumoral) se encontraban en esas fases N avanzadas (p=0.028, Tabla 2), ratificando nuevamente que el fenotipo HLA⁻ PD-L1⁺ es, desde nuestro punto de vista, el más agresivo (fenotipo de progresión), caracterizado éste por presentar mayor tamaño tumoral, mayor afectación linfática, estadio tumoral más avanzado, y menor infiltración por linfocitos T citotóxicos. Estos linfocitos presentaron preferentemente localización estromal formando la estructura que hemos denominado "no permisiva".

Tabla 2. Correlación entre tumor primario (T), afectación ganglionar (N), estadio tumoral (basado en la AAJC), patrón de infiltración y expresión HLA/PD-L1.

| Expresión HLA-I | Positivo | | Negativo | | p-valor |
|---------------------------|-----------------------|----------|-----------------------|----------|--------------------|
| | ^a Positivo | Negativo | ^a Positivo | Negativo | |
| Expresión PD-L1 | | | | | |
| Tumor primario (T) | | | | | |
| T1: 14 | 2 (13%) | 6 (35%) | 3 (30%) | 3 (18%) | ^b 0.006 |
| T2: 35 | 12 (80%) | 8 (47%) | 2 (20%) | 13 (76%) | ^c 0.066 |
| T3+T4: 10 | 1 (7%) | 3 (18%) | 5 (50%) | 1 (6%) | |
| Afectación ganglionar (N) | | | | | |
| N0: 42 | 8 (53%) | 16 (94%) | 6 (60%) | 12 (71%) | ^d 0.013 |
| N1+N2: 17 | 7 (47%) | 1 (6%) | 4 (40%) | 5 (29%) | ^e 0.028 |
| Estadio tumoral | | | | | |
| I:25 | 3 (20%) | 9 (53%) | 4 (40%) | 9 (53%) | ^f 0.055 |
| II+III: 34 | 12 (80%) | 8 (47%) | 6 (60%) | 8 (47%) | |
| Patrón de infiltración | | | | | |
| TILs: 41 | 15 (100%) | 13 (76%) | 5 (50%) | 8 (47%) | ^g 0.005 |
| Estromal: 18 | 0 (0%) | 4 (24%) | 5 (50%) | 9 (53%) | ^h 0.001 |

^a El grupo de tumores PD-L1 positivo incluye tumores con patrones de expresión tanto heterogénea como homogénea.

^b p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁻ PD-L1⁻ y HLA-I⁻ PD-L1⁺ y fases T2 y T3+T4

^c p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁻ PD-L1⁺ y HLA-I⁺ PD-L1⁻ y fases T2 y T3+T4

^d p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁺ PD-L1⁺ y HLA-I⁻ PD-L1⁻

^e p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁺ PD-L1⁻ y HLA-I⁻ PD-L1⁺

^f p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁺ PD-L1⁺ y HLA-I⁺ PD-L1⁻

^g p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁺ PD-L1⁺ y HLA-I⁻ PD-L1⁺

^h p-valor para la diferencia entre los fenotipos tumorales HLA-I⁺ PD-L1⁺ y HLA-I⁻ PD-L1⁻

En un estudio reciente que también han tenido en cuenta estos dos parámetros realizado en colangiocarcinoma intrahepático han encontrado resultados bastante parecidos a los de pulmón. Los tumores con pérdidas de expresión de HLA-I presentaban estadios tumorales más avanzadas que los HLA-I positivos y que los pacientes HLA⁺ PD-L1⁻ mostraron una supervivencia significativamente mayor, en comparación con los HLA⁺ PD-L1⁺ (288). En ese sentido, en nuestro estudio también observamos que tumores HLA⁺ PD-L1⁻ presentaron una

mejor supervivencia que los tumores positivos para ambos marcadores, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística. ($p=0.071$, Figura 22).

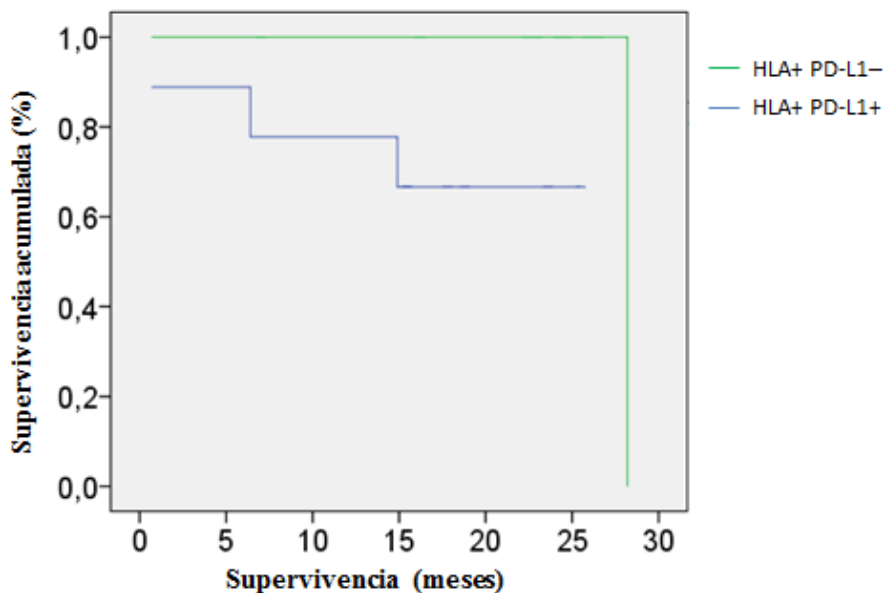


Figura 22. Análisis de la supervivencia y la expresión de HLA-I y PD-L1 en pacientes con cáncer de pulmón. La supervivencia de los grupos de pacientes fue comparada usando el método de Kaplan-Meier. La diferencia en la supervivencia de los pacientes se analizó usando el test log-Rank mediante el programa estadístico SPSS. Esta comparación no fue estadísticamente significativa ($p=0.071$). Pero hay una tendencia a una supervivencia peor en los pacientes con tumores HLA⁺ que además expresan PD-L1.

Todos estos datos resaltan la importancia de tomar en consideración tanto la expresión de HLA-I como la de PD-L1 a la hora de estudiar un posible tratamiento con inmunoterapia con inhibidores de “immunocheckpoints”. Sin embargo, la propuesta actual se basa exclusivamente en el estudio de la expresión de PD-L1 y la infiltración con células T (289). En general, la mayoría de los estudios evalúan la expresión de PD-L1 y el contexto inmunitario tumoral como marcador predictivo potencial de la respuesta. Sin embargo, esta clasificación presenta serias limitaciones. Es conocido que muchos pacientes con tumores fuertemente positivos para la expresión de PD-L1 no responden a anti-PD-L1, mientras que otros con baja expresión o negativos para PD-L1 demuestran una respuesta clínica objetiva (290). Lo primero de todo, el punto de corte de la expresión tumoral de PD-L1 permanece todavía por establecer. Además, las diferencias en la respuesta podría asociarse con el requisito de una densidad alta de células T CD8⁺ en estrecha proximidad a las células que expresan PD1/PD-L1 en el margen invasivo y dentro del tumor (291). La complejidad de la evaluación del “immunoscore” aumenta debido al hecho de que los patrones de infiltración son con frecuencia heterogéneos incluso dentro del mismo tumor (Figura 1 Perea et al. Oncotarget 2017). Al margen de esto, con la evaluación del infiltrado sólo con técnicas inmunohistoquímicas, no se profundiza en el

aspecto funcional y madurativo de las células. En este sentido, en otro estudio en el que he participado como coautor, hemos revelado diferencias fenotípicas importantes en las células T CD4 y CD8, que afectan no sólo a la función (citotóxicas, o supresoras), sino al estado funcional (células senescentes no funcionales) (292).

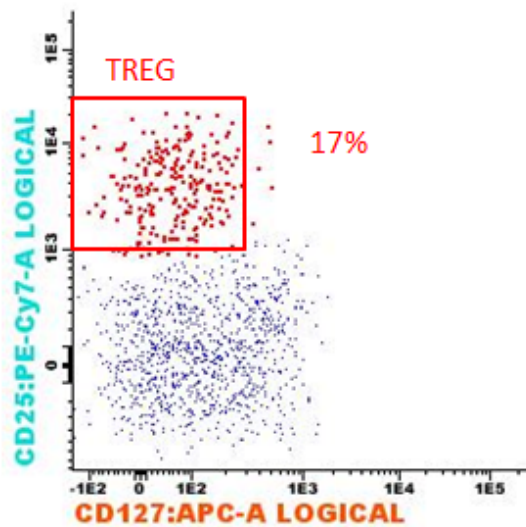
Creemos que la expresión de HLA-I y PDL-1 presenta notables ventajas a la propuesta por Teng y cols (PD-L1 e *immunoscore*) y que debería ser incluida en la evaluación de pacientes para terapia por varias razones. Primero, la expresión HLA-I es frecuentemente alterada en tumores de diferentes tipos histológicos (61, 55, 252). Además, la emergencia de variantes tumorales HLA-I negativas ocurre durante la historia natural del cáncer o tras inmunoterapia como resultado de la inmunoselección (20, 60, 261). Finalmente el análisis de HLA-I impacta sobre los patrones de infiltración y conjuntamente con PD-L1 permite la identificación fácil de fenotipos de rechazo y progresión como hemos indicado anteriormente.

4. El microambiente tumoral en NSCLC dificulta la respuesta de los efectores antitumorales en el cáncer de pulmón no microcítico.

En nuestro estudio llevamos a cabo un análisis de la infiltración tumoral mediante dos técnicas que se complementan entre sí: la inmunohistoquímica y la citometría de flujo. En términos globales hubo una correlación entre los resultados obtenidos por inmunohistoquímica y los obtenidos mediante citometría de flujo.

Nuestros resultados sugieren que durante el desarrollo tumoral se genera un microambiente inmunosupresor. Llevamos a cabo un análisis profundo estudiando las diferentes subpoblaciones linfocitarias desde un punto de vista madurativo y funcional. Este análisis se realizó en tres zonas distintas: zona distal del tumor, zona peritumoral y zona tumoral. Los resultados referidos a las células T tanto a nivel funcional (Th1, Th2, Th17), estado de activación, presencia de células T reguladoras y células NK han sido publicados previamente y fueron objeto de otra tesis (292). En este estudio se demostró que células T con fenotipo efector memoria, y con marcadores de activación se encontraba más frecuentemente en la zona tumoral, pero al mismo tiempo, en esta zona se identificaron una alta concentración de células T con fenotipo Treg y de marcadores asociados a inmunosupresión como CD39 tanto en población CD4 como CD8 (292). El infiltrado de células Treg por inmunohistoquímica se correlacionó con el observado por citometría de flujo (Figura 23). La acumulación de células Treg en la zona tumoral ha sido observado como un mecanismo de supresión que utilizan los tumores para escapar del sistema inmunitario (292).

A



B

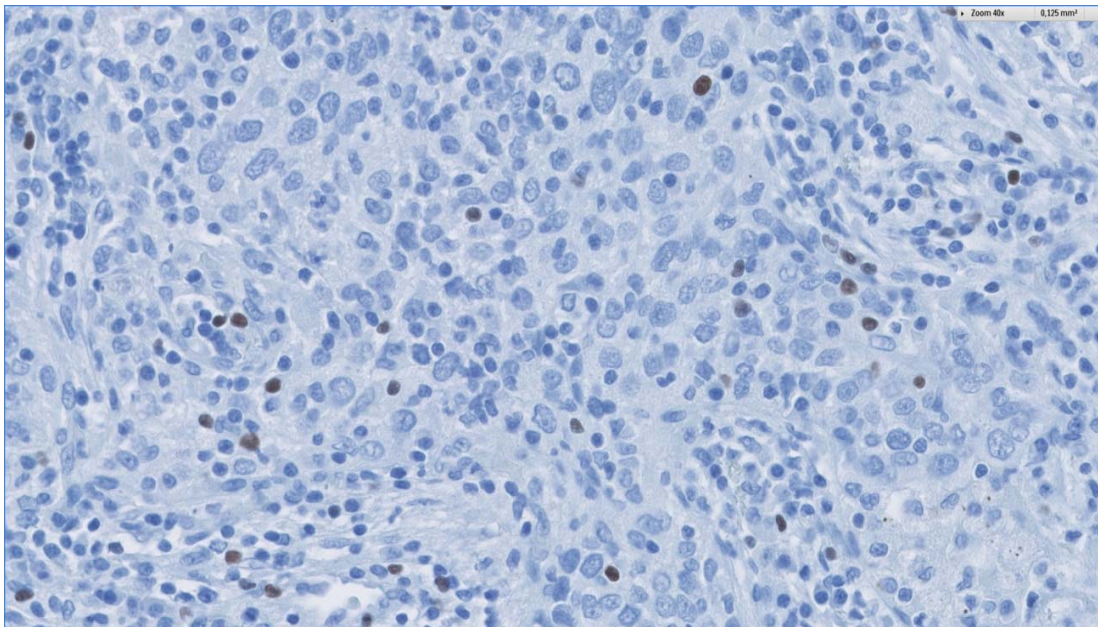


Figura 23. Correlación entre el infiltrado inmunitario observado por inmunohistoquímica y el observado por citometría de flujo.A) Diagram de citometría de flujo que representa la población de células Treg ($CD4^+ CD25^+ CD127^{low}$), **B)** Imagen representativa de un tumor embebido en parafina marcado con anticuerpo monoclonal anti Foxp3 con un patrón de infiltración alto/moderado de células Treg teñido por inmunohistoquímica. Tamaño imagen 40x.

Interesantemente, en nuestro estudio, el infiltrado por células Treg se asoció al tipo histológico del tumor mostrando que los adenocarcinomas presentan una mayor proporción de células Treg en comparación con el tipo histológico carcinoma epidermoide ($p=0.015$, datos no mostrados). Además encontramos una estrecha correlación en la frecuencia de células Treg en sangre periférica y en tumor (292). Sin embargo, una cuestión a resolver es si la frecuencia de

células Tregs es superior en tumores HLA-I positivos que en HLA-I negativos. Es decir, nos preguntamos si un gran cúmulo de células Tregs como ocurre en algunos tumores HLA-I positivos (Figura 24), haría innecesaria la pérdida adicional de HLA-I ya que por sí misma podría justificar el escape inmunitario a linfocitos T citotóxicos. Nuestros resultados, en este caso, fueron negativos y no encontramos diferencias en la comparación con ambos tipos de tumores. Sin embargo, se observó que los tumores HLA-I⁺ presentaron una mayor ratio o CD8/Treg (Figura 24). No obstante, nosotros pensamos que la elevación de células Tregs podría no influenciar significativamente en el control inmunitario llevado a cabo por los los linfocitos T-CD8. De hecho, en primer lugar, nosotros no hemos encontrado asociaciones de interés entre la frecuencia de Tregs y los parámetros clinico-patológicos incluidos en este estudio. En segundo lugar, existió una correlación positiva entre el grado de infiltración total y la presencia de células Treg (p=0.012, R=0.433) (p=0.015, R=0.489) (Figura 25). Es decir, una mayor presencia de Tregs se debía a una mayor infiltración global en los tumores analizados.

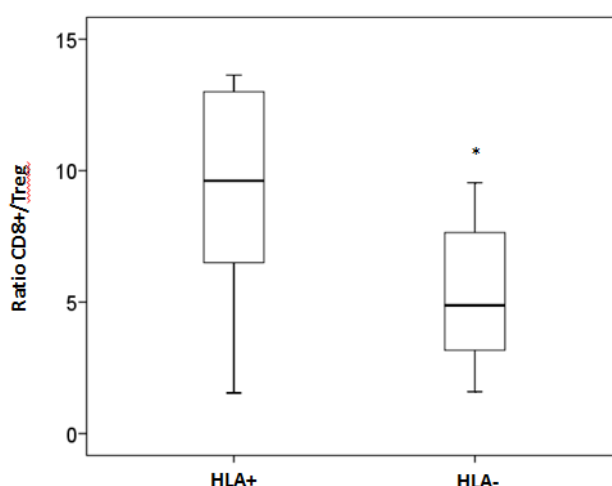


Figura 24. Ratio de células CD8⁺/Treg en tumores de pulmón según la expresión de HLA de clase I. Tumores HLA-I⁻ mostraron menor proporción de células T CD8⁺ (baja ratio CD8⁺/Treg). Análisis realizado mediante citometría de flujo multiparamétrica usando el test estadístico U de Mann Whitney mediante el programa estadístico SPSS.*p<0.05.

Se ha hablado del papel que puede tener estas células en relación a la quimioterapia, ya que algunos fármacos quimioterapéuticos ejercen su efecto antitumoral al menos en parte por la eliminación de las células Treg en el tumor y la potenciación de células citotóxicas (293). En nuestro estudio, sólo una una pequeña proporción de pacientes (7 pacientes) fue tratada con quimioterapia y no ha podido ser valorado este aspecto hasta el momento.

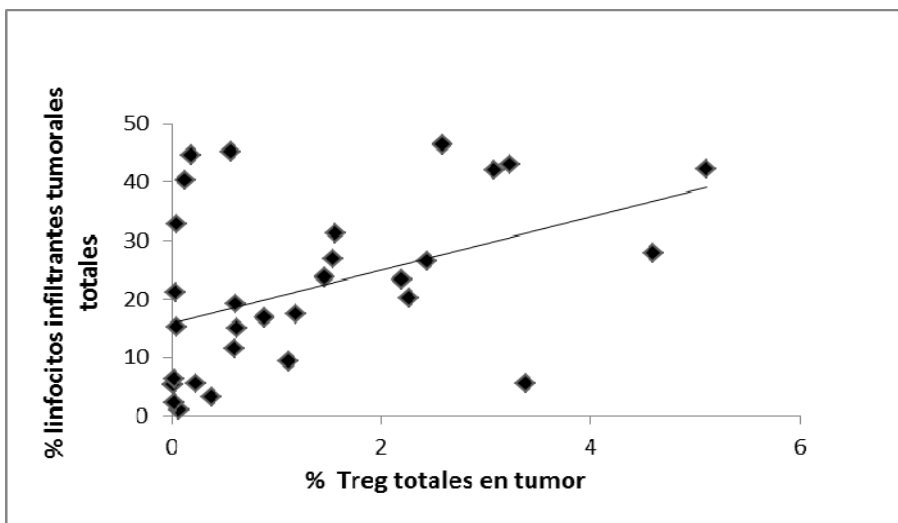


Figura 25. A) Correlación de Spearman entre la proporción de células Treg infiltradas en el tumor sobre el total de infiltrado y la proporción de linfocitos sobre el total del infiltrado en el tumor.

Por otra parte, teniendo en cuenta el porcentaje significativo de casos HLA-I negativos potencialmente sensibles a citotoxicidad NK y, en segundo lugar, que el pulmón se encuentra densamente infiltrado por estas células en comparación con otros tejidos (292), podríamos esperar un papel relevante para las células NK en cáncer de pulmón. De nuestro trabajo se puede deducir que en contraste con lo que ocurre en el tejido pulmonar no neoplásico, las células NK no infiltran bien el tejido tumoral, y son probablemente también excluidas de la zona intratumoral. Observamos un descenso gradual de estas células desde la zona tumoral a la zona distal analizada (Figura 3 Perea et al. Vaccines 2017). Es probable que la exclusión de estas células se deba a factores quimiotácticos o a las alteraciones fenotípicas que afectan a la maduración de estas células. Se encontró un descenso importante en la proporción de células con fenotipo citotóxico ($CD56^+ CD16^+$) y un enriquecimiento de células NK de fenotipo no citotóxico ($CD56^{bright} CD16^-$) indicando una alteración importante en ese tipo celular (292). Nosotros hemos querido profundizar más en las características fenotípicas de las células NK y para ello se estudiaron marcadores de activación como NKp46, CD161 y NKG2D. Hemos encontrado una disminución significativa de la expresión de marcadores de activación NKp46 y CD161 en sangre periférica de pacientes de NSCLC respecto al grupo control (Figura 26). Estas alteraciones fenotípicas se observan también en las células NK dentro del tumor. Sin embargo, el número de casos estudiado para estos marcadores dentro del tumor ha sido insuficiente para realizar un análisis estadístico apropiado. Finalmente, también investigamos si la proporción de células NK difería en relación a la expresión HLA. Nuestros resultados no mostraron ninguna asociación con la expresión de HLA.

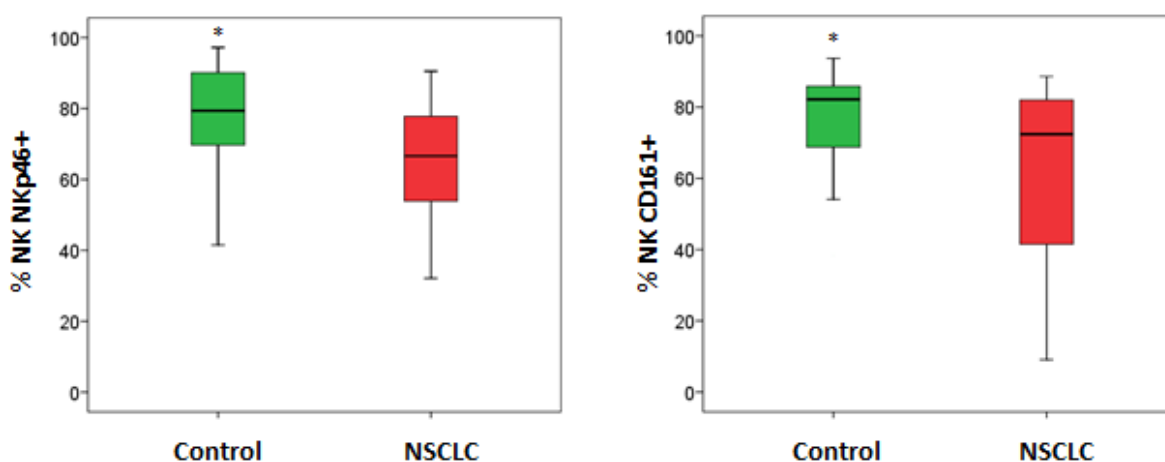


Figura 26. (A) Frecuencia media de células NK NKp46⁺. **(B)** Frecuencia media de células NK CD161⁺ en sangre periférica de pacientes con NSCLC (barras rojas) y controles (barras verdes) analizados por citometría de flujo. *p<0.05 analizado por software SPSS.

El papel de los TILs es por tanto controvertido, probablemente debido a la composición variable y distribución heterogénea, incluso dentro del mismo nódulo tumoral. De hecho, la mayoría de los estudios que se han publicado resultan conflictivos en el intento de relacionar los patrones de expresión funcional de TILs y resultado clínico en cáncer de pulmón (294). Nosotros creemos que esta controversia deriva por el uso exclusivo de la inmunohistoquímica para caracterizar las células T y que claramente, como hemos demostrado en nuestro estudio, es insuficiente para revelar la complejidad del microambiente tumoral (292, 295). Estos datos vienen a ratificar nuevamente que la evaluación del inmunoscore como se está haciendo actualmente es claramente insuficiente y no puede predecir por sí misma la respuesta de los pacientes a la inmunoterapia. Un análisis más comprensivo del contexto inmunitario se puede realizar si se integran análisis celulares individuales de la infiltración celular del tumor, con el perfil inmunogénico del mismo (expresión de HLA y PD-L1).

Finalmente, dentro del microambiente tumoral también hemos estudiado células de la inmunidad innata. Encontramos cambios cuantitativos importantes en la ratio de macrófagos M1/M2 que fueron asociados a la expresión de HLA y a las fases que hemos definido anteriormente. Así en la fase II, hubo un predominio de macrófagos M2 de tipo reparador sobre macrófagos M1 inflamatorios. Estos macrófagos M2 han sido involucrados en procesos de reparación tisular y progresión tumoral al inhibir la inmunidad adaptativa mediada por células Th1 y linfocitos T citotóxicos. Esta inhibición se lleva a cabo mediante la producción de factores de crecimiento, citoquinas y factores angiogénicos y quimiotácticos (296). Nosotros pensamos que este cambio en la polaridad M1/M2 que hemos observado en los

tumores HLA-I negativos puede estar relacionada con la reacción estromal densa rica en fibroblastos asociados a cáncer FAP⁺ (Figura 4 Perea et al. IJC 2017). Además, la producción de citoquinas (M2) como IL-10 y TGF- β podrían ser responsables de la disminución de expresión de HLA-I (297). Nosotros favorecemos la noción de que esta reacción estromal contribuye a la creación de un compartimento inmunoprivilegiado alrededor de los nidos tumorales HLA-I negativos, que excluye y limita la capacidad infiltrativa de las células T. De hecho, la eliminación de las células FAP⁺ se ha asociado a un cambio en la polarización de los linfocitos T de Th2 hacia un fenotipo Th1, marcado por un aumento de la expresión de IL-2 e IL-7, una disminución de IL-4 e IL-6 (298) y una mayor infiltración de células CD8⁺ citolíticas (299).

En conclusión, este estudio muestra cambios en el microambiente tumoral que afectan a la inmunogenicidad de la célula tumoral y al infiltrado leucocitario que favorecerían el escape inmunológico y la progresión del cáncer. Hemos observado que las alteraciones HLA resultan determinantes en la configuración del microambiente tumoral: tipo y patrón de infiltración observado. Hemos demostrado, que el mecanismo de LOH-HLA es altamente frecuente en cáncer de pulmón. De nuestros estudios se infiere además, que este mecanismo debe de constituir una etapa relevante en la expansión y evolución clonal del tumor. Dada la especial relevancia que estas pérdidas pueden tener en el contexto de la inmunoevasión, resulta imprescindible evaluar la existencia de LOH-HLA en pacientes candidatos a inmunoterapia específica, al ser la expresión HLA el factor crítico determinante para la eficacia terapéutica. Finalmente, la combinación del estudio de HLA y PD-L1 permite identificar fenotipos particularmente agresivos. Nuestros resultados podrían tener implicaciones para la selección óptima de pacientes candidatos a recibir inmunoterapia específica.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1. El cáncer de pulmón se desarrolla en un contexto desfavorable para el control inmunitario. Por una parte, los tumores adquieren frecuentemente características fenotípicas que impiden un reconocimiento eficaz por los mecanismos efectores antitumorales. Por otra, el desarrollo tumoral se produce en un microambiente inmunosupresor que afecta la actividad de los linfocitos T citotóxicos y células NK.
2. La pérdida de expresión total o parcial de antígenos HLA es un evento frecuente en cáncer de pulmón no microcítico. La ausencia de estas moléculas es el resultado de la combinación de dos diferentes mecanismos: pérdida total o parcial de todos los genes del complejo principal de histocompatibilidad y un descenso en la expresión de diversos componentes de la maquinaria de presentación antigénica.
3. El gen de la $\beta 2$ microglobulina no es una diana mutacional en cáncer de pulmón no microcítico que lo diferencia sustancialmente con lo observado en otros tumores, como el de colon y melanoma, y puede estar relacionada con la distinta carcinogénesis.
4. La alta frecuencia de LOH en los tumores HLA negativos en el cáncer de pulmón, sugiere que este mecanismo genético se encuentra sujeto a una fuerte presión inmunoselectiva que favorecería el escape tumoral. De hecho, la mayoría de las veces se observan patrones inmunohistológicos homogéneos que demuestran que este evento genético representa una etapa crítica en la expansión y la evolución clonal del tumor.
5. La expresión de HLA se asocia también al patrón de reacción estromal en el cáncer de pulmón. La ausencia de estas moléculas se relaciona a un patrón que hemos denominado “no permisivo” caracterizado por menor infiltración de linfocitos T $CD8^+$ y por el confinamiento de estas células en el estroma que rodea los nidos tumorales. Por el contrario, el patrón de infiltración (TILs) se encuentra significativamente asociado a tumores HLA-I positivos.
6. La densa reacción estromal con linfocitos, macrófagos y fibroblastos que es característica de muchos tumores HLA negativos, se encuentra asociada a un cambio en la polarización de macrófagos al fenotipo M2 y probablemente a citoquinas Th2.

7. La ausencia de HLA y expresión de PD-L1 (fenotipo HLA⁻ PDL1⁺), es observada en un subgrupo importante de tumores. Estas dos características fenotípicas representan dos vías independientes de inmunoevasión. Estos tumores presentan características de mayor agresividad: mayor tamaño tumoral, afectación linfática, estadios tumorales más avanzados, menor infiltración de linfocitos T citotóxicos y un patrón de infiltración estromal “no permisivo”.
8. Los pacientes con cáncer de pulmón mostraron en sangre periférica una mayor frecuencia de células con actividad inmunosupresora (células Tregs) y de células NK con alteraciones fenotípicas (menor expresión de marcadores de activación como NKp46 y CD161). Estos cambios que se detectan tanto en la sangre de los pacientes como en las inmediaciones del tumor no están relacionadas con la expresión de HLA-I del tumor, y podrían ser relevantes en la evolución de los tumores en los que la maquinaria de presentación antigénica permanezca intacta.
9. La frecuente pérdida de HLA a través de LOH-HLA, su carácter irreversible, y su asociación con un patrón de respuesta inmunitaria de localización estromal, hace de estos tumores potencialmente resistentes a inmunoterapias antígeno-específica. Nuestros resultados apoyarían por tanto que el análisis conjunto de HLA y PD-L1 en los tejidos es un elemento imprescindible que contribuiría a una mejor selección de pacientes respondedores a la inmunoterapia con inhibidores de los puntos de control “immunocheckpoints”.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, et al. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer* 2009, 4: 931-991.
2. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, et al. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer* 2012, 12: 298-306.
3. Febbo PG, Ladanyi M, Aldape KD, et al. NCCN Task Force report: evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 2011, 9 (Suppl5): S1-S32 quiz S33.
4. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, et al. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clinic Proceedings* 2008, 83: 584-594
5. Dunn GP, Old L J, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004, 21: 137-148.
6. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, et al. Cancer genome landscapes. *Science* 2013, 339: 1546-1558.
7. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011, 144: 646-674.
8. Wölfel T, Hauer M, Schneider J, et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 1995, 269: 1281-1284.
9. Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, et al. A mutated beta-catenin gene encodes a melanoma-specific antigen recognized by tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1996, 183: 1185-1192.
10. Brändle D, Brasseur F, Weynants P, et al. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *The Journal of Experimental Medicine* 1996, 183: 2501-2508.
11. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 1991, 254: 1643-1647.
12. Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, et al. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *The Journal of Experimental Medicine* 1994. 180: 35-42
13. Correale P, Walmsley K, Nieroda C, et al. In vitro generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *Journal of the National Cancer Institute* 1997, 89: 293-300.
14. Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, et al. Identification of an immunodominant peptide of HER2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *The Journal of Experimental Medicine* 1995, 181: 2109-2117.

15. Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen Pet al. Tumour antigens recognized by T lymphocytes: At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 2014, 14: 135–146.
16. Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado CH, et al. Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994(a), 91: 3515–3519.
17. Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, et al. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 1994(b) 180: 347–352.
18. van der Burg SH, Melief CJM. Therapeutic vaccination against human papilloma virus induced malignancies. *Current Opinion in Immunology* 2011, 23: 252–257.
19. Long, HM, Parsonage G, Fox CP, et al. Immunotherapy for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Drug News & Perspectives* 2010, 23: 221–228.
20. Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol.* 2002, 3: 999-1005.
21. Tartour E, Gey A, Sastre-Garau X, et al. Prognostic value of intratumoral interferon gamma messenger RNA expression in invasive cervical carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 1998, 90: 287–294.
22. Bais AG, Beckmann I, Lindemans J, et al. A shift to a peripheral Th2-type cytokine pattern during the carcinogenesis of cervical cancer becomes manifest in CIN III lesions. *Journal of Clinical Pathology* 2005, 58: 1096–1100.
23. Hiraoka N, Yamazaki-Itoh R, Ino Y, et al. CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology* 2011, 140: 310–321.
24. Rebouissou S, Amessou M, Couchy G, et al. Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 2009, 457: 200–204.
25. Nomura A, Stemmermann GN, Chyou PH, et al. Helicobacter pylori infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *The New England Journal of Medicine* 1991, 325: 1132–1136.
26. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010, 140: 883–899.
27. Takahashi H, Ogata H, Nishigaki R, et al. Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell* 2010, 17: 89–97.
28. Sripa B, Brindley PJ, Mulvenna J, et al. The tumorigenic liver fluke *Opisthorchis viverrini*—Multiple pathways to cancer. *Trends in Parasitology* 2012, 28: 395–407.
29. Vennervald BJ, Polman K. Helminths and malignancy. *Parasite Immunology* 2009, 31: 686–696.

30. Colotta F, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009, 30: 1073–1081.
31. Hahn MA, Hahn T, Lee D, et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer Research* 2008, 68: 10280–10289.
32. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002, 420: 860–867.
33. Al Zaid Siddiquee K, Turkson J. STAT3 as a target for inducing apoptosis in solid and hematological tumors. *Cell Research* 2008, 18: 254–267.
34. Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008, 454: 436–444.
35. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, et al. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nature Reviews Cancer* 2013, 13: 759–771.
36. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984, 226: 1097–1099.
37. Fukuda A, Wang SC, Morris JP, et al. Stat3 and MMP7 contribute to pancreatic ductal adenocarcinoma initiation and progression. *Cancer Cell* 2011, 19: 441–455.
38. Lesina M, Kurkowski MU, Ludes K, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 trans-signaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer. *Cancer Cell* 2011, 19: 456–469.
39. Gao SP, Mark KG, Leslie K, et al. Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas. *The Journal of Clinical Investigation* 2007, 117: 3846–3856.
40. Bronte-Tinkew DM, Terebiznik M, Franco A, et al. Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A activates the signal transducer and activator of transcription 3 pathway in vitro and in vivo. *Cancer Research* 2009, 69: 632–639.
41. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003, 114: 181–190.
42. Bollrath J, Pesse TJ, von Burstin VA, et al. gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009, 15: 91–102.
43. Shchors K, Shchors E, Rostker F, et al. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes & Development* 2006, 20: 2527–2538.
44. Bingle L, Lewis CE, Corke KP, et al. Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *British Journal of Cancer* 2007, 94: 101–107.
45. Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008, 13: 206–220.

46. Rivera LB, Bergers G. Intertwined regulation of angiogenesis and immunity by myeloid cells. *Trends in Immunology* 2015, 36: 240–249.
47. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. *Immunity* 2013, 39: 782–795.
48. Lin EY, Li J, Gnatovskiy L, et al. Macrophages regulate the angiogenic switch in a mouse model of breast cancer. *Cancer Research* 2006, 66: 11238–11244.
49. Pyonteck SM, Akkari L, Schuhmacher AJ, et al. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nature Medicine* 2013, 19: 1264–1272.
50. Leone P, Shin EC, Perosa F, et al. MHC Class I Antigen Processing and Presenting Machinery: Organization, Function, and Defects in Tumor Cells. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105: 1172–1187.
51. Romero P, Valmori D, Pittet MJ, et al. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev* 2002, 188: 81-96.
52. Moretta L, Bottino C, Pende D, et al. Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol* 2002, 32: 1205–1211.
53. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997, 18: 89-95.
54. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001, 83: 117-158.
55. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N. "Hard" and "soft" lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 2010, 127: 249-256.
56. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 1995, 16: 487-494.
57. Marincola FM, Jafee EM, Hicklin DJ, et al. Escape of human solid tumors from T cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 2000, 74: 181–273.
58. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, et al. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 2002, 12: 3-13.
59. Benítez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, et al. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998, 52: 520-529.
60. Paschen A, Méndez RM, Jimenez P, et al. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 2003, 103: 759–767.

61. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. A, Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. *Cancer Immunol Immunother* 2012, 61: 1359–1371
62. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. B2 microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, 91: 4751-4755.
63. Hicklin DJ, Dellaratta DV, Kishore R, et al. Beta2-microglobulin gene mutations in human melanoma cells: molecular characterization and implications for immune surveillance. *Melanoma Res* 1997, 7 suppl 2: S67-S74.
64. Pérez B, Benitez R, Fernández MA, et al. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens*. 1999, 53: 569-572.
65. Browning MJ, Krausa P, Rowan A, et al. Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90: 2842-2845.
66. Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, et al. Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol* 1994, 153: 1225-1237.
67. Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, et al. Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 1996, 47: 372-3781.
68. Griffioen M, Ouwerkerk IJ, Harten V, et al. HLA-B locus- specific downregulation in human melanoma requires enhancer A as well as a sequence element located downstream of the transcription initiation site. *Immunogenetics* 2000, 52: 121-128.
69. Real LM, Jimenez P, Kirkin A, et al. Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother* 2001, 49: 621-628.
70. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, et al. Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 2001, 94: 243-251
71. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* 2008, 101: 249-276.
72. Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, et al. Ruiz-Cabello F. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer*. 2007, 7: 34. PubMed
73. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000, 21: 455-464.
74. Nie Y, Yang G, Song Y, et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis*. 2001, 22: 1615-1623.

75. Leon P, Shin EC, Perosa F, et al. MHC class I antigen processing and presenting machinery: organization, function, and defects in tumor cells. *J Natl Cancer Inst* 2013, 105: 1172-1187.
76. Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, et al. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: b2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 2003, 61: 211-219.
77. Kloor M, Becker C, Benner A, et al. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res* 2005, 65: 6418-6424.
78. Okazaki T, Honjo T. The PD-1/PDL-1 pathway in immunological tolerance. *TRENDS in Immunology* 2006, 27: 195-201.
79. Lee J, Chu I, Heo J, et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. *Hepatology* 2004, 40: 667-676.
80. Ishida, M, Iway Y, Tanaka Y, et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol Lett* 2002, 84: 57-62.
81. Blank C, Brown I, Peterson AC, et al. PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Research* 2004, 64: 1140-1145.
82. Freeman, GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of Experimental Medicine* 2000, 192: 1027-1034.
83. Curiel TJ, Wei S, Dong H, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med* 2003, 9:562-567.
84. Strome SE, Dong H, Tamura H, et al. B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. *Cancer Reserch* 2003, 63: 6501-6505.
85. Li N, Qin H, Li X, et al. Potent systemic antitumor immunity induced by vaccination with chemotactic- prostate tumor associated antigen genemodified tumor cell and blockade of B7-H1. *J Clin Immunol* 2007, 27: 117-130.
86. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012, 366: 2443-254.
87. Hamid O, Robert C, Daud A, et al. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med* 2013, 369: 134-144.
88. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012, 366: 2455-2465.
89. Ichikawa M, Chen L. Role of B7-H1 and B7-H4 molecules in down-regulating effector phase of T-cell immunity: novel cancer escaping mechanisms. *Front Biosci* 2005, 10: 2856-2860.

90. Geng H, Zhang GM, Xiao H, et al. HSP70 vaccine in combination with gene therapy with plasmid DNA encoding sPD-1 overcomes immune resistance and suppresses the progression of pulmonary metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2006, 118: 2657-2664.
91. Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96: 10964–10967.
92. Chappell DB, Restifo NP. T cell-tumor cell: A fatal interaction? *Cancer Immunology Immunotherapy* 1998, 47: 65–71.
93. Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, et al. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 1999, 162: 3273–3279.
94. Igney FH, Behrens CK, Krammer PH. CD95L mediates tumor counterattack in vitro but induces neutrophil-independent tumor rejection in vivo. *Int J Cancer* 2005, 113: 78-87.
95. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies-integrating mammalian biology. *Cell* 2001, 104: 487-501.
96. Aubrey M. Glycans in cell interaction and recognition. CRC Press, 2003.
97. Elola M, Wolfenstein-Todel C, Troncoso M, et al. Galectins: matricellular glycanbinding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci* 2007, 64: 1679-1700.
98. Liu FT. Galectins: a new family of regulators of inflammation. *Clin Immunol* 2000, 97: 79-88.
99. Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. *Int Arch Allergy Immunol* 2005, 136: 385-400.
100. Thijssen VL, Postel R, Brandwijk RJ, et al. Galectin-1 is essential in tumor angiogenesis and is a target for antiangiogenesis therapy. *Proc Natl Acad Sci* 2006, 103: 15975-15980.
101. Paz A, Haklai R, Elad-Sfadia G, et al. Galectin-1 binds oncogenic H-Ras to mediate Ras membrane anchorage and cell transformation. *Oncogene* 2001, 20: 7486-74993.
102. van den Brule FA, Waltregny D, Castronovo V. Increased expression of galectin-1 in carcinoma-associated stroma predicts poor outcome in prostate carcinoma patients. *J Pathol* 2001, 193: 80-97.
103. Langbein S, Brade J, Badawi JK, et al. Gene-expression signature of adhesion/growth-regulatory tissue lectins (galectins) in transitional cell cancer and its prognostic relevance. *Histopathology* 2007, 51: 681-690.
104. Wu1 AA, Drake V, Huang HS, et al. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology* 2015, 4: e1016700.

105. Hellebrekers DM, Castermans K, Vire E, et al. Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications. *Cancer Research* 2006, 66: 10770-10777.
106. Wu T. The role of vascular cell adhesion molecule-1 in tumor immune evasion. *Cancer Research* 2007, 67: 6003-6006.
107. Rose DM, Grabovsky V, Alon R, et al. The Affinity of Integrin $\alpha 4 \beta 1$ Governs Lymphocyte Migration. *J Immunol* 2001, 167 : 2824-2830.
108. Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2011, 12: 58–67.
109. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell* 2009, 138: 271–285.
110. Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990, 248: 1349–1356.
111. Chen L, Mc Gowan P, Ashe S, et al. Tumor immunogenicity determines the effect of B7 costimulation on T cell-mediated tumor immunity. *J Exp Med* 1994, 179: 523–532.
112. Astigiano S, Morandi B, Costa R, et al. Eosinophil granulocytes account for indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated immune escape in human non small cell lung cancer. *Neoplasia* 2005, 7: 390-396.
113. Okamoto A, Nikaido T, Ochiai K, et al. Indoleamine 2, 3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells. *Clin Cancer Research* 2005, 11: 6030-6039.
114. Brandacher G, Perathoner A, Ladurner R, et al. Prognostic value of indoleamine 2, 3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. *Clin Cancer Research* 2006, 12: 1144-1151.
115. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003, 9: 1269-1274.
116. Fallarino F, Grohmann U, You S, et al. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 2006, 176: 6752-6761.
117. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, et al. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 2002, 9: 1069-1077.
118. Wainwright DA, Balyasnikova IV, Chang AL, et al. IDO expression in brain tumors increases the recruitment of regulatory T cells and negatively impacts survival. *Clin Cancer Res* 2012, 18: 6110-6121.

119. Muller AJ, DuHadaway JB, Donover PS, et al. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. *Nat Med* 2005, 11: 312-319.
120. Qian F, Vilella J, Wallace PK, et al. Efficacy of levo-1- methyl tryptophan and dextro-1- methyl tryptophan in reversing indoleamine-2, 3-dioxygenase-mediated arrest of T-Cell proliferation in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Research* 2009, 69: 5498-5504.
121. Suzuki S, Tone S, Takikawa O, et al. Expression of indoleamine 2, 3-dioxygenase and tryptophan 2, 3-dioxygenase in early concepti. *Biochem J* 2001, 355: 425-429.
122. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005, 5: 641-654.
123. Wu G, Morris JS. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem J* 1998, 336: 1-17.
124. de Boniface J, Mao Y, Schmidt-Mende J, Kiessling R, et al. Expression patterns of the immunomodulatory enzyme arginase 1 in blood, lymph nodes and tumor tissue of early-stage breast cancer patients. *Oncoimmunology* 2012, 1: 1305.
125. Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Research* 2009; 69: 1553-1560.
126. Umansky V, Sevko A. Tumor microenvironment and myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Microenviron* 2013, 6: 169-177.
127. Raber P, Ochoa AC, Rodríguez PC. Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives. *Immunol Invest* 2012, 41: 614-634.
128. Rodriguez PC, Quiceno DG, Ochoa AC. L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood* 2007, 109: 1568-1573.
129. Kostourou V, Cartwright J, Johnstone A, et al. The role of tumour-derived iNOS in tumour progression and angiogenesis. *British J Cancer* 2010, 104: 83-90.
130. Blesson S, Thiery J, Gaudin C, et al. Analysis of the mechanisms of human cytotoxic T lymphocyte response inhibition by NO. *Int Immunol* 2002, 14: 1169-1178.
131. Tenu JP, Lepoivre M, Moali C, et al. Effects of the New Arginase Inhibitor N ω -Hydroxynor-L-Arginine on NO Synthase Activity in Murine Macrophages. *Nitric Oxide* 1999, 3: 427-438.
132. Kitayama J, Emoto S, Yamaguchi H, et al. CD90 (+) CD45 (-) intraperitoneal mesotheliallike cells inhibit T cell activation by production of arginase I. *Cell Immunol* 2014, 288: 8-14.

133. Rodriguez PC, Quiceno DG, Zabaleta J, et al. Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses. *Cancer Research* 2004, 64: 5839-5849.
134. Zhou R, He PL, Ren YX, et al. Myeloid suppressor cell-associated immune dysfunction in CSA1M fibrosarcoma tumor-bearing mice. *Cancer Sci* 2007, 98: 882-889.
135. Serafini P, Meckel K, Kelso M, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med* 2006, 203: 2691-2702.
136. Ibiza S, Serrador J. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses. *Inmunología* 2008, 27: 103-117.
137. Gorelik L, Flavell RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat Med* 2001, 7: 1118-1122.
138. Cheng ML, Chen HW, Tsai JP, et al. Clonal restriction of the expansion of antigen-specific CD8C memory T cells by transforming growth factor- β . *J leukocyte Biol* 2006, 79: 1033-1042.
139. Bright JJ, Sriram S. TGF- β inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* 1998, 161: 1772-1777.
140. Holter W, Kalthoff F, Pickl W, et al. Transforming growth factor-beta inhibits IL-4 and IFN-gamma production by stimulated human T cells. *Int Immunol* 1994, 6: 469.
141. Fantini MC, Becker C, Monteleone G, et al. Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4C CD25_i T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J Immunol* 2004, 172: 5149-5153.
142. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 2012, 36: 362-373.
143. Martin-Orozco N, Muranski P, Chung Y, et al. T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* 2009, 31: 787-798.
144. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009, 114: 1141-1149.
145. Vitale M, Cantoni C, Pietra G, et al. Effector of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function. *Eur J Immunol* 2014, 44: 1582-1592.
146. Mumm JB, Oft M. Cytokine-based transformation of immune surveillance into tumor-promoting inflammation. *Oncogene* 2008, 27: 5913-5919.
147. Kim J, Modlin RL, Moy RL, et al. IL-10 production in cutaneous basal and squamous cell carcinomas. A mechanism for evading the local T cell immune response. *J Immunol* 1995, 155: 2240-2247.

148. Huang M, Wang J, Lee P, et al. Human non-small cell lung cancer cells express a type 2 cytokine pattern. *Cancer Research* 1995, 55: 3847-3853.
149. Venetsanakos E, Beckman I, Bradley J, et al. High incidence of interleukin 10 mRNA but not interleukin 2 mRNA detected in human breast tumours. *Br J Cancer* 1997, 75: 1826-1830.
150. Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, et al. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol* 2010, 11: 27.
151. Taylor A, Verhagen J, Blaser K, et al. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor- β : the role of T regulatory cells. *Immunology* 2006, 117: 433-442.
152. Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, et al. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 1999, 29: 4022-4029.
153. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997, 18: 102-104.
154. Wang T, Niu G, Kortylewski M, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004, 10: 48-54.
155. Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, et al. Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF- α , but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 1995, 25: 1943-1950.
156. Yue FY, Dummer R, Geertsen R, et al. Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 1997, 71: 630-637.
157. Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, et al. Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J Immunol* 1997, 159: 3195-3202.
158. Nishijima K, Hisatsune T, Minai Y, et al. Anti-IL-10 Antibody Enhances the Proliferation of CD8C T Cell Clones: Autoregulatory Role of Murine IL-10 in CD8C T Cells. *Cell Immunol* 1994, 154: 193-201.
159. Krengel U, Bousquet PA. Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front Immunol* 2014, 5: 325.
160. McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol* 1999, 163: 3718-3726.
161. Das T, Sa G, Paszkiewicz-Kozik E, et al. Renal cell carcinoma tumors induce T cell apoptosis through receptor-dependent and receptor-independent pathways. *J Immunol* 2008, 180: 4687-4696.
162. Rayman P, Wesa AK, Richmond AL, et al. Effect of renal cell carcinomas on the development of type 1 T-cell responses. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 6360S-6366S.

163. Biswas K, Richmond A, Rayman P, et al. GM2 expression in renal cell carcinoma: potential role in tumor-induced T-cell dysfunction. *Cancer Research* 2006, 66: 6816-6825.
164. Crespo FA, Sun X, Cripps JG, et al. The immunoregulatory effects of gangliosides involve immune deviation favoring type-2 T cell responses. *J Leukoc Biol* 2006, 79: 586-5895.
165. Thornton MV, Kudo D, Rayman P, et al. Degradation of NFkappaB in T cells by gangliosides expressed on renal cell carcinomas. *J Immunol* 2004, 172: 3480-3490.
166. Lee HC, Wondimu A, Liu Y, et al. Ganglioside inhibition of CD8C T cell cytotoxicity: interference with lytic granule trafficking and exocytosis. *J Immunol* 2012, 189: 3521-3527.
167. Kerkar SP, Restifo NP. Cellular Constituents of Immune Escape within the Tumor Microenvironment. *Cancer Resarch* 2012, 72, 3125-3130.
168. Dumitriu IE, Dumbar DR, Howie SE, et al. Human Dendritic Cells Produce TGF- β 1 under the Influence of Lung Carcinoma Cells and Prime the Differentiation of CD4+ CD25+ Foxp3+ Regulatory T Cells. *Journal of Immunology* 2009, 182, 2795–2807.
169. Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, et al. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 2005, 202: 907–912.
170. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2010, 363: 711–723.
171. Chen W, Jin W, Wahl SM. Engagement of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA- 4) induces transforming growth factor β (TGF- β) production by murine CD4+ T cells. *J Exp Med* 1998, 188: 1849-1857.
172. Suttmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, et al. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25+ regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 2001, 194: 823–832.
173. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med* 2011, 364: 2517-2526.
174. McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo K, et al. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002, 16: 311–323.
175. Geissmann F, Manz MG, Jung S, et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* 2010, 327: 656–661.
176. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, et al. The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008, 8: 618–631.
177. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol* 2009, 182: 4499–4506.

178. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colonystimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. *J Immunol* 1999, 162: 5728–5737.
179. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2009, 9: 162–74.
180. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 2006, 116: 2777–2790.
181. Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, et al. Expansion of myeloid immune suppressor Gr+CD11b+ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 2004, 6: 409–421.
182. Highfill SL, Rodriguez PC, Zhou Q, et al. Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 2010, 116: 5738–5747.
183. Srivastava MK, Sinha P, Clements VK, et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Research* 2010, 70: 68–77.
184. Huang B, Pan PY, Li Q, et al. Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Research* 2006, 66: 1123–1131.
185. Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 2010, 141:39–51.
186. Guiducci C, Vicari AP, Sangaletti S, et al. Redirecting in vivo elicited tumor infiltrating macrophages and dendritic cells towards tumor rejection. *Cancer Research* 2005, 65: 3437–3446.
187. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, et al. IL-12 release by engineered T cells expressing chimeric antigen receptors can effectively muster an antigen-independent macrophage response on tumor cells that have shut down tumor antigen expression. *Cancer Research* 2011, 71: 5697–5706.
188. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998, 392: 245–252.
189. Fricke I, Gabrilovich DI. Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison. *Immunol Invest* 2006, 35: 459–483.
190. Kraman M, Bambrough PJ, Arnold JN, et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. *Science* 2010, 330: 827–830.
191. Séguier S, Tartour E, Guérin C, et al. Inhibition of the differentiation of monocyte-derived dendritic cells by human gingival fibroblasts. *PLoS One* 2013, 8: e70937.
192. Haniffa MA., Wang X, Holtick U, et al. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *Journal of Immunology* 2007, 179: 1595–1604.

193. Pinchuk IV, Saada JI, Beswick EJ, et al. PD-1 ligand expression by human colonic myofibroblasts/fibroblasts regulates CD4+ T-cell activity. *Gastroenterology* 2008, 135: 1228–1237.
194. Wu AA, Drake V, Huang HS, et al. Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells. *Oncoimmunology* 2015, 4: e1016700.
195. Groh V, Wu J, Yee C, et al. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002, 419: 734–738.
196. Raffaghello L, Prigione I, Airoidi I, et al. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 2004, 6: 558–568.
197. Topfer K, Kempes S, Muller N, et al. Tumor evasion from T cell surveillance. *J Biomed. Biotechnol.* 2011, 918471.
198. Becht E, Giraldo NA, Germain C, et al. Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. *Advances in Immunology* 2016, 130: 95–148.
199. Ness N, Andersen S, Valkov A, et al. Infiltration of CD8+ lymphocytes is an independent prognostic factor of biochemical failure-free survival in prostate cancer. *Prostate* 2014, 74: 1452–1461.
200. Tian C, Lu S, Fan Q, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ or CD3+ T lymphocytes and interleukin-2 expression in radically resected non-small cell lung cancer. *Chinese Medical Journal* 2015, 128: 105–110.
201. Giraldo NA, Becht E, Pagès F, et al. Orchestration and prognostic significance of immune checkpoints in the microenvironment of primary and metastatic renal cell cancer. *Clinical Cancer Research* 2015, 21: 3031–3040.
202. Cermáková P, Melichar B, Tomsová M, et al. Prognostic significance of CD3+ tumor-infiltrating lymphocytes in patients with endometrial carcinoma. *Anticancer Research* 2014, 34: 5555–5561.
203. Brunner SM, Kesselring R, Rubner C, et al. Prognosis according to histochemical analysis of liver metastases removed at liver resection. *The British Journal of Surgery* 2014, 101: 1681–1691.
204. Remark R, Alifano M, Cremer I, et al. Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: Influence of tumor origin. *Clinical Cancer Research* 2013, 19: 4079–4091.
205. Teng MWL, Galon J, Fridman W, et al. From mice to humans: Developments in cancer immunoediting. *The Journal of Clinical Investigation* 2015, 125: 3338–3346.
206. DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro-versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Reviews* 2010, 29: 309–316.

207. Barbera-Guillem E, Nelson MB, Barr B, et al. B lymphocyte pathology in human colorectal cancer. Experimental and clinical therapeutic effects of partial B cell depletion. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2000, 48: 541–549.
208. Tan T, Coussens LM. Humoral immunity, inflammation and cancer. *Current Opinion in Immunology* 2007, 19: 209–216.
209. Barbera-Guillem E, May KFJ, Nyhus JK, et al. Promotion of tumor invasion by cooperation of granulocytes and macrophages activated by anti-tumor antibodies. *Neoplasia* 1999, 1: 453–460.
210. Ammirante M, Luo J, Grivennikov S, et al. B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. *Nature* 2010, 464: 302–305.
211. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, et al. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *OncoImmunology* 2013, 2: e25443.
212. DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: Therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *Journal of Immunology* 2010, 184: 4006–4016.
213. Al-Shibli KI, Donnem T, Al-Saad S, et al. Prognostic effect of epithelial and stromal lymphocyte infiltration in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 2008, 14: 5220–5227.
214. Hernández-Prieto S, Romera A, Ferrer M, et al. A 50-gene signature is a novel scoring system for tumorinfiltrating immune cells with strong correlation with clinical outcome of stage I/II non-small cell lung cancer. *Clinical & Translational Oncology* 2015, 17: 330–338.
215. Pelletier MP, Edwardes MD, Michel RP, et al. Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer: A multivariate analysis. *Canadian Journal of Surgery* 2001, 44: 180–188.
216. Dieu-Nosjean M, Antoine M, Danel C, et al. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology* 2008, 26: 4410–4417.
217. Germain C, Gnjatic S, Tamzalit F, et al. Presence of B cells in tertiary lymphoid structures is associated with a protective immunity in patients with lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2010, 189: 832–844.
218. Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015, 521: 99–104.
219. Parker Harp CR, Archambault AS, Sim J, et al. B cell antigen presentation is sufficient to drive neuroinflammation in an animal model of multiple sclerosis. *Journal of Immunology* 2015, 194: 5077–5084.
220. Gatto D, Brink R. The germinal center reaction. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, 126: 898–907.

221. de Wit J, Souwer Y, Jorritsma T, et al. Antigen-specific B cells reactivate an effective cytotoxic T cell response against phagocytosed Salmonella through cross-presentation. *PLoS One* 2010, 5: e13016.
222. Deola S, Panelli MC, Maric D, et al. Helper B cells promote cytotoxic T cell survival and proliferation independently of antigen presentation through CD27/CD70 interactions. *Journal of Immunology* 2008, 180: 1362–1372.
223. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, et al. CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research* 2012, 18: 3281–3292.
224. Shi J, Gao Q, Wang Z, et al. Margininfiltrating CD20(+) B cells display an atypical memory phenotype and correlate with favorable prognosis in hepatocellular carcinoma. *Clinical Cancer Research* 2013, 19: 5994–6005.
225. Tao H, Lu L, Xia Y, et al. Antitumor effector B cells directly kill tumor cells via the Fas/FasL pathway and are regulated by IL-10. *European Journal of Immunology* 2015, 45: 999–1009.
226. Poli A, Michel T, Thérésine M, et al. CD56bbright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 2009, 126: 458–465.
227. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, et al. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000, 88: 577–583.
228. Hsia J, Chen J, Chen C, et al. Prognostic significance of intratumoral natural killer cells in primary resected esophageal squamous cell carcinoma. *Chang Gung Medical Journal* 2000, 28: 335–340.
229. Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, et al. Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Research* 2011, 71: 5412–5422.
230. Chaput N, Svrcek M, Aupérin A, et al. Tumour-infiltrating CD68+ and CD57+ cells predict patient outcome in stage II-III colorectal cancer. *British Journal of Cancer* 2013, 109: 1013–1022.
231. Ma J, Liu L, Che G, et al. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010, 10: 112.
232. Shimura S, Yang G, Ebara S, et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: Association with cancer progression. *Cancer Research* 2000, 60: 5857–5861.
233. Jensen TO, Schmidt H, Møller HJ, et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. *Journal of Clinical Oncology* 2009, 27: 3330–3337.
234. Sjødahl G, Lövgren K, Lauss M, et al. Infiltration of CD3+ and CD68+ cells in bladder cancer is subtype specific and affects the outcome of patients with muscle-invasive tumors. *Urologic Oncology* 2014, 32: 791–797.

235. Zhang BC, Gao J, Wang J, et al. Tumor-associated macrophages infiltration is associated with peritumoral lymphangiogenesis and poor prognosis in lung adenocarcinoma. *Medical Oncology* 2011, 28: 1447–1452.
236. Ostuni R, Kratochvill F, Murray PJ, et al. Macrophages and cancer: from mechanisms to therapeutic implications. *Trends in Immunology*, 2015, 36: 229-239.
237. Franklin RA, Liao W, Sarkar A, et al. The cellular and molecular origin of tumor-associated macrophages. *Science* 2014, 344: 921–925.
238. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: Cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 2010, 11: 889–896.
239. Ohri CM, Shikotra A, Green RH, et al. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *The European Respiratory Journal* 2009, 33: 118–126.
240. Hirayama S, Ishii G, Nagai K, et al. Prognostic impact of CD204-positive macrophages in lung squamous cell carcinoma: Possible contribution of Cd204-positive macrophages to the tumor-promoting microenvironment. *Journal of Thoracic Oncology* 2012, 7: 1790–1797.
241. Travis WD, Colby TV, Corrin B, et al. Histological Typing of Lung and Pleural Tumors. In Collaboration with L.H. Sobin and Pathologists from 14 Countries. World Health Organization. *International Histological Classification of Tumors*. Springer, Third Edition, 1999.
242. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind CH. *TNM classification of malignant tumours UICC 2009*; 7th edn. Wiley, Blackwell.
243. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, et al. Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 2004, 56: 244-253.
244. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012. *CA Cancer J Clin* 2012, 62: 10–29.
245. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K et al. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours. *J Thorac Oncol* 2007, 2: 706–771.
246. D'Angelo SP, Janjigian YY, Ahye N, et al. Distinct clinical course of EGFR-mutant resected lung cancers: results of testing of 1118 surgical specimens and effects of adjuvant gefitinib and erlotinib. *J Thorac Oncol* 2012, 7: 1815.
247. Takahashi T, Sonobe M, Kobayashi M, et al. Clinicopathologic features of non-small-cell lung cancer with EML4-ALK fusion gene. *Ann Surg Oncol* 2010, 17: 889.
248. Galon J, Angell HK, Bedognetti D et al. The continuum of cancer immunosurveillance: prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity* 2013, 39: 11–26.

249. Galon J, Mlecnik B, Bindea G et al. Towards the introduction of the ‘Immunoscore’ in the classification of malignant tumours. *J Pathol* 2014, 232: 199–209.
250. Donnem T, Kilvaer TK, Andersen S, et al. Strategies for clinical implementation of TNM-Immunoscore in resected nonsmall-cell lung cancer. *Ann Oncol* 2016, 27: 225-232.
251. Mlecnik B, Bindea G, Angell et al. Integrative Analyses of Colorectal Cancer Show Immunoscore Is a Stronger Predictor of Patient Survival Than Microsatellite Instability. *Immunity* 2016, 44: 698-711.
252. Garrido, F, Cabrera, T, Concha, A, et al. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 1993, 14: 491-419.
253. Redondo M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. Altered HLA class I expression in non-small cell lung cancer is independent of c-myc activation. *Cancer Res* 1991, 51: 2463-2468.
254. Redondo M, Concha A, Oldiviela R, et al. Expression of HLA class I and II antigens in bronchogenic carcinomas: its relationship to cellular DNA content and clinical-pathological parameters. *Cancer Res* 1991, 51: 4948-4954.
255. Seliger B, Stoehr R, Handke D, et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother* 2009, 59: 529–540.
256. Baba T, Shiota H, Kuroda K. Clinical significance of human leukocyte antigen loss and melanoma associated antigen 4 expression in smokers of non-small cell lung cancer patients. *Int J Clin Oncol* 2013, 18: 997–1004.
257. Hanagiri T, Shigematsu Y, Kuroda K, et al. Prognostic implications of human leukocyte antigen class I expression in patients who underwent surgical resection for non small-cell lung cancer. *Journal of Surgical Research* 2013, 181: e57-e63.
258. Kikuchi E, Yamazaki K, Torigoe T, et al. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. *Cancer Sci* 2007, 98: 1424–1430
259. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Aptsiauri N. Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma. *Cancer Immunol Immunother* 2016, DOI 10.1007/s00262-016-1947-x.
260. Garrido F, Cabrera T, Accolla RS, et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop study. In: Charron D, ed. Genetic diversity of HLA. Functional and medical implication. Proc. Twelfth International Histocompatibility Workshop and Conference, Vol. II. France: EDK, Sevres; 1997, 445–452.
261. del Campo AB, Kyte JA, Carretero J, et al. Immune escape of cancer cells with beta2-microglobulin loss over the course of metastatic melanoma. *Int J Cancer* 2014, 134: 102–113.
262. Carretero R, Cabrera T, Gil H, et al. Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer* 2011, 129: 839.

263. Carretero R, Wang E, Rodriguez, AI, et al. Regression of melanoma metastases after immunotherapy is associated with activation of antigen presentation and interferon-mediated rejection genes. *Int. J. Cancer* 2012, 131: 387–395.
264. Perea F, Bernal M, Sánchez-Palencia A, et al. The absence of HLA class I expression in non-small cell lung cancer correlates with the tumor tissue structure and the pattern of T cell infiltration. *Int J Cancer* 2017, 140: 888-899.
265. Carretero FJ, Del Campo AB, Flores-Martín JF, et al. Frequent HLA class I alterations in human prostate cancer: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Immunol Immunother* 2016, 65: 47-59.
266. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest* 2012, 122: 899–910.
267. Garrido F, Cabrera T, Lopez-Nevot MA, et al. HLA class I antigens in human tumors. *Adv Cancer Res* 1995, 67: 155–195.
268. Mukhopadhyay S, Farver CF, Vaszar LT, et al. Causes of pulmonary granulomas: a retrospective study of 500 cases from seven countries. *J Clin Pathol* 2012, 65: 51–57.
269. Verdegaal EM, Hoogstraten C, Sandel MH, et al. Functional CD8+ T cells infiltrate into nonsmall lung carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007, 56: 587-600.
270. So T, Takenoyama M, Mizukami M, et al. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res* 2005, 65: 5945–5952.
271. Koopman LA, Corver WE, Van Der Slik AR, et al. Multiple genetic alterations at chromosome 6p cause frequent and heterogeneous HLA class I antigen loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000, 191: 961–976.
272. McGranahan N, Rosenthal R, Hiley CT, et al. Allele-Specific HLA Loss and Immune Escape in Lung Cancer Evolution. *Cell* 2017, 17: 31185-31186.
273. Maleno I, Romero JM, Cabrera T, et al. LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics* 2006, 58: 503-510.
274. Spranger S, Koblisch HK, Horton B, et al. Mechanism of tumor rejection with doublets of CTLA-4, PD-1/PD-L1, or IDO blockade involves restored IL-2 production and proliferation of CD8(+) T cells directly within the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2014, 2: 3.
275. Herbst RS, Baas P, Kim DW, et al. Pembrolizumab versus docetaxel for previously treated, PD-L1-positive, advanced non-small-cell lung cancer (KEYNOTE-010): a randomised controlled trial. *Lancet* 2015; pii: S0140-6736(15)01281-7.
276. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2015, 372: 2018–2028.

277. Baba T, Hanagiri T, Ichiki Y, et al. Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci* 2007, 98: 1795–1802.
278. Aptsiauri N, Carretero R, Garcia-Lora A, et al. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother* 2008, 57: 1727–1733.
279. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* 2008, 101: 249–276.
280. Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* 2016, 375: 819.
281. Garrido F, Aptsiauri N, Doorduijn EM, et al. The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2016, 39: 44-51.
282. Birnbaum DJ, Finetti P, Lopresti A, et al. Prognostic value of PDL1 expression in pancreatic cancer. *Oncotarget* 2016, 7: 71198-71210.
283. Takada K, Okamoto T, Shoji F, et al. Clinical Significance of PD-L1 Protein Expression in Surgically Resected Primary Lung Adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 2016, 11: 1879-1890.
284. Lafuente-Sanchis A, Zúñiga A, Estors M, et al. Association of PD-1, PD-L1, and CTLA-4 Gene Expression and Clinicopathologic Characteristics in Patients With Non-small-Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2017, 18, e119-e116 doi: 10.1016/j.clcc.2016.09.010.
285. Ohgashi Y, Sho M, Yamada Y, et al. Clinical Significance of Programmed Death-1 Ligand-1 and Programmed Death-1 Ligand-2 Expression in Human Esophageal Cancer. *Clin Cancer Res* 2005, 11: 2947-2953.
286. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2014, 146: 15–24.
287. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *PNAS* 2007, 104: 3360-3365.
288. Sabbatino F, Villani V, Yearley JH, et al. PD-L1 and HLA class I antigen expression and clinical course of disease in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Clin Cancer Res* 2016, 22: 470-478.
289. Teng MW, Ngiow SF, Ribas A, et al. Classifying cancers based on T-cell infiltration and PD-L1. *Cancer Res*, 2015, 75: 2139–2145.
290. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined nivolumab and ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma. *N Engl J Med* 2015, 373: 23-34.

291. Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014, 515: 568-571.
292. Valenzuela-Membrives M, Perea-García F, Sanchez- Palencia A, et al. Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2016, 7: 71608-71619.
293. Pircher A, Gernerth G, Amann A, et al. Neoadjuvant chemo-immunotherapy modifies CD4+CD25+regulatoryT cells (Treg) in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. *Lung Cancer* 2014, 85: 81–87.
294. Zito Marino F, Ascierto PA, Rossi G, et al. Are tumor-infiltrating lymphocytes protagonists or background actors in patient selection for cancer immunotherapy? *Expert Opin Biol Ther* 2017, 17: 735-746.
295. Garrido F, Perea F, Bernal M, et al. The Escape of Cancer from T Cell-Mediated Immune Surveillance: HLA Class I Loss and Tumor Tissue Architecture. *Vaccines* 2017, 5(1).
296. Mills CD, Lenz LL, Harris RA. A breakthrough: macrophage-directed cancer immunotherapy. *Cancer Res* 2016, 76: 513–516.
297. Chen XH, Liu ZC, Zhang G, et al. TGF- β and EGF induced HLA-I downregulation is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) through upregulation of snail in prostate cancer cells. *Mol Immunol* 2015, 65: 34–42.
298. Loeffler M, Kruger JA, Niethammer AG, et al. Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake. *J. Clin. Invest.* 2006, 116: 1955–1962.
299. Liao D, Luo Y, Markowitz D, et al. Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model. *Plos One* 2009, 4, e7965.

X. ANEXOS

X. ANEXOS

Otras publicaciones

www.impactjournals.com/oncotarget/

Oncotarget, Vol. 7, No. 44

Research Paper

Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer**María del Mar Valenzuela-Membrives¹, Francisco Perea-García³, Abel Sanchez-Palencia², Francisco Ruiz-Cabello³, Mercedes Gómez-Morales⁴, María Teresa Miranda-León⁵, Inmaculada Galindo-Angel⁴, María Esther Fárez-Vidal⁶**¹Department of Pneumology, San Cecilio University Hospital, Granada, Spain²Department of Thoracic Surgery, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain³Institute for Biomedical Research, Virgen de las Nieves University Hospital, Granada, Spain⁴Department of Pathology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain⁵Department of Statistics and Operative Research, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain⁶Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Granada, Granada, Spain

Correspondence to: María Esther Fárez-Vidal, email: efarez@ugr.es

Keywords: immunological response, lung cancer, immunohistochemistry, flow cytometry, lymphocyte subsets

Received: May 18, 2016

Accepted: September 19, 2016

Published: September 26, 2016

ABSTRACT

Immune cell infiltration is a common feature of many human solid tumors. Innate and adaptative immune systems contribute to tumor immunosurveillance. We investigated whether tumors evade immune surveillance by inducing states of tolerance and/or through the inability of some immune subpopulations to effectively penetrate tumor nests. Immunohistochemistry and flow cytometry analysis were used to study the composition and distribution of immune subpopulations in samples of peripheral blood, tumor tissue (TT), adjacent tumor tissue (ATT), distant non-tumor tissue (DNNT), cancer nests, cancer stroma, and invasive margin in 61 non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. A significantly higher percentage of T and B cells and significantly lower percentage of NK cells were detected in TT than in DNNT. Memory T cells (CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺) and activated T cells (CD8⁺DR⁺) were more prevalent in TT. Alongside this immune activation, the percentage of T cells with immunosuppressive activity was higher in TT than in DNNT. B- cells were practically non-existent in tumor nests and were preferentially located in the invasive margin. The dominant NK cell phenotype in peripheral blood and DNNT was the cytotoxic phenotype (CD56⁺ CD16⁺), while the presence of these cells was significantly decreased in ATT and further decreased in TT. Finally, the immunologic response differed between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma and according to the tumor differentiation grade. These findings on the infiltration of innate and adaptative immune cells into tumors contribute to a more complete picture of the immune reaction in NSCLC.

INTRODUCTION

Lung cancer accounts for the largest number of cancer-related deaths worldwide, and more than 85% of cases are non-small-cell lung cancer (NSCLC). There have been limited improvements in NSCLC therapy over the past few decades, and a five-year survival rate of only 16% has been estimated for NSCLC patients [1].

Immune cell infiltration is a common feature of many human solid tumors. Any type of infiltrating immune cell may be found in different tumors and in distinct localizations within tumors, i.e., in their core (center), invasive margin, or surrounds or in adjacent tertiary lymphoid structures [2]. The localization, density, and/or functional orientation of different immune cell populations can be beneficial or deleterious for patients. T lymphocytes

play a vital role in the immune response against tumor development, and clinical and histopathological studies [3, 4] have described T-cell immune infiltrate as the most important predictor of patient survival [5–9]. However, cells infiltrating tumors are highly heterogeneous, and most components of myeloid and lymphoid compartments are represented. Furthermore, infiltrating immune cells can become activated through a perturbed phenotype and/or a functional profile that creates an environment conducive to T-cell suppression [10]. Immunosuppression leads to Th1/Th2 imbalance and Th2 drift, affecting anti-tumor immunity. Regulatory T cells (Tregs) are a population of T cells that suppress the activation of the immune system and maintain immune tolerance to self-antigens. Tregs can contribute to immunosuppressive or antitumor activity, allowing tumors to evade the immune barrier in epithelial malignancies [11]. Tregs are upregulated or activated in the tumor microenvironment, and a higher number of Tregs has been correlated with a worse prognosis in epithelial cancers, including lung cancer [12, 13]. Potential mechanisms underlying the immunosuppressive effects of Tregs may include the production of inhibitory cytokines, such as TGF- β and IL-10, and the suppression of T cell function by competitive binding of interleukin-2 (IL-2) via cell surface receptor CD25 (IL-2 receptor). In addition, several co-inhibitory molecules, such as cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor (GITR), bind to ligands on effector T cells and directly contribute to the inhibitory function of Tregs [14].

There is a need for a more complete understanding of anti-tumor immune responses and of the role of NK cells in this process [15–17]. NK cells are innate lymphocytes with a natural ability to recognize and kill aberrant cells, including cancer cells [18–20]. There is increasing evidence that tumor-infiltrating NK cells have severe defects in their cell receptor repertoire, suggesting a local tumor-induced impairment of NK-cell function. Hence, the quality rather than quantity of intratumoral NK cells may account for their dysfunction. Intratumoral NK cells were found to express markedly lower levels of killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) in comparison to peripheral blood NK cells from the same patients [21, 22]. Tumor-infiltrating NK cells without KIR expression, as non-educated cells, have no cytotoxic capacity [23, 24]. Recent studies also indicated that the phenotype of tumor-infiltrating NK cells without KIR expression was characteristic of immature and nonfunctional NK cells [25]. In support of this hypothesis, several studies showed that the NK-cell developmental program is not entirely fixed and that mature NK cells can be re-educated by their environment [26–28]. Hence, the tumor microenvironment may have a negative impact on NK-cell maturation.

Despite the importance of T cells and NK cells in tumors and tumor microenvironments, a comprehensive analysis of these lymphocytic cell populations has not

been reported in NSCLC patients. All subsets of T cells and NK cells are present at the core and invasive margin of NSCLC tumors. Distinct functional populations of immune cells are found at different tumor localizations and their distribution pattern varies among cancer types, suggesting that different immune cell populations may have distinct roles in tumor control.

The objective of the present study was to analyze the composition and distribution of immune subpopulations in samples of peripheral blood, tumor tissue (TT), adjacent tumor tissue (ATT), distant non-tumor tissue (DNTT), cancer nests, cancer stroma, and invasive margin in NSCLC patients. The aim was to provide new insights into the distribution and phenotypic characteristics of different immune lymphocyte subpopulations in this disease.

RESULTS

Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood samples

Significant differences in NK cell, B cell, and T cell subsets were found between peripheral blood samples from NSCLC patients and healthy controls. In comparison to the controls, the patient peripheral blood samples had a significantly higher percentage (30.9 vs. 18.2 respectively; $p < 0.001$) and absolute number (887.2 vs. 465.7 cells/ μ l; $p < 0.009$) of NK cells and a significantly lower percentage (4.2 and 8.3, respectively; $p < 0.001$) and absolute number (128.3 vs. 196.8; $p < 0.02$) of CD20⁺ B cells. Significant differences between patients and controls were observed in the percentage and absolute number of CD4⁺ T cells but not in the absolute number of CD8⁺ T cells ($p=0.634$). Peripheral blood samples from patients showed a higher percentage of the following lymphocyte subsets in comparison to controls: CD4⁺ CD45RO⁺ 72.7 vs. 63.1 ($p < 0.006$), CD8⁺ CD45RO⁺ 41.64 vs. 33.90 ($p < 0.02$), CD4⁺ DR⁺ 7.7 vs. 3.9 ($p < 0.001$), CD8⁺ DR⁺ 9.9 vs. 6.3 ($p < 0.001$) and CD4⁺ T regulatory (Treg) cells (CD127⁺ CD25⁺) 6.9 vs. 5.9 ($p < 0.02$). Interestingly, a positive correlation was observed between the percentages of CD4⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺, CD8⁺ CD45RO⁺, CD4⁺ CD39⁺, CD8⁺ CD39⁺ and CD4⁺Treg subsets in the tumor sample and the percentages observed in peripheral blood. Thus, an increase in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells in TT was accompanied by an increase in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells in peripheral blood (see below).

Analysis of lymphocyte subsets in NSCLC patients

Among this series of 61 patients operated for NSCLC, statistically significant differences in immune cell density were found among the distinct regions sampled in each patient (TT, ATT, and DNTT). Figure 1 summarizes the results for each subpopulation analyzed.

Percentages of CD3⁺ T cells and CD20⁺ B cells were higher in TT (79.7 and 10.7, respectively) than in ATT (77.4 and 5.22) and DNTT (74.27 and 2.82). The difference between TT and DNTT was significant for both subsets ($p < 0.001$).

Most of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells had a memory-effector phenotype. However significant differences were observed in the percentage of these cells among the different regions. Memory T cells (CD4⁺ 45RO⁺ CD8⁺ CD45RO⁺) and Tregs cells (CD4⁺ CD25^{high} CD127^{low}) were more abundant in TT than in ATT or DNTT. CD4⁺ CD45RO⁺ count in TT (94.05) significantly differed ($p < 0.008$) from that in ATT (89.4) and DNTT (89.1). CD8⁺ CD45RO⁺ count in TT (73.5) significantly differed ($p < 0.002$) from that in ATT (64.9) and DNTT (61.8) samples. From a functional

viewpoint, T- cells predominantly expressed Th1 and Th17 markers in TT. Percentages of granulocytes and Th17 cells were positively correlated in TT ($p < 0.05$).

The percentage of CD4⁺DR⁺ cells was elevated in TT but did not significantly differ from that observed in DNTT. The percentage of CD8⁺DR⁺ cells was significantly ($p < 0.001$) higher in TT (30.9) than in ATT (22.10) or DNTT (18.58). In TT, the percentages of CD4⁺DR⁺ cells and CD8⁺DR⁺ cells were inversely correlated with the percentage of CD20⁺ B cells ($p < 0.01$).

The percentage of Tregs cells was significantly higher ($p < 0.001$) in TT (17.5) than in ATT (12.5 or DNTT (7.1). The percentage of CD4⁺CD39⁺ was significantly ($p < 0.001$) higher in TT (25.4) than in ATT or DNTT, and the percentage of CD8⁺CD39⁺ cells was

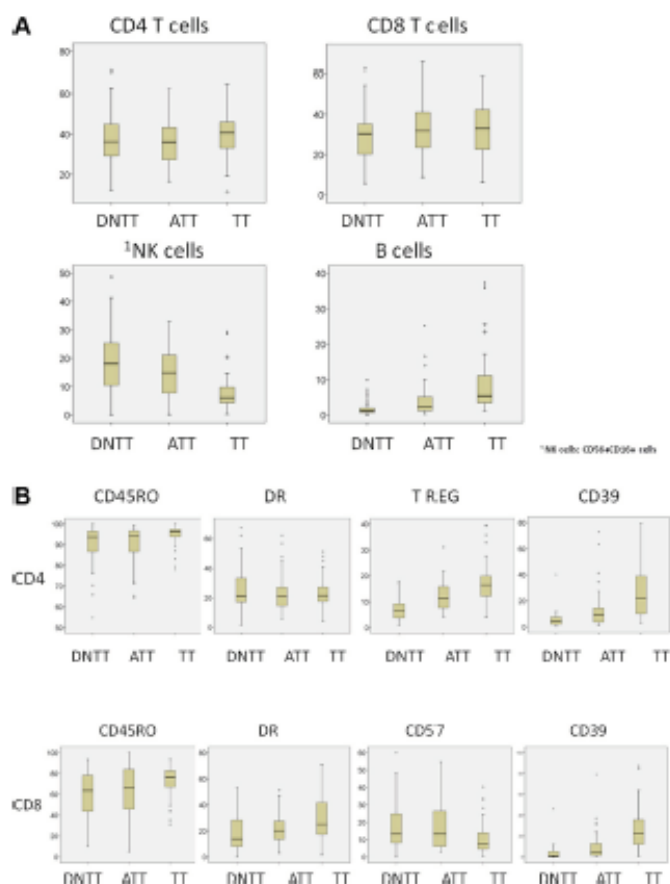


Figure 1: Analysis of immune cell density in tumor (TT), adjacent tumor (ATT), and distant non-tumor tissue (DNTT) samples from each patient. Upper horizontal line of box plot, 75th percentile; lower horizontal line of box, 25th percentile; horizontal bar within box, median value (in %) of each subpopulation analyzed; upper horizontal bar outside box, 90th percentile; lower horizontal bar outside box, 10th percentile. Circles represent outliers.

also significantly ($p < 0.02$) higher in TT (25.7) than in ATT or DNTT. Finally, an elevated percentage of fully-differentiated CD8⁺CD57⁺ cells was observed in the CD8⁺ T compartment (CD57 is a marker of T-cell exhaustion). In contrast to the above finding for CD39⁺, the percentage of CD8⁺ CD57⁺ T cells was significantly ($p < 0.01$) higher in DNTT (17.24) than in TT (11.2).

The balance between CD8/Tregs and Th1/Tregs has been shown to be important in tumor progression and prognosis in some studies of human cancer. The CD8/Tregs cell ratio was significantly ($p < 0.001$) higher in DNTT (17.8) than in TT (7.9), probably due to differences in T-regs and memory T- cells between the tissues. The Th1/T reg cell ratio was higher in DNTT (8.12) than in ATT (4.74) or TT (3.36), and the difference between TT and DNTT was significant ($p < 0.006$).

NK cells are characterized by the expression of CD56⁺ CD16⁺ and the absence of CD3. NK cells were increased in the peripheral blood and lung tissues of patients, with the highest percentage being observed in DNTT. The percentage was significantly ($p < 0.001$) lower in TT (7.39) than in ATT (14.48) or DNTT (19.74).

Various NK phenotypes were identified in the analyzed tissues depending on the CD56 and CD16 expression. The percentage of cytotoxic NK cells (CD56⁺ CD16⁺) was significantly ($p < 0.001$) lower in TT (22.8) than in ATT (40.29) or DNTT (44.45). In contrast, the percentage of CD56^{dim} CD16⁺ NK cells, (non-cytotoxic producing cytokines phenotype), was significantly higher TT (9.3) than in ATT (4.95; $p < 0.03$) or DNTT (2.00; $p < 0.001$). Finally, the percentage of double-negative CD56⁻ CD16⁻ or single-positive CD56⁺ CD16⁻ immature NK phenotypes was also higher in TT but statistical significance was not reached, likely attributable to the low number of samples.

Analysis of TILs in relation to clinical-pathological features

Significantly higher percentages of CD4⁺CD39⁺ ($p < 0.03$) and CD8⁺CD39⁺ ($p < 0.02$) cells were found in samples from tumors with positron emission tomography (PET) standardized uptake value (SUV) ≤ 4.5 than in those from tumors with PET SUV > 4.5 .

The percentage of CD4⁺CD39⁺ cells was significantly higher ($p < 0.01$) in samples from tumors less than two centimeters in size than in those from larger tumors.

The most common histological tumor type was squamous cell carcinoma (31 cases), followed by adenocarcinoma (23 cases). A significantly higher percentage of CD3⁺ T ($p < 0.04$), CD8⁺ ($p < 0.03$), CD8⁺ CD45RO⁺ ($p < 0.01$), CD4⁺DR⁺ ($p < 0.02$), CD8⁺DR⁺ ($p < 0.05$), and CD8⁺ CD39⁺ ($p < 0.02$) cells were found in TT from an adenocarcinoma than in TT from a squamous cell carcinoma.

Immunohistochemical location and prognostic value of lymphocytic cell subpopulations

Location of lymphocytes and macrophages were studied in the invasive margin, stromal and within cancer nests in 42 patients (Figure 2A). The infiltration intensity of lymphocytes and macrophages was more evident in the invasive margin and in stroma surrounding tumor nests. Figure 3 provides an illustration of the immunohistochemistry results for the staining in stroma and invasive margins. In figure 3A depicts an example of hematoxylin-eosin staining. Mildly intensive infiltration of cancer nests (score of 2) was observed in 15 of the 42 cases. CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes were preferentially located in stroma and invasive margin (similar percentages of each), showing mild-moderate infiltration intensity. Figures 3C and 3D illustrate immunohistochemistry results for CD8 and CD45 staining, respectively.

There was a significantly higher frequency of CD8⁺ T- lymphocytes (15 cases) than of CD4⁺ T- lymphocytes (5 cases) in cancer nests.

The presence of Tregs in tissues was evaluated by analyzing the distribution and the absolute number of FoxP3⁺ Tregs. A higher number of Tregs were detected in stroma and tumor nest than in the corresponding invasive margin. There was a higher FoxP3⁺ cell count in stroma than in the other compartments. In 50% of studied cases, these cells were also observed within tumor nests, but with a mild infiltration intensity (score of 2). B cells were practically non-existent in tumor nests and were largely detected in the invasive margin and, to a lesser extent in the stroma. Figure 3B depicts an example of stromal staining for these cells. Finally, only a small number of cases showed the presence of macrophages (CD68) within cancer nests, with a score of 2; they were more prevalent in the stroma and even more so in the invasive margin in comparison to the other localizations.

Examination of the association of infiltration intensity and pattern with clinicopathological variables only revealed significant differences as a function of histological type and degree of differentiation. There was a higher T lymphocyte count in the stroma in adenocarcinomas than in squamous cell carcinomas ($p < 0.03$), attributable to differences in the CD4⁺ T subset ($p < 0.02$).

Significant differences as a function of the differentiation degree were only detected in T lymphocytes at the invasive margin, where CD4⁺ T cell infiltration was higher in well-moderately (69%) versus poorly (12.5%) differentiated tumors ($p < 0.05$), and CD8⁺ T cell infiltration was higher in well-moderately (64.3%) versus poorly (21.4%) differentiated tumors ($p < 0.04$). A higher percentage of CD8⁺ T cells was also found in well-moderately differentiated groups ($p < 0.024$) in tumor nests. A greater infiltration of FoxP3⁺ cells was observed

in the invasive margin in poorly *versus* well-moderately differentiated tumors ($p < 0.01$). However, the percentages of these subsets in the cancer nests were higher in well-moderately *versus* poorly differentiated groups ($p < 0.05$). Finally, the percentage of CD68⁺ macrophages in the invasive margin was higher in well-differentiated tumor *versus* poorly differentiated tumors (70% vs. 23.5%, respectively).

DISCUSSION

It is important to decipher the complex interactions of tumors with their microenvironments in order to understand anti-cancer defense systems [29]. The immune signature in NSCLC tumors was investigated in the present study, using a combination of immunohistochemistry and flow cytometry analysis. Comprehensive analysis of the majority of immune subsets that infiltrate NSCLC tumors demonstrated a wide host defense array and revealed the relevant role of different lymphocyte subsets in these patients. We analyzed the composition and distribution of immune subpopulations in peripheral blood, TT, ATT, DNNT, cancer nests, cancer stroma, and invasive margin, investigating the functional state of lymphocytes and the association of immune subsets with prognostic clinicopathological variables in NSCLC patients.

Our results showed a higher percentage of NK cells, memory T cells (CD4⁺CD45RO⁺, CD8⁺CD45RO⁺), activated T cells (CD4⁺DR⁺, CD8⁺DR⁺) and Tregs (CD4⁺CD25^{high}CD127^{low}) cells in the peripheral blood of NSCLC patients in comparison to the healthy controls, indicating a certain level of immune response in the patients. We cannot rule out the possibility that these differences were due to the presence of chronic obstructive

pulmonary disease, the most frequent comorbidity among the patients. However, the changes in cell subsets observed may also be induced directly, at least to some extent, by the tumor cells and/or tumor microenvironment, as indicated by our analysis of the lymphocyte subsets in these patients. Thus, the percentages of activated T cells and CD4-Tregs in peripheral blood samples were positively correlated with those in tumor samples from these NSCLC patients. The subpopulation of CD4⁺Tregs cells was also more abundant in patients than in controls, consistent with the immunosuppressive status of the patients, which was confirmed in the analyses of lung tissues. These data show that study of the proportion of T cell subsets in peripheral blood can provide valuable information. These observations confirm those of other researchers in lung cancer [30–33] although previous reports indicated that alterations in immunoregulatory T cells in lung cancer are more pronounced in bronchoalveolar lavage fluid obtained from both lungs than in peripheral blood [34].

Infiltration of the tumor by cytotoxic CD8⁺T-cells and memory CD4⁺ CD45RO⁺ cells proved to have prognostic discriminatory power, leading to a novel scoring system strongly correlated with the clinical outcome [29]. Tumor-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes play important roles in anti-tumor immune responses and have prognostic value in various cancer types. Thus, immune infiltration in both the center and invasive margin of human colorectal tumors was associated with a favorable clinical outcome, while a low density of T cells was associated with a poor prognosis [7, 10, 28 29]. In most studies, immunoscores were based on immunohistochemistry techniques, which do not permit an in-depth characterization of the functional phenotype of T cells (activated or not, in an

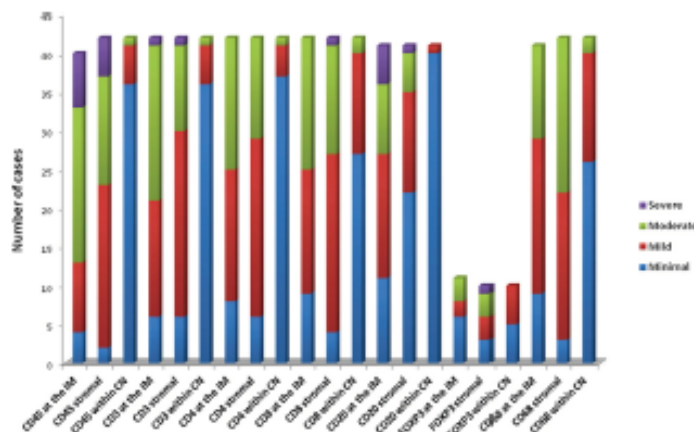


Figure 2: Immunohistochemistry results. (A) Intensity of the immunohistochemical staining of T lymphocytes (including memory T cells), B-lymphocytes and CD 68 (macrophages) in the invasive margin (IM), stromal and within cancer nests (CN) for samples analyzed. Severe (score of 4), Moderate (score of 3), Mild (score of 2), Minimal (score of 1).

energy state or not, or with maturation deficiencies or not). In the present study, an exhaustive and comprehensive analysis was carried using a combination of flow cytometry and immunohistochemistry, providing an in-depth characterization of the cellular components of a tumor biopsy specimen in comparison to DNNT and ATT samples from same patient. The results showed that T and NK cells are both highly heterogeneous in lung cancer and that some subpopulations may suppress the function of other immune cells, allowing the cancer cell to evade activation of immune system. The tumor samples showed a higher prevalence of cells with memory phenotype $CD4^+CD45RO^+$, a higher prevalence of $CD4^+$ *versus* $CD8^+$ T cells ($CD4 > CD8$), and a higher prevalence of Th1 *versus* Th17 phenotype, with a reduced presence of NK cells in TT. No significant differences in localization were found between $CD4^+$ T cells and $CD8^+$ T cells; however, $CD8^+$ T and especially $CD4^+$ T cells were excluded from direct contact with tumor and were trapped in the stroma or invasive margin (Figure 2). $CD8^+$ T cells were observed in tumor nests in a few cases, but always at a low density (Figure 3). Stromal cells in the tumor microenvironment (macrophages and cancer-associated fibroblasts) prevent the access of lymphocytes to tumor nests, leading to their accumulation in the vicinity of tumors [35].

Nevertheless, our data suggest the presence of some immunosuppressive factors that act from the center of tumor towards the outside and may affect and significantly disrupt the function of some immune subsets. Percentages of T and B cells were higher in TT than in

DNNT, at the expense of significant reduction in NK cells, and there was a higher percentage of memory T cells ($CD4^+CD45RO^+$, $CD8^+CD45RO^+$) and activated T cells ($CD8^+DR^+$) in TT. Parallel with this immune activation, TT showed: i) a higher percentage of Treg cells ($CD4^+CD25^{hi}CD127^{lo}$); ii) a lower CD8/Treg ratio, and iii) a lower Th1/Treg ratio and iv) higher percentage of T cells with immunosuppressive activity ($CD4^+CD39^+$ and $CD8^+CD39^+$) in comparison to DNNT ($p < 0.001$ and 0.02 , respectively).

Tregs may suppress the function of immune cells and allow lung cancer cells to evade escape, likely *via* cell interaction-dependent or cytokine-mediated suppression. However, the balance between T-effector and T-regs in tumors is known to determine the functional outcome of immune responses [36], and both Th1/Treg and CD8/Treg ratios were lower in TT than in DNNT. Although the precise mechanism of Tregs-mediated suppression has yet to be fully elucidated [37–39], at least part of the immunosuppressive effect may be exerted by CD39. This ectoenzyme serves as an integral component of the suppressive machinery of Tregs, inactivating and converting extracellular ATP into adenosine and allowing the immune escape of tumors [40–42]. CD39, which mediates immunosuppressive functions, is also present on different immune cell subsets. In non-Tregs cells, the expression of CD39 on CD4 and CD8 cells has been associated with anergized [43] or exhausted T cells [44]. Furthermore, $CD8^+CD39^+$ T cells substantially inhibit IFN γ production by effector $CD8^+$ T cells *via* the paracrine

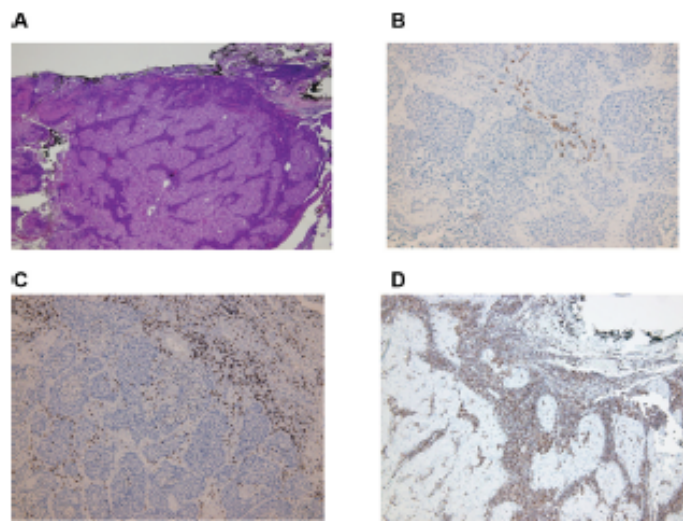


Figure 3: Immunohistochemistry results. The infiltration of lymphocytes was more intense in invasive margin and stroma surrounding tumor nests. (A) Hematoxylin-eosin staining of tissue; magnification X4 followed by computer magnification. (B) B lymphocyte (CD20) staining in stroma; magnification X20 followed by computer magnification. (C) $CD8^+$ staining in stroma and invasive margins; magnification X10 followed by computer magnification. (D) $CD45^+$ staining in stroma and invasive margins; magnification X10 followed by computer magnification.

generation of adenosine [45]. A marked accumulation of CD39⁺ T cells (both CD4 and CD8) in the lung tumor tissue was observed in the present study.

The accumulation of CD8⁺CD39⁺ in TT may be the result of chronic and persistent stimulation and could therefore be generated within the tumor. Indeed, CD39 was found to be a specific pathological marker of exhausted CD8⁺ T cells in chronic viral infection in humans and mouse models [45, 46]. CD57 is also a marker for exhausted senescent-T cells [47], but the presence of CD39⁺ exhausted CD8⁺ T cells in TT contrasts with the absence of CD8⁺CD57⁺ cells in TT.

Previous studies found that an increase in CD8⁺CD57⁺ (senescent) cells is associated with malignancy. Fully-differentiated CD8⁺CD57⁺ cells were abundant in peripheral blood of both patients and controls who showed similar values, attributable to the age-matching of the groups, but no CD8⁺CD57⁺ cells were observed in TT. Investigation of the role of these cells in cancer pathology has revealed their heterogeneity. Meloni et al found a significant level of FOXP3 expression in CD8⁺CD57⁺ cells from lung cancer patients, which they attributed to the immunosuppressive component of the antitumor immune response [41, 47]. Although the increase in this lymphocyte subset in peripheral blood may contribute to impairments in cellular activation and may play a role in the decreased immunologic responsiveness observed in NSCLC patients, these cells are not able to penetrate the tumor. Our results suggest that CD8⁺CD57⁺ senescent cells are generated outside the tumor but do not enter it. However, the accumulation of CD8⁺CD39⁺ T cells in TT indicates a subpopulation of dysfunctional, exhausted CD8⁺ T cells, probably as a result of chronic stimulation.

The true role of CD20⁺ B cells in anticancer immunity remains controversial. There is considerable evidence of a tumor-protective function for B cells by the production of antitumor antibodies and the induction of cytotoxic immune responses, but other studies have suggested that B cells may also exert tumor-promoting functions [48]. It has recently been observed that B cells are paracrine mediators of solid tumor development cytokines such as interleukin IL-4, IL-10, and transforming growth factor β (TGF β), which are among the most prominent immunosuppressive factors secreted by B cells in this setting [49–51]. In the present study, B-cells were practically non-existent in tumor nests and were preferentially located in the invasive margin when TT was analyzed by immunohistochemistry, while an inverse correlation between CD20⁺ B cells (high level in TT) and CD4⁺DR⁺ (activated T lymphocytes) was found in TT when analyzed by flow cytometry. In other words, an increase in B cells in TT was accompanied by a decrease in the percentage of CD4⁺DR⁺ cells and *vice-versa*. Furthermore, B cells in lung tumors can promote the suppression of CD8⁺ T-cell cytotoxicity and convert/recruit

CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ Tregs cells. In summary, our data suggest that the presence of B cell activities can also shift the balance of tumor specific immune response towards immunosuppression [48].

In the same way as effector T cells, NK cells are also involved in antitumor immunity. They comprise a heterogeneous functional population that can be divided into different subsets according to their surface expression [52, 53]. In the present NSCLC patients, a high percentage of NK cells with cytotoxic-phenotype (CD56⁺CD16⁺) were observed in peripheral blood, and these cells were also frequently located in DNTT. Around half of the tumor samples lacked HLA class I antigen expression (data not shown), and these two features make the cancer cells susceptible to NK cell attack. However, the most important study finding was the presence of two immune escape mechanisms: i) the exclusion of NK cells by cancer cells, given the very low percentage in ATT and the even lower percentage in TT; and ii) a progressive alteration in the phenotype of NK cells from HT to TT, leading to a non-cytotoxic phenotype or maturation alterations. Thus, whereas the dominant NK cell phenotype in the peripheral blood and DNTT was cytotoxic (CD56⁺ CD16⁺), the presence of cells with this phenotype was significantly decreased in ATT and even more so in TT. A low number of NK cells (CD56⁺ CD16⁺) in TT was previously attributed to their inefficient homing into malignant tissues [54, 55]. We also found a prevalence in TT of NK CD56^{int/hi} CD16⁻ (non-cytotoxic producing cytokines) and immature CD56⁺CD16⁻ (non-cytotoxic immature phenotype) subpopulations. These findings may have two hypothetical explanations: i) these NK phenotype changes may be induced directly at the tumor site, or there may be a preferential colonization of the tumor by NK cells at an early differentiation stage, following a specific chemokine-mediated migration pattern.

In summary, this study offers novel insights into the distribution and the phenotypic characteristics of different immune lymphocyte subpopulations. It provides the first comprehensive analysis of the immune infiltrate that shows quantitative and qualitative differences in subsets of immune infiltrate subpopulations among TT, ATT, and DNTT samples from the same patient. Our data showed how effector cells are mostly excluded from direct contact with cancer cells and are preferentially located in the stromal region, where an immunoprivileged space is generated, with a lack of cytotoxic response from T and NK cells, which may allow immune evasion in NSCLC patients and thereby contribute to cancer progression.

The immunologic response differed between adenocarcinomas and squamous cell carcinomas, with higher percentage of T lymphocytes detected by flow cytometry and immunohistochemistry in TT samples of the former, mainly located in the stroma. Immunohistochemistry studies showed that well-moderately differentiated tumors had a higher percentage

of tumor infiltrating lymphocytes, mainly in invasive margins and tumor nests, and a higher percentage of macrophages in invasive margins. These findings may indicate an improved immunological response in well-moderately differentiated tumors, consistent with their better prognosis in comparison to poorly-differentiated tumors, which had a higher percentage of FoxP3⁺ T reg cells, indicating an immunosuppressive state.

These data suggest that the evasion of immune surveillance by tumors is favored by the lack of penetration of tumor nests by certain immune subpopulations. This is in line with previous findings and may reflect the difficulty that immune cells attracted to the tumor site have in overcoming physical and endothelial barriers and penetrating tumor nests.

The present data on most of the innate and adaptive immune cells infiltrating tumors provide a more complete picture of the immune reaction in NSCLC, further revealing the complex interactions of tumors with their microenvironment.

MATERIALS AND METHODS

Patients and Samples

The study included samples from 61 NSCLC patients under treatment at Virgen de las Nieves University Hospital (Granada, Spain). All surgical samples were obtained for therapeutic and diagnostic purposes. Demographic, clinical, and histological characteristics of the patients are exhibited in Table 1. Samples were obtained from 32 sex-matched healthy blood donors aged between 50 and 80 years (controls).

All blood samples were drawn after overnight fasting. Plasma samples obtained by centrifugation of part of each sample were stored at -20°C until use. The remaining blood samples were directly labeled with antibodies for flow cytometry (FCM).

Tumor samples were taken from primary malignant lung tumors of non-treated patients by excision of a fragment of tumor mass ≥ 100 mg during the initial surgery for the disease. After lung resection, half of the piece was immediately immersed in PBS solution and immediately analyzed by flow cytometry. The other half was fixed in buffered formalin and embedded in paraffin, and 3–4 micrometer sections were cut for conventional hematoxylin-eosin staining to evaluate tumor contents. All tumor samples had their paired adjacent tissue and distant non-tumor tissue samples. Only those with $\geq 50\%$ tumor cells were selected ($\approx 70\%$ of samples had $>70\%$ tumor cells). Because preneoplastic molecular changes may take place in adjacent non-tumor tissue, distant non-tumor tissue samples (mass ≥ 500 mg) were taken from clinically tumor-free quadrants in the resected specimen as far as possible from the tumor. Adjacent tumor samples were taken from neighboring adjacent lung tissue with no

macroscopic tumoral appearance located at approximately one centimeter from the periphery of the tumor. Distant non-tumor and adjacent tumor tissue samples underwent meticulous histological analysis to guarantee the complete absence of epithelial tumor cells.

Before the study, all medical records and tumor sections were reviewed by an oncologist and a surgical pathologist. Informed consent was obtained from all patients and healthy controls for participation in the study, which complied with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 1983, and was approved by the human research ethics committee of our institution.

Stages were determined after pathologic evaluation of resected specimens according to the 7th Edition of TNM in Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer Staging Committee in 2009 [56].

Flow cytometry analysis

Flow cytometry analyses were carried out in TT, ATT, and DNTT samples, which were washed twice with PBS and resuspended in 0.5 mL of PBS for FCM analysis. GentleMACS™ Tubes (Miltenyi Biotec, Germany) were used for the dissociation and homogenization of samples. Each sample was processed twice, filtered, washed, and resuspended in 100 microliter of PBS; 20 microliter of sample tissue was added to labeled tubes containing specific antibodies for different lymphocytic populations and was incubated for 20 minutes at room temperature before addition of 1 ml red blood cell lysis buffer (BD Pharmalyse). Supplementary File 1 reports details of the flow cytometry analysis and the specific monoclonal antibodies used to identify the different lymphocytic populations.

Immunohistochemistry and image analysis

Tissue samples were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin. Details of the immunohistochemistry staining and analysis are described in Supplementary File 1.

Statistical analysis

All statistical analyses were performed using SPSS version 20.0 (IBM, Chicago IL). Shapiro Wilk and Kolmogorov-Smirnov tests were used to check the normality of variable distribution. Variables with normal distribution are expressed as means \pm standard deviation and those with non-normal distribution as medians with interquartile range. Results were compared between groups using a *t*-test for normally-distributed variables and a non-parametric test (Wilcoxon or Mann Whitney Test) or ANOVA or the Kruskal Wallis test for those with non-normal distribution. Categorical variables (sex, tumor stage, tumor size) were grouped into two groups and analyzed using the chi-square (χ^2) or Fisher exact Test.

Table 1: Demographic, clinical, and histological characteristics of the study subjects

| Variable | NSCLC n = 61 | Healthy subjects n = 32 |
|------------------------------------|-----------------|----------------------------|
| Gender n (%): | | |
| Female | 11 (18) | 13 (40.6) |
| Male | 50 (82) | 19 (59.4) |
| Age, years, median (range) | 66 (45–82) | 62 (49–84) |
| Smoking history: | | |
| Non-smoker | 3 (5) | 16 (50) |
| Ex-smoker | 28 (46) | 5 (15.6) |
| Smoker | 30 (49) | 15 (34.4) |
| Smoking pack-years, median (range) | 55 (0–120) | 7,78 (0–40) |
| Tumor size, median (range) | 3.80 (0.5–9.5) | |
| Histological NSCLC subtype: | | |
| Lung Adenocarcinoma | 23 (36.1) | |
| Squamous cell carcinoma | 32 (53.9) | |
| Metastasis from other cancer | 6 (10) | |
| NSCLC stage: | | |
| Stage IA | 21 (36) | |
| Stage IB | 18 (28) | |
| Stage IIA | 13 (21.3) | |
| Stage IIB | 7 (11.5) | |
| Stage IIIA | 2 (3.3) | |
| T status: | | |
| T1a | 13 (20) | |
| T1b | 10 (16) | |
| T2a | 18 (29.5) | |
| T2b | 11 (19) | |
| T3 | 8 (13.9) | |
| T4 | 1 (1.6) | |
| N status: | | |
| Nx | 4 (6.6) | |
| N0 | 45 (73.8) | |
| N1 | 6 (9.8) | |
| N2 | 6 (9.8) | |
| Differentiation: | | |
| Moderate | 27 (43) | |
| Good | 11 (17.4) | |
| Poor | 15 (24.6) | |
| SUVs PET, median (range) | 9.52 (0–26.2) | |

Correlation coefficients were calculated to evaluate the strength of linear associations. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M^a Dolores Rodriguez Martinez for assistance with the immunohistochemical analysis of the tumor samples and to Eva García Huertas for assistance with the flow cytometry analysis. This study forms part of the doctoral thesis of M^a del Mar Valenzuela Membrives.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare that there are no conflicts of interest.

FUNDING

This study was supported by Neumosur [grant N^o 16/2014 to AS-P].

REFERENCES

- Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008; 83:584–94.
- Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. *Nature Rev Cancer.* 2012; 12:298–306.
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ. *CA Cancer J Clin.* 2006; 56:106–30.
- Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nature Reviews Immunology.* 2006; 6:295–307.
- Atreya I, Neurath M.F. Immune cells in colorectal cancer: Prognostic relevance and therapeutic strategies. *Expert Rev Anticancer.* 2008; 8:561–572.
- Bindea G, Mlecnik B, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Natural immunity to cancer in humans. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22:215–222.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313:1960–1964.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F, Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol.* 2011; 29:610–8.
- Brambilla E, Le Teuff G, Marguet S, Lantmeijoul S, Dunant A, Graziano S, Pirker R, Douillard JY, Le Chevalier T, Filipts M, Rosell R, Kratzke R, Popper H, et al. Prognostic effect of tumor lymphocytic infiltration in resectable non-small cell lung cancer. *J of Clin Oncol.* 2016; 34:1223–30.
- Mantovani A, Sica A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 2010; 22:231–7.
- Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Mariot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27:5944–51.
- Ronald J. deLeeuw, Sara E. Kost, Juzer A. Kakal, and Brad H. Nelson. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clinical Cancer Research.* 2012; 18:3022–29.
- Tao H, Mimura Y, Aoe K, Kobayashi S, Yamamoto H, Matsuda E, Okabe K, Matsumoto T, Sugi K, Ueoka H. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer.* 2012; 75:95–101.
- Duraiwamy J, Kalra KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* 2013; 73:3591–603.
- Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nature Reviews Immunology.* 2007; 7:329–39.
- Chan CJ, Andrews DM, Smyth MJ. Can NK cells be a therapeutic target in human diseases? *Eur J Immunol.* 2008; 38:2964–68.
- Cerwenka A, Falk CS, Watzl C. NK cells—from basic research to cancer therapy. *Eur J Immunol.* 2007; 37:1161–64.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugozzini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science.* 2011; 331:44–9.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugozzini S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology.* 2008; 9:503–1.
- Sun JC, Lanier LL. Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *Eur J Immunol.* 2009; 39:2059–64.
- Björkström NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Björklund AT, Flodström-Tullberg M, Michaëlsson J, Rottenberg ME, Guzmán CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood.* 2010; 116:3853–64.
- Béziat V, Descours B, Parizot C, Debré P, Vieillard V. NK Cell Terminal Differentiation: Correlated Stepwise Decrease of NKG2A and Acquisition of KIRs. *PLoS One.* 2010; 5:e11966.

23. Jonsson AH, Yokoyama WM. Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms. *Adv Immunol.* 2009; 101: 27–79.
24. Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005; 436:709–713.
25. Mamessier E, Sylvain A, Thibault ML, Houvenaeghel G, Jacquemier J, Castellano R, Gonçalves A, André P, Romagné F, Thibault G, Viens P, Birnbaum D, Bertucci F, et al. Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *Journal of Clinical Investigation.* 2011; 121:3609–22.
26. Brodin P, Karre K, Hoglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends in Immunology.* 2009; 30:143–149.
27. Elliott JM, Wahle JA, Yokoyama WM. HC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I- sufficient environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010; 207:2073–79.
28. Joncker NT, Shifrin N, Delebecque F, Raulet DH. Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *Journal of Experimental Medicine.* 2010; 207:2065–72.
29. Galon J, Angell HK, Bedognetti D, and Marincola FM. The continuum of cancer immunosurveillance: Prognostic, predictive, and mechanistic signatures. *Immunity.* 2013; 39:11–26.
30. Dehghani M, Sharifpour S, Amirghofran Z, Zare HR. Prognostic significance of T cells subsets in peripheral blood of B cell non-Hodgkin's lymphoma patients. *Med Oncol.* 2012; 29:2364–71.
31. Zikos TA, Donnenberg AD, Landreneau RJ, Luketich JD, Donnenberg VS. Lung T-cell subset composition at the time of surgical resection is a prognostic indicator in non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60:819–27.
32. Okita R, Saeki T, Takashima S, Yamaguchi Y, Toge T. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in the peripheral blood of patients with breast cancer and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 2005; 14:1269–73.
33. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gumsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:606–12.
34. Fracchia A, Pacetti M, Barberis M, Mura MA, Le Grazie C, Longhini E. Determination of T lymphocyte subpopulations in patients with lung cancer. A comparison between lung lavage and peripheral blood by monoclonal antibodies and flow cytometry. *Respiration.* 1987; 51:161–9.
35. Joyce JA, Fearon DT. T cell exclusion, immune privilege, and the tumor microenvironment. *Science.* 2015; 348:74–80.
36. Roychoudhuri R, Eil RL, Restifo NP. The interplay of effector and regulatory T cells in cancer. *Curr Opin Immunol.* 2015; 33:101–11.
37. Chen C, Chen D, Zhang Y, Chen Z, Zhu W, Zhang B, Wang Z, Le H. Changes of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ and CD8⁺CD28⁻ regulatory T cells in non-small cell lung cancer patients undergoing surgery. *Int Immunopharmacol.* 2014; 18:255–61.
38. Fu HY, Li C, Yang W, Gai XD, Jia T, Lei YM, Li Y. FOXP3 and TLR4 protein expression are correlated in non-small cell lung cancer: implications for tumor progression and escape. *Acta Histochem.* 2013; 115:151–157.
39. Ciebiada M, Kaszalska K, Gorska-Ciebiada M, Barylski M, Gorski P. Expression of IL-7 receptor in human peripheral regulatory T cells. *Arch Med Sci.* 2013; 9:555–60.
40. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, Baker E, Sutherland GR, Poindexter K, Birks C. The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol.* 1994; 153:3574–83.
41. Mizumoto N, Kumamoto T, Robson SC, Sévigny J, Matsue H, Enjyoji K, Takashima A. CD39 is the dominant Langerhans cell-associated ecto-NTPDase: Modulatory roles in inflammation and immune responsiveness. *Nat Med.* 2002; 8:358–365.
42. Cai XY, Wang XF, Li J, Dong JN, Liu JQ, Li NP, Yun B, Xia RL. Overexpression of CD39 and high tumoral CD39(+)/CD8(+) ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8:14757–64.
43. Umansky V, Shevchenko I, Bazhin AV, Utikal J. Extracellular adenosine metabolism in immune cells in melanoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2014; 63:1073–80.
44. Gupta PK, Godec J, Wolski D, Adland E, Yates K, Pauken KE, Cosgrove C, Ledderose C, Junger WG, Robson SC, Wherry EJ, Alter G, Goulder PJ, et al. CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8⁺ T Cells. *PLoS Pathog.* 2015; 11:e1005177.
45. Bai A, Moss A, Rothweiler S, Longhi MS, Wu Y, Junger WG, Robson SC. NADH oxidase-dependent CD39 expression by CD8⁺ T cells modulates interferon gamma responses via generation of adenosine. *Nat Commun.* 2015; 9:6:8819.
46. Strioga M, Pasukoniene, Characiejus D. CD8⁺ CD28⁻ and CD8⁺ CD57⁺ T cells and their role in health and disease. *Immunology.* 2011; 134:17–32.
47. Meloni F, Morosini M, Solari N, Passadore I, Nascimbene C, Novo M, Ferrari M, Cosentino M, Marino F, Pozzi E, Fietta AM. Foxp3 expressing CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD28⁻ T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum Immunol.* 2006; 67:1–12.

48. Fremd C, Schuetz F, Sohn C, Beckhove P, Domschke C. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. 2013; 1;2:e25443.
49. Gunderson AJ, Coussens LM. B cells and their mediators as targets for therapy in solid tumors. *Exp Cell Res*. 2013; 319:1644-9.
50. Shushakova N, Skokowa J, Schulman J, Baumann U, Zwirner J, Schmidt RE, Gessner JE. C5a anaphylatoxin is a major regulator of activating versus inhibitory FcγR1 in immune complex-induced lung disease. *J Clin Invest*. 2002; 110:1823-1830.
51. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol Biol*. 2008; 415:151-162.
52. Huntington ND, Voshenrich CAJ, Di Santo JP. Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nature Reviews Immunology*. 2007; 7:703-714.
53. Fremd AG, Yokohama A, Becknell B, Lee MT, Mao HC, Ferketich AK, Caligiuri MA. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation *in vivo*. *Journal of Experimental Medicine*. 2006; 203:1033-43.
54. Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Goldfarb RH, Nagelkerke JF, Nannmark U, Kuppen PJ. NK cells and the tumour microenvironment: implications for NK-cell function and anti-tumour activity. *Trends Immunol*. 2003; 24:603-9.
55. Lee SH, Jo EJ, Eom JS, Mok JH, Kim MH, Lee K. Predictors of Recurrence after Curative Resection in Patients with Early-stage Non-small Cell Lung Cancer. *Tuberc Respir Dis*. 2015; 78:341-48.
56. Goldstraw P. (Ed) *Staging Manual in Thoracic Oncology*. Editorial EXPRESS. 2015.

Progressive changes in composition of lymphocytes in lung tissues from patients with non-small-cell lung cancer

Supplementary Materials

Supplementary File S1

Flow cytometry analysis

Specific monoclonal antibodies used to identify different lymphocyte populations were: anti-CD57-FITC, anti-CD4-PE, anti-CD8-Percp, anti CD8-APC H7, anti-CD45RO-Pecy7, anti HLA-DR-APC, anti-CD3-Pacific Blue (V450), Human regulatory T cell cocktail (anti-CD4-FITC/anti-CD25-Pecy7/anti-CD127-APC), anti-CD20-PE, anti-CD20-FITC, anti-CD20-Pacific Blue (V450), Simultest™ (anti-CD3-FITC/CD56+CD16-PE), anti-CD183/PercpCy5 (CXCR3), anti-CD196/PE (CCR6), anti-CD56-PE, anti-CD16-Percp, anti-CD45-Amcyam (V500), anti-EPCAM-Percp, anti-CD64-FITC, anti-CD11b-PE, anti-CD161-APC and anti-CD33-Percp (BD Bioscience, San José, California, USA). For multiparametric analysis, a minimum of 4,000 events in lung tissues or 30,000 in peripheral blood in the lymphocyte collection gate (CD45⁺ versus SSClow) were collected in a FACS Canto™ II analyzer. Data were analyzed using BD FACSDiva Software v.8.01 (BD).

An electronic gate was set for CD45⁺/SSC^{low} and a minimum of 10,000 events in this gate were recorded for each sample. An additional electronic gate was made from the lymphocyte gate for T-cells (CD3⁺) and either CD4⁺ or CD8⁺, and the results were expressed as the relative percentage of each marker in the gate for CD4 or CD8 lymphocyte cells. CD4 (and CD8) cells can be classified as effector memory cells by expression of CD45RO. Human regulatory T cell cocktail was used to identify regulatory T cell subsets defined as CD127^{low} CD25^{high} CD4⁺. The amount of Treg was expressed as a percentage of total CD4 cells. Other T CD4 or CD8 subsets analyzed were CD39⁺ CD4⁺, and CD39⁺ CD8⁺, CD57⁺ CD8⁺ T cells. We also evaluated the presence of mature CD56⁺ CD16⁺, NK cells and subsets. NK cell subpopulations were determined by the selection of CD45⁺, CD3⁻, CD20⁻ cells in the lymphocyte gate FSC^{low}/SSC^{low}. The gating strategy adopted offers the ability to detect several subpopulations within the plot: single positive CD16⁺, single positive CD56⁺ and double positive CD16⁺ CD56⁺ mature NK-cells and low cytolytic CD56^{high}, CD16⁻ NK-cells. Immature NK-cells that express CD161 but not CD16 or CD56 could also be detected.

Similar to regulatory T cells, Th1 and Th17 were expressed as a percentage of total CD4⁺ T cells. Th1 was characterized as (CXCR3⁺CCR6-CD4⁺) cells and Th17 was characterized as (CXCR3-CCR6+CD4⁺) cells. Th1 Th17 data cells were only available from 14 patients. Finally, the presence of B-cells (CD20⁺) and granulocytes (CD11b+CD16⁺) was also investigated.

The percentage lymphocyte infiltration in each tumor was obtained by measuring CD45⁺/SSC^{low} cells within the collection gate as a proportion of the total cell count. These data were used to analyze the relationship between the inflammatory infiltration from subsets and clinical-pathological features.

Immunohistochemistry and image analysis

Tissue samples were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin; 4 µm-thick sections were taken from the paraffin blocks, mounted on pretreated slides, and stained for CD45, CD20, CD3, CD4 CD8 or CD68, using prediluted antibodies supplied by Master Diagnostica (CD45: Ref MAD-002066QD, batch:0108-01; CD20: Ref MAD-002037QD, batch 0267-10, clone L26; CD3: Ref MAD00621QD, batch: 0117-02, clone EP41; CD4: Ref: MAD-00600QD, batch:0107-02-10, clone EP 204; CD8: Ref MAD-000618QD, batch 0183-11, clone SP16; CD68: Ref MAD-002097QD, batch 0175-07). Immunohistochemical staining was carried out using the of UltraVision Quanto (peroxidase) immunohistochemistry detection system (MAD-021881QK/MAD-001881QK Master Diagnostica) following manufacturer's instructions. In short, paraffin sections were dewaxed and endogenous peroxidase activity blocked in a solution of hydrogen peroxide for 10 min. For antigen retrieval, sections were treated with sodium citrate buffer (pH 6.0). After incubation with the primary antibodies for 16 hours at 4°C and washing 3 times with PBS for 5 minutes, tissue sections were again incubated for 10 min with the primary antibodies Amplificator (UltraVision Quanto) and then washed, and incubated with the polymer Quanto (Ultra Vision Quanto) for 10 minutes. DAB was used as chromogen and sections were counterstained with hematoxylin.

No staining was obtained when non-immune serum or PBS was used instead of the primary antibody, confirming the specificity of the latter. All specimens were

primary tumors with no previous treatment that may affect the immunohistochemical results.

Lymphocyte infiltration was evaluated into three groups based on their localization: (a) those infiltrated within cancer cell nests, (b) those distributed in the cancer stroma, and (c) those present along the invasive margin (tumor-host interface).

The number of cells stained by each antibody was semi-quantitatively evaluated using the following scores: 1+ (minimal - stained cells practically absent, < 5 stained cells per high power field (HPF) 40 \times), 2+ (mild infiltrate,

6–25 stained cells per HPF 40 \times), 3+ (moderate, 26–50 stained cells per HPF 40 \times), 4+ (severe – intense, > 50 stained cells per HPF 40 \times).

Manual evaluation of stained immune cells was conducted in duplicate by two independent observers blinded to the clinicopathological findings. These data were used in the statistical analysis. Figure 3 depicts representative examples of immunohistochemical findings in intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes, showing stromal and invasive margin patterns.

2. Figuras adicionales

2.1 Pérdida completa de haplotipo HLA de clase I y II en la línea derivada de NSCLC SKMES

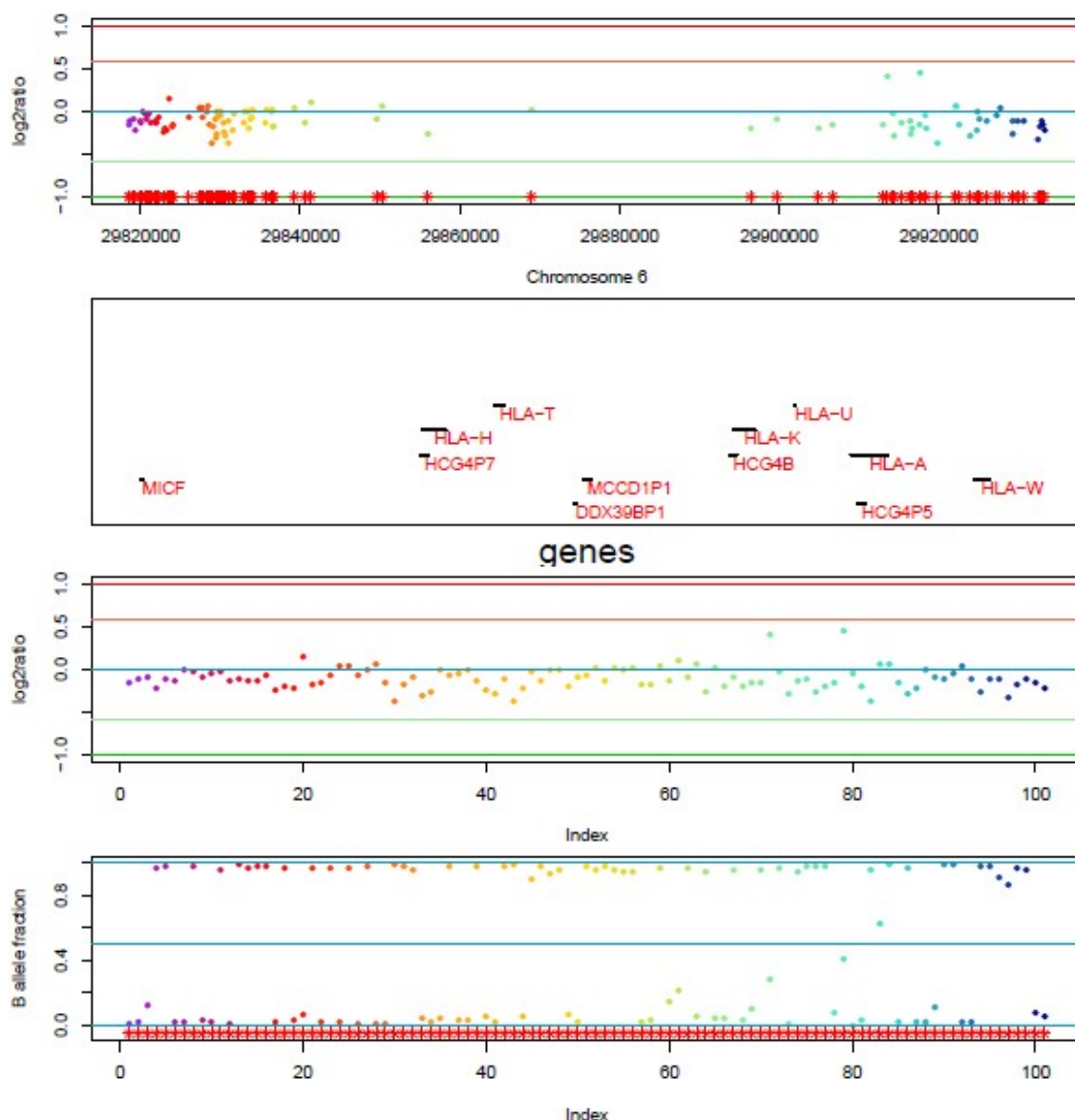


Figura A1. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón SKMES. Se representan los genes HLA-A, entre otros, y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro de abajo representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterociguidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterociguidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-A.

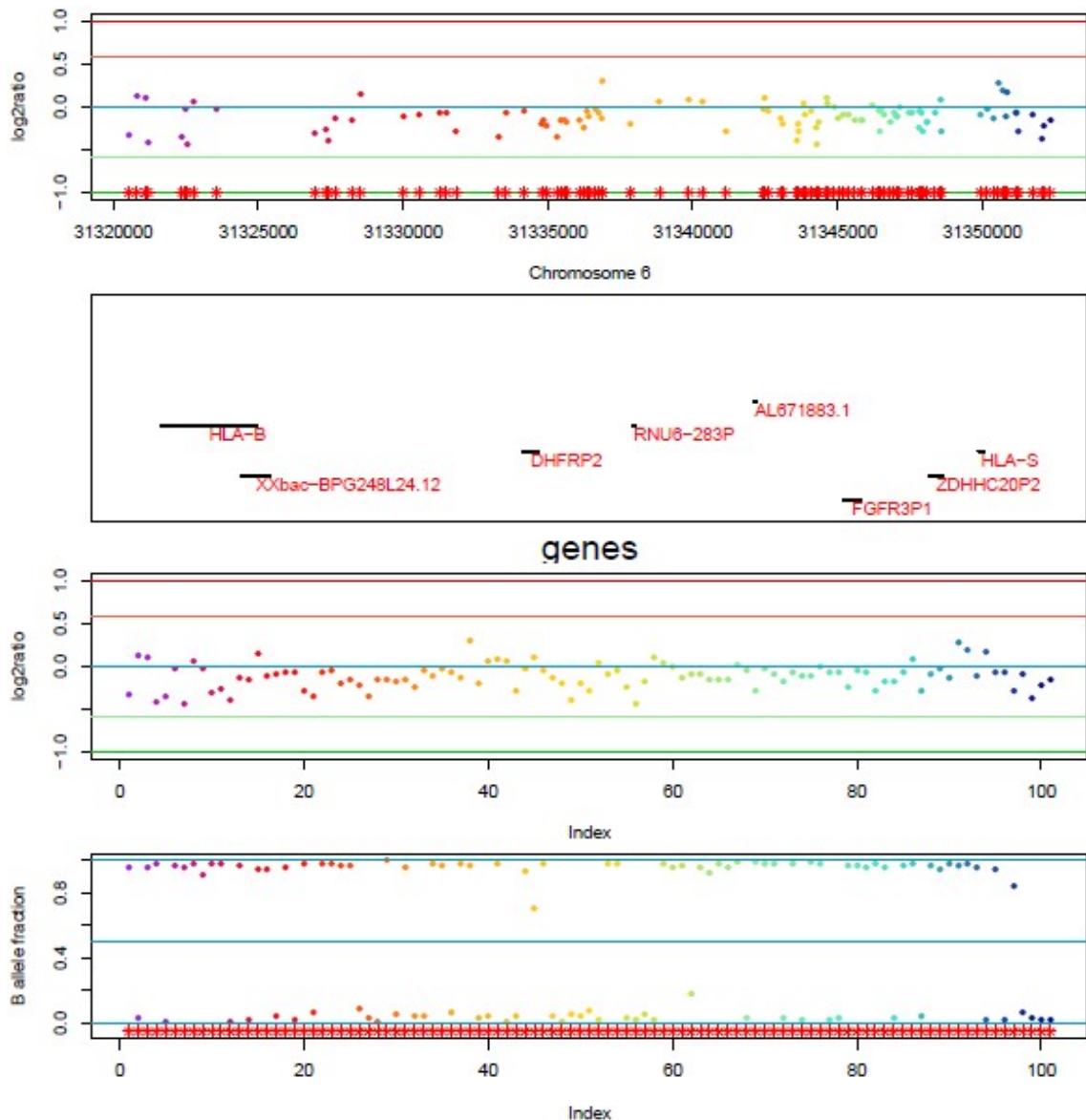


Figura A2. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón SKMES. Se representan los genes HLA-B, entre otros, y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro de abajo representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-B.

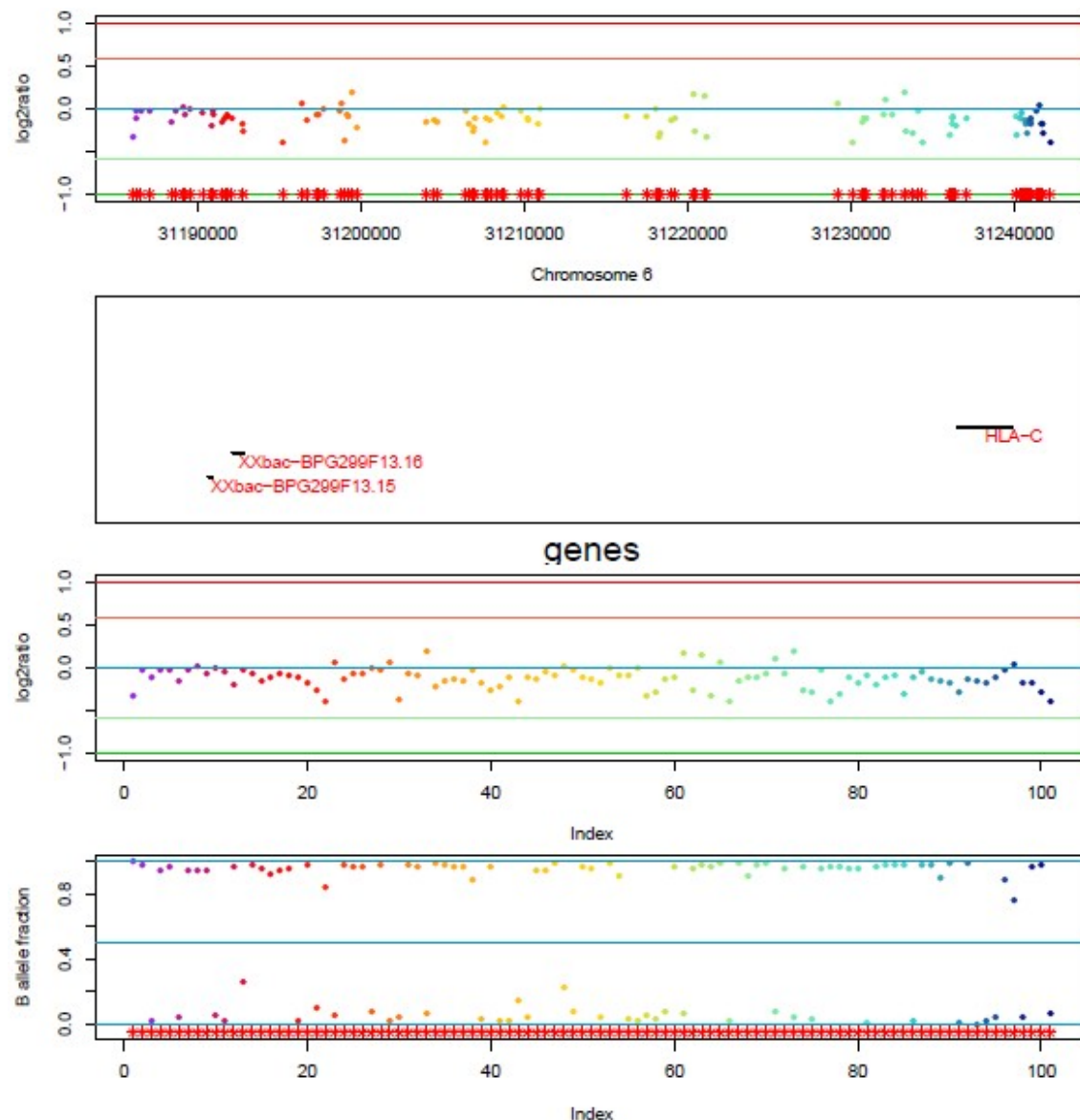


Figura A3. Delección de genes MHC en la línea celular de cancer de pulmón SKMES. Se representan los genes HLA-C, entre otros, y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro de abajo representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-C.

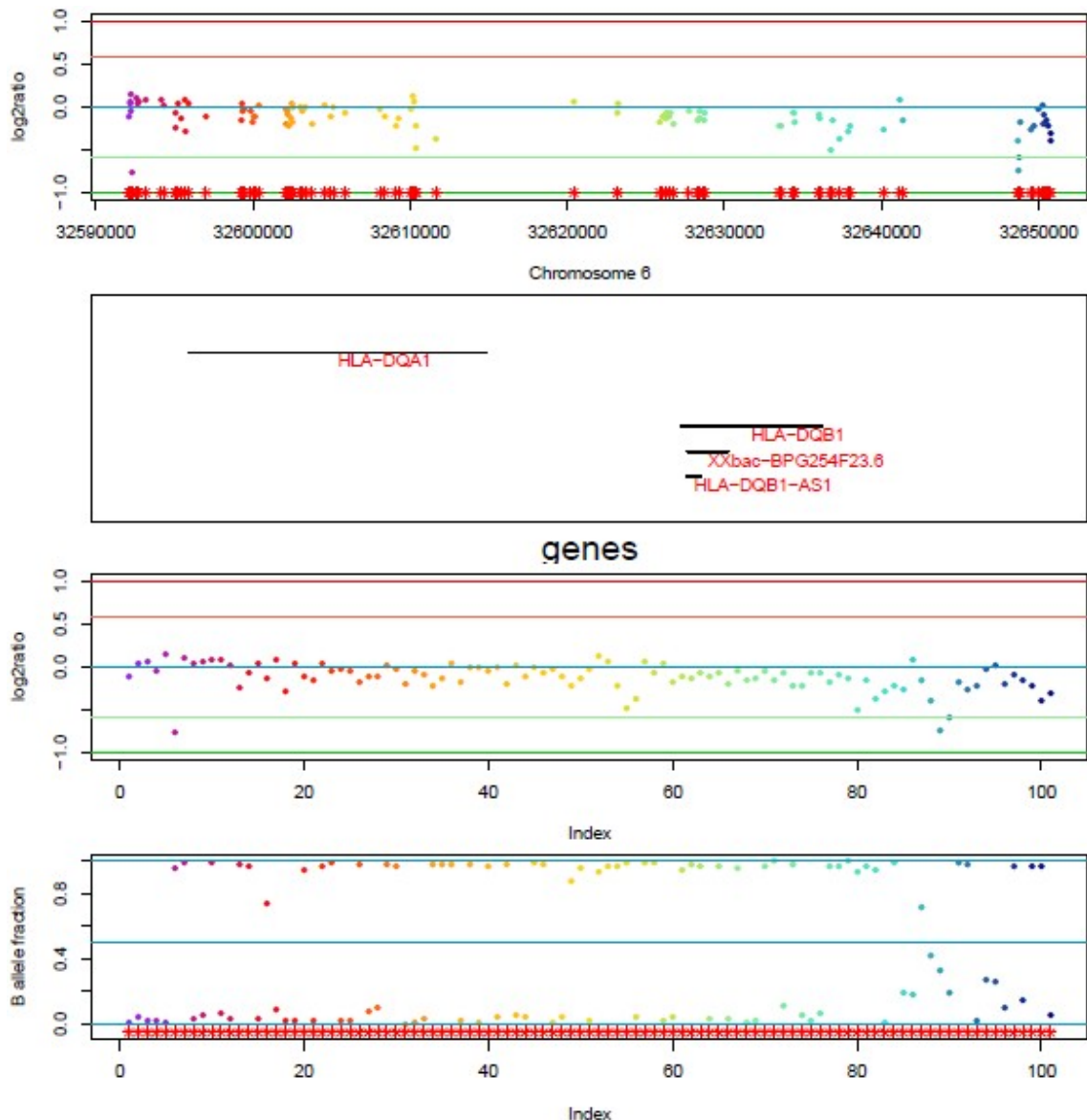


Figura A4. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón SKMES. Se representan los genes HLA-DQB1, entre otros, y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro de abajo representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa claramente una LOH en los genes HLA-DQ.

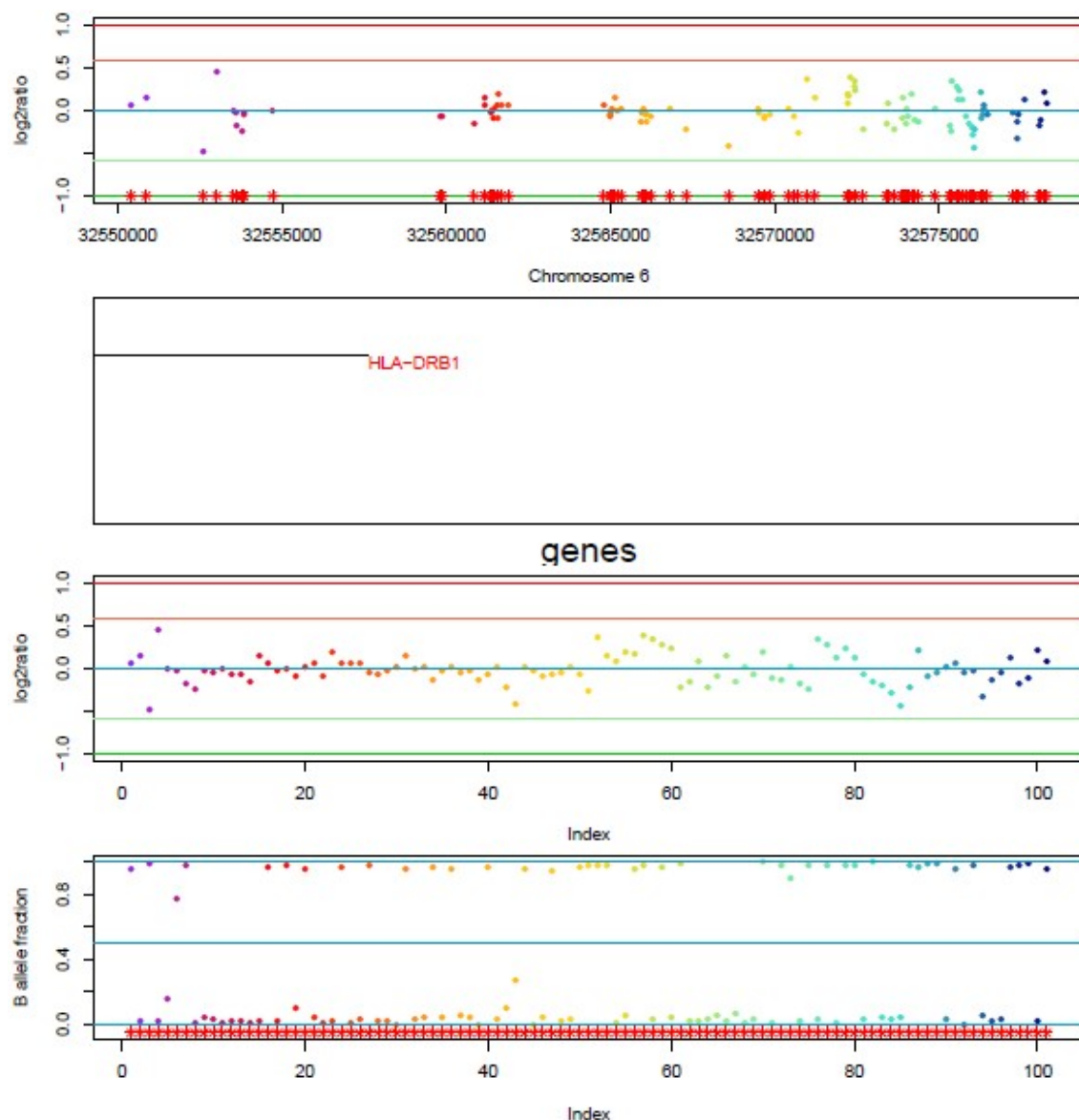


Figura A5. Delección de genes MHC en la línea celular de cancer de pulmón SKMES. Se representan el gen HLA-DRB1 y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigotidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigotidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-DRB1.

2.2 Pérdida selectiva de HLA-B, -C en línea derivada de NSCLC A417

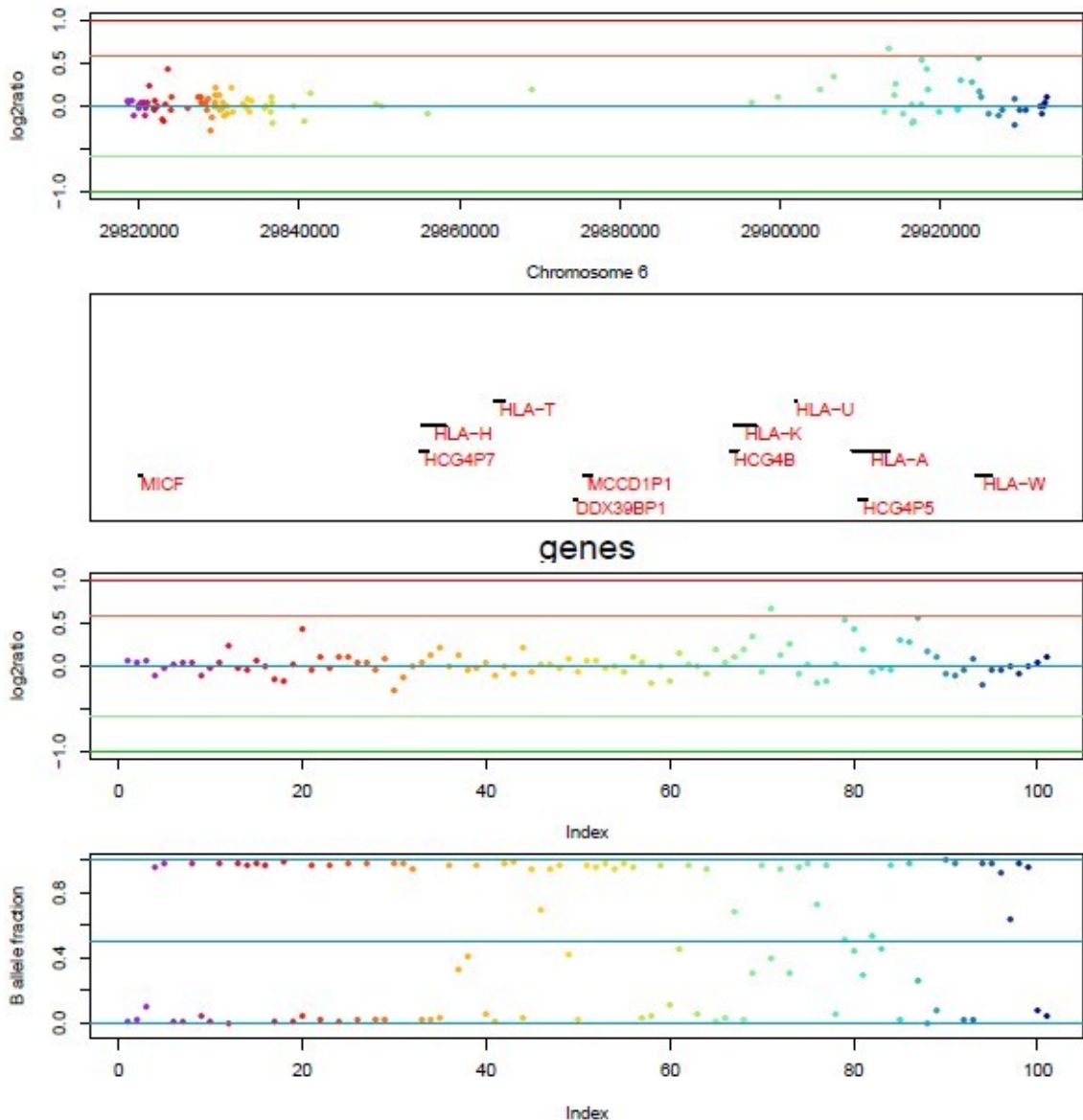


Figura A6. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón A427. Se representan el gen HLA-A, entre otros, y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigotidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigotidad (LOH). Se observa claramente como el gen HLA-A permanece heterocigoto y no se observa ninguna anomalía.

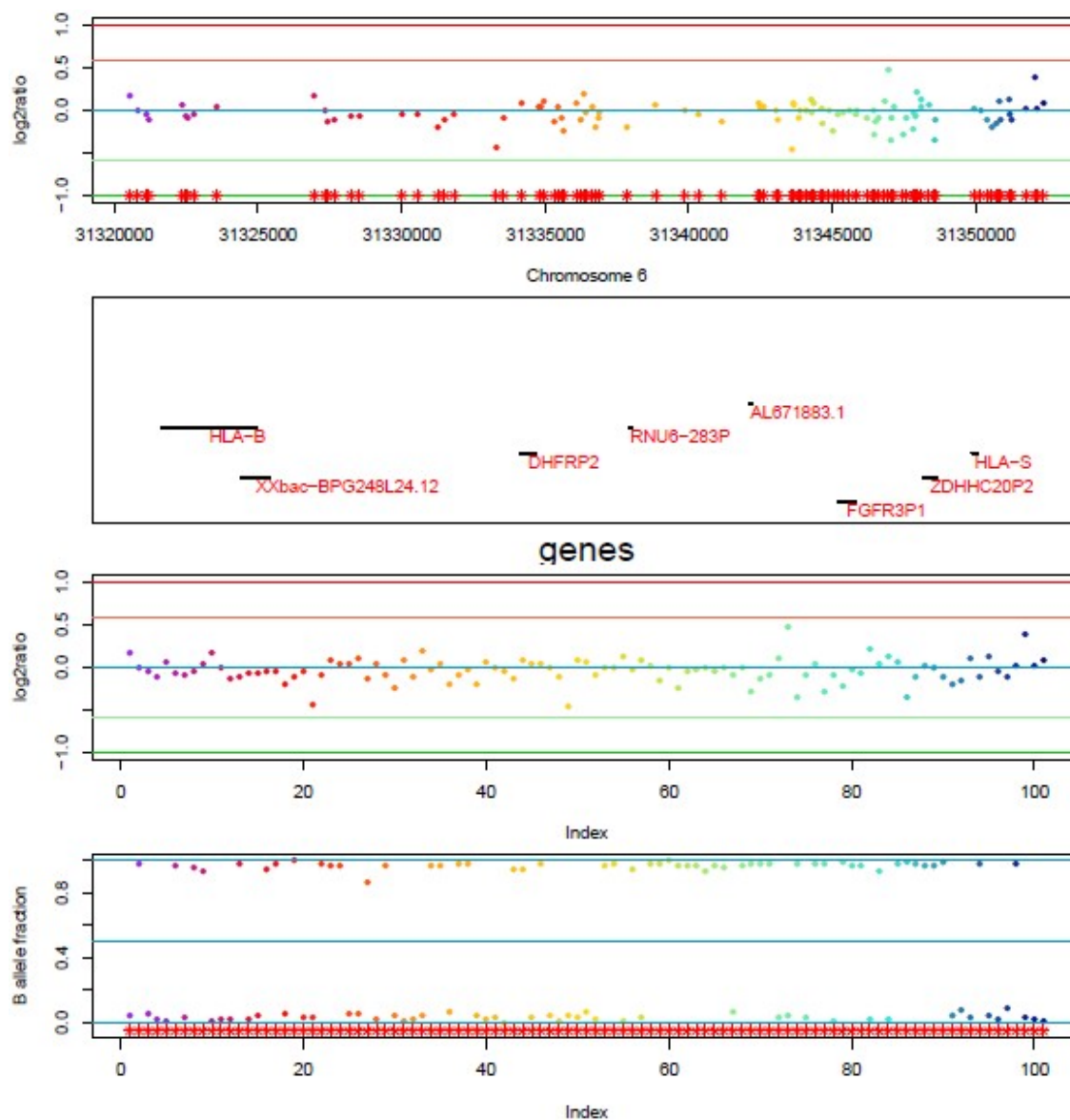


Figura A7. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón A427. Se representan los genes HLA-B y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-B.

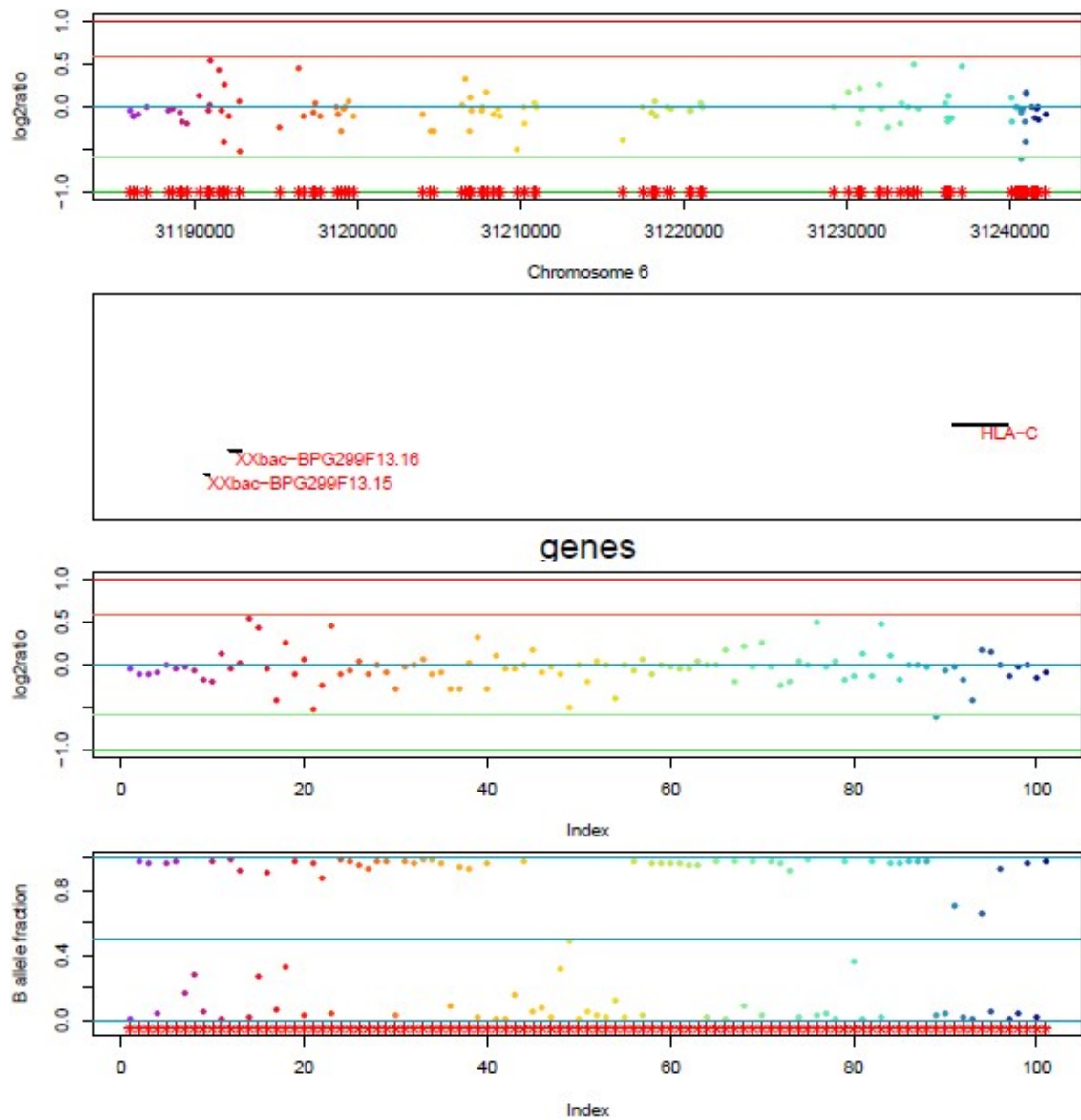


Figura A8. Delección de genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón A427. Se representan los genes HLA-C y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterociguidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterociguidad (LOH). Se observa claramente una LOH en el gen HLA-C.

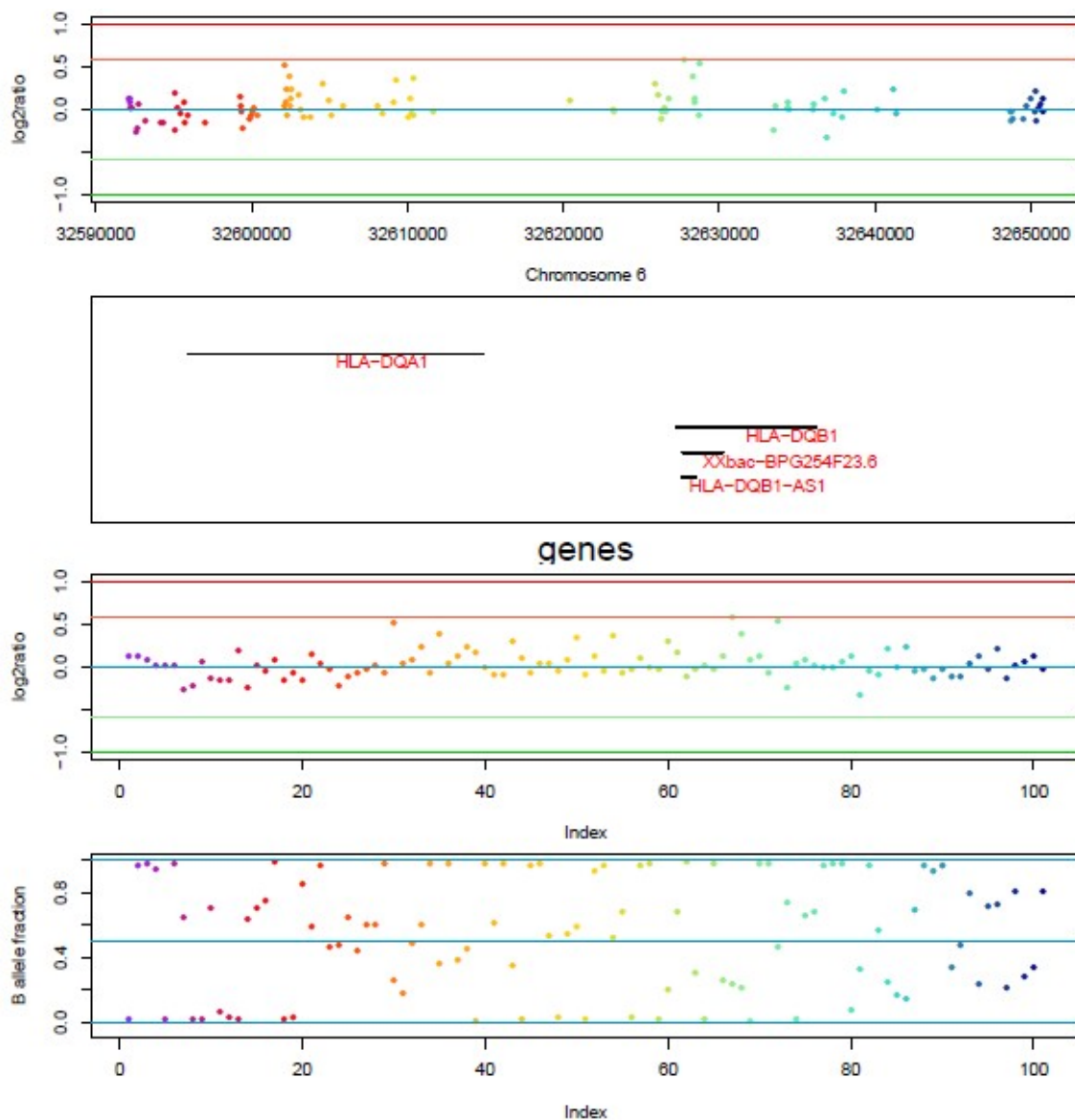


Figura A9. Delección de genes genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón A427. Se representan los genes HLA-DQ y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa que no hay ninguna alteración y presenta heterocigosidad en los genes HLA-DQ.

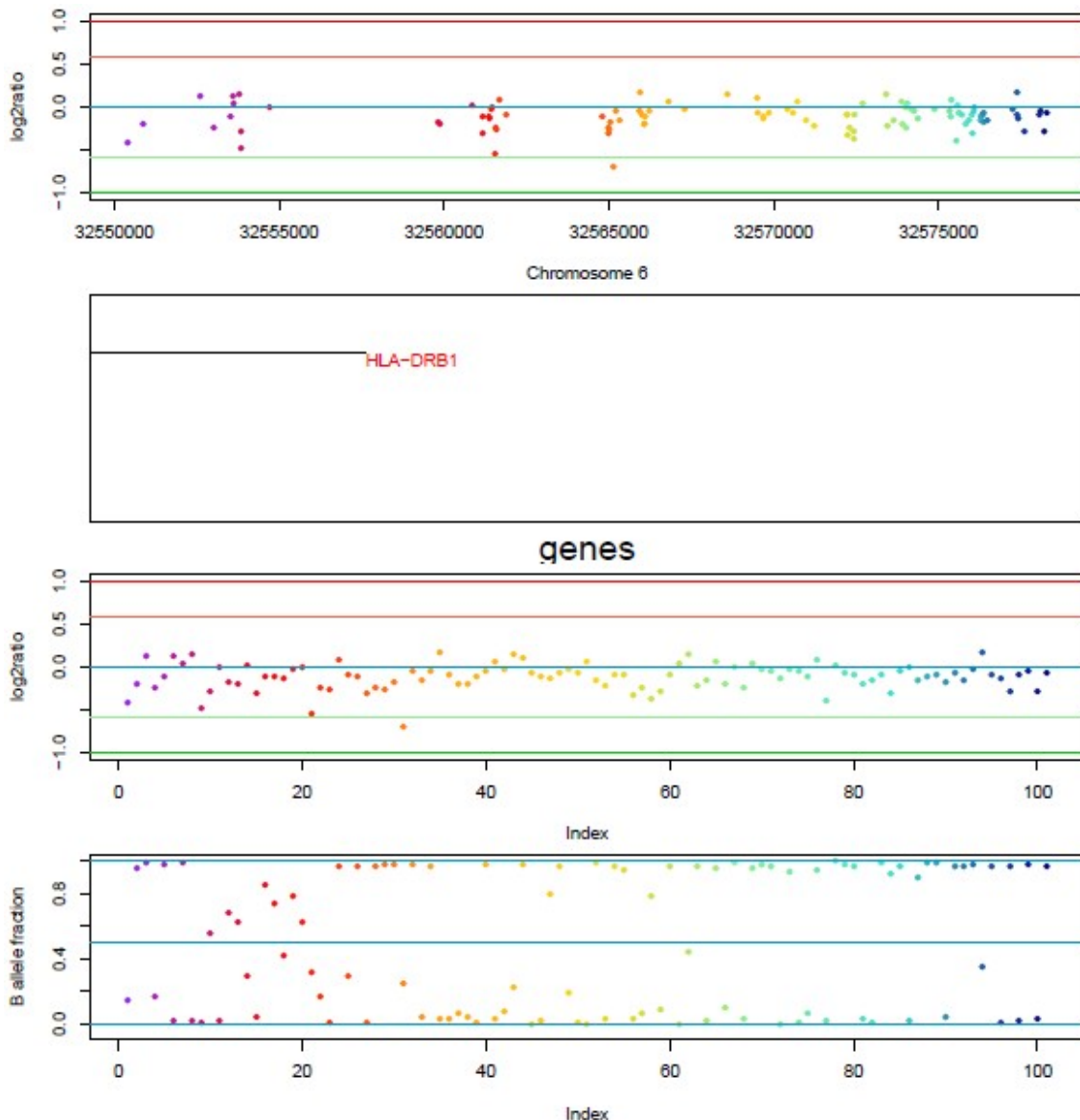


Figura A10. Delección de genes genes MHC en la línea celular de cáncer de pulmón A427. Se representan el gen HLA-DRB1 y cada uno de los polimorfismos estudiados. El cuadro inferior representa la frecuencia de alelos. La distribución central indicaría retención de heterocigosidad y la distribución hacia un lado o hacia al otro indicaría pérdida de heterocigosidad (LOH). Se observa que el gen HLA-DRB1 presenta heterocigosidad y no hay ninguna alteración.