



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Máster

NETosis como barrera inmunosupresora: restauración parcial de la citotoxicidad de células NK mediante granzima A en modelos 2D y 3D de cáncer colorrectal

NETosis as an Immunosuppressive Barrier: Partial Restoration of NK Cell Cytotoxicity by Granzyme A in 2D and 3D Models of Colorectal Cancer

Daniel Alberto Torres Fernández

Directores

Julián Pardo Jimeno

Ariel Gaspar Ramírez Labrada

Facultad de Medicina

2025

INDICE

1 RESUMEN	7
2 ABSTRACT	8
3 INTRODUCCIÓN	1
3.1 Panorama actual del cáncer de colon	2
3.2 Células NK: perfil inmunológico y relevancia en la respuesta antitumoral	2
3.2.1 Granzimas: características, funciones y relevancia	4
3.3 Neutrófilos asociados al tumor y su papel en la progresión neoplásica	7
3.4 Mecanismos de formación de NETs: Modalidades lítica y no lítica	9
3.4.1 NETosis lítica	9
3.4.2 NETosis no lítica	10
3.5 NETs como promotoras de la progresión tumoral	11
3.6 Las NETs como moduladores de la respuesta citotóxica de las células NK en el contexto tumoral	12
4 HIPÓTESIS	14
5 OBJETIVOS	14
5.1 Objetivo general:	14
5.2 Objetivos específicos:	14
6 MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1 Cultivo celular	15
6.1.1 Líneas celulares.....	15
6.1.2 Condiciones de cultivo.....	15
6.1.3 Evaluación de la viabilidad y conteo celular	16
6.1.4 Crioconservación de líneas celulares	16
6.1.5 Citometría de flujo.....	16
6.1.6 Aislamiento de PBMCs	18
6.1.7 Activación y purificación de células NK	18
6.1.8 Aislamiento de neutrófilos.....	19
6.1.9 Formación de esferoides	20
6.1.10 Ensayos de citotoxicidad	21
6.1.11 Análisis estadístico	22

6.1.12	Análisis bioinformático de NE.....	22
7	RESULTADOS.	23
7.1	Inhibición de la actividad citotóxica de células NK por NETs en modelos 2D.....	23
7.1.1	Evaluación de la granzima A sobre la función citotóxica de células NK expuestas a NETs.	25
7.2	Impacto de las NETs en la citotoxicidad de células NK en esferoides	26
7.2.1	Impacto de la GzmA en el efecto inhibitorio de las NETs en un modelo tridimensional	28
7.3	Fenotipado de moléculas relevantes en la interacción célula tumoral – célula NK	29
7.3.1	Bloque 1: Moléculas asociadas a la activación de células NK	30
7.3.2	Bloque 2: Moléculas inhibitorias para células NK.....	32
7.4	Análisis in silico de la capacidad de la NE de cortar PD-L1	35
8	DISCUSIÓN	36
9	CONCLUSIONES.....	42
10	BIBLIOGRAFÍA.....	43

Abreviaturas

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

ADCC: Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity)

AUC: Área bajo la curva (Area Under the Curve)

B7-H6: B7 Homolog 6

CALR: Calreticulina

CCR: Cáncer Colorrectal

CD: Clúster de Diferenciación (Cluster of Differentiation)

CD47: Clúster de Diferenciación 47

CD155: Clúster de Diferenciación 155

DMSO: Dimetilsulfóxido

DMEM: Medio Mínimo Esencial de Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

eGFP: Proteína Fluorescente Verde Mejorada (enhanced Green Fluorescent Protein)

FcγRIIIa (CD16): Receptor Fc de baja afinidad tipo IIIa

G-CSF: Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos (Granulocyte Colony-Stimulating Factor)

GSDMD: Gasdermina D

GzmA: Granzima A

HGF: Factor de Crecimiento Hepatocitario (Hepatocyte Growth Factor)

HLA: Antígeno Leucocitario Humano (Human Leukocyte Antigen)

HLA-DR: Antígeno Leucocitario Humano-DR

HLA-E: Antígeno Leucocitario Humano-E

HLA-G: Antígeno Leucocitario Humano-G

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)

IFN γ : Interferón gamma

IL-2: Interleucina 2

IL-8: Interleucina 8

IL-15: Interleucina 15

MACS: Separación Celular Activada Magnéticamente (Magnetic Activated Cell Sorting)

MDSC: Células Supresoras Derivadas de Mieloides (Myeloid-Derived Suppressor Cells)

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia (Mean Fluorescence Intensity)

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de Clase I (Major Histocompatibility Complex Class I)

MICA/B: Moléculas de Estrés del MHC clase I A/B

MMP: Metaloproteinasa de Matriz

MPO: Mieloperoxidasa

NE: Elastasa de Neutrófilos (Neutrophil Elastase)

NETs: Trampas Extracelulares de Neutrófilos (Neutrophil Extracellular Traps)

NK: Natural Killer

PAD4: Peptidil Arginina Deiminasa 4

PBS: Solución Salina Buffer Fosfato (Phosphate Buffered Saline)

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cells)

PD-L1: Ligando de Muerte Programada 1 (Programmed Death-Ligand 1)

PMA: Éster de Forbol Miristato de Acetato

PRRs: Receptores de Reconocimiento de Patrones (Pattern Recognition Receptors)

qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (Quantitative Polymerase Chain Reaction)

ROS: Especies Reactivas de Oxígeno (Reactive Oxygen Species)

RSA: Accesibilidad Relativa de Superficie (Relative Surface Accessibility)

RPMI: Medio Roswell Park Memorial Institute

SFB: Suero Fetal Bovino

TAN: Neutrófilos Asociados a Tumor (Tumor-Associated Neutrophils)

TCR: Receptor de Células T (T-cell Receptor)

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta (Transforming Growth Factor Beta)

TIL: Linfocitos Infiltrantes de Tumor (Tumor-Infiltrating Lymphocytes)

TME: Microambiente Tumoral (Tumor Microenvironment)

TRAIL: Ligando Inductor de Apoptosis Relacionado con TNF (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand)

ULBP: Proteína de Unión a UL16 (UL16-Binding Protein)

RESUMEN

El microambiente tumoral (TME) desempeña un papel crucial en la progresión del cáncer y la eficacia de las respuestas inmunitarias antitumorales. En este contexto, las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) han emergido como moduladores de la respuesta inmunitaria, particularmente afectando la citotoxicidad de células citotóxicas como los linfocitos T CD8⁺ y las células Natural Killer (NK). Este trabajo evaluó el impacto de las NETs sobre la función citotóxica de células NK en modelos tumorales bidimensionales (2D) y tridimensionales (3D) de carcinoma colorrectal, utilizando las líneas celulares HT-29 y HCT-116. Los resultados mostraron que la presencia de NETs reduce significativamente la capacidad citotóxica de las células NK, efecto más marcado en modelos 2D que en 3D. Además, se exploró el potencial restaurador de la granzima A (Gzma) sobre la función de las células NK expuestas a NETs, observándose una recuperación parcial de la citotoxicidad en ambos modelos. Adicionalmente, el fenotipado de células tumorales reveló una disminución de ligandos de activación para NK en presencia de NETs. Estos hallazgos refuerzan el papel de las NETs como un mecanismo de evasión tumoral y sugieren una función adicional de la Gzma como moduladora de la generación de NETs durante la respuesta inmune, lo que podría utilizarse como una nueva estrategia terapéutica para contrarrestar su efecto inmunosupresor.

Palabras clave: NETs, células NK, cáncer colorrectal, granzima A, inmunosupresión, citotoxicidad.

ABSTRACT

The tumor microenvironment (TME) plays a pivotal role in cancer progression and the effectiveness of antitumor immune responses. Neutrophil extracellular traps (NETs) have emerged as key modulators of immunity, particularly by impairing the cytotoxic function of cytotoxic cells like CD8⁺T cells and Natural Killer (NK) cells. This study assessed the impact of NETs on NK cell cytotoxicity using two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) colorectal carcinoma models based on HT-29 and HCT-116 cell lines. The findings demonstrated that NETs significantly reduce NK cell cytotoxicity, with a more pronounced effect observed in 2D cultures compared to 3D spheroids. Furthermore, the potential of granzyme A (GzmA) to restore NK cell function after NET exposure was investigated, revealing a partial recovery of cytotoxic activity in both models. Phenotypic analysis of tumor cells showed a decrease in NK-activating ligands in the presence of NETs. These findings reinforce the role of NETs as a mechanism of tumor immune evasion and suggest an additional function of GzmA as a modulator of NET formation during the immune response, which could be leveraged as a novel therapeutic strategy to counteract their immunosuppressive effect.

Keywords: NETs, NK cells, colorectal cancer, granzyme A, immunosuppression, cytotoxicity.

1 INTRODUCCIÓN

El sistema inmune es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones y enfermedades como el cáncer, su principal función es identificar y eliminar microorganismos dañinos, células infectadas o transformadas garantizando la protección y homeostasis del organismo ¹. El sistema inmunitario se compone de la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa ². En la inmunidad innata, los neutrófilos constituyen el tipo celular más abundante, con una vida media en circulación de entre 6 y 8 horas y una producción diaria que oscila entre 5×10^{10} y 10×10^{10} células. Estas células especializadas son reclutadas rápidamente hacia los sitios de inflamación, donde su principal tarea es eliminar bacterias y algunas especies de hongos ³. Logran esto a través de la fagocitosis, la liberación de enzimas y proteínas granulares almacenadas, así como la producción de especies reactivas de oxígeno y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET) ⁴.

Además de sus funciones directas, los neutrófilos liberan una amplia variedad de citoquinas y quimiocinas que inducen una inflamación aguda, atrayendo a otras células del sistema inmunitario innato al área afectada. Entre estas células se encuentran las células Natural Killer (NK), que juegan un papel crucial en la primera línea de defensa citotóxica. Las células NK son responsables de eliminar células infectadas por virus y células tumorales, complementando así la acción de los neutrófilos y fortaleciendo la respuesta inmunitaria ⁵.

La comprensión del cáncer ha experimentado un cambio radical en las últimas décadas, entendiéndose que el cáncer no es únicamente una enfermedad genética. Este es un sistema complejo que incluye diversos tipos celulares no cancerosos con extensas interacciones dentro del microambiente tumoral (TME, del inglés tumor microenvironment) ⁶.

La infiltración de diversas células inmunitarias en el TME juega un papel crucial en la eficacia de la inmunoterapia y otros tratamientos oncológicos. Según su tipo y función, estas células pueden facilitar o frenar el crecimiento tumoral. En general, una alta presencia de linfocitos infiltrantes de tumores (TIL) suele estar asociada con mejores respuestas a inhibidores de puntos de control inmunitario y con un pronóstico más favorable ⁷. Sin embargo, cuando el TME está dominado por células inmunosupresoras, como las células T reguladoras (Tregs), las células supresoras derivadas de mieloides (MDSC) y los neutrófilos de tipo 2 (N2), la efectividad de las terapias inmunológicas

tiende a disminuir, lo cual se asocia con resultados clínicos menos favorables ⁸. Esta compleja dinámica pone de relieve la importancia en la investigación del TME y sus interacciones inmunológicas. Comprender mejor estos procesos puede llevar a optimizar los tratamientos ya disponibles y a desarrollar terapias más efectivas, beneficiándose los pacientes con cáncer.

1.1 Panorama actual del cáncer de colon

El cáncer colorrectal (CCR) es el tercer tipo de cáncer más frecuente a nivel mundial, con aproximadamente 1,1 millones de nuevos casos anuales, y representa la segunda causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer ⁹. Las opciones de tratamiento para el CCR incluyen cirugía, criocirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida, siendo la cirugía la principal forma de tratamiento curativo, a menudo complementada con quimioterapia ¹⁰, su éxito depende en gran medida de la detección temprana, ya que aproximadamente la mitad de los pacientes diagnosticados presentan enfermedad metastásica ¹¹. Además, el estadio del tumor y otros factores intrínsecos asociados también juegan un papel importante en los resultados del tratamiento ¹², es importante señalar que existen diversos factores de riesgo asociados con el desarrollo del cáncer colorrectal (CCR), entre los cuales se incluyen el consumo de alcohol, el tabaquismo, la obesidad, un estilo de vida sedentario, una dieta inadecuada, la edad avanzada, la predisposición genética, la exposición a radiación y los cambios en la microbiota intestinal ¹³. Además, se acepta ampliamente que la inflamación crónica o persistente puede fomentar su desarrollo. Sin embargo, esta inflamación también juega un papel clave en la modulación del crecimiento tumoral y la respuesta inmune adaptativa. La conexión más evidente entre el CCR y la inflamación se observa en los casos asociados a colitis, como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, aunque estos representan solo entre el 1 % y el 2 % de todos los CCR ¹⁴.

1.2 Células NK: perfil inmunológico y relevancia en la respuesta antitumoral

Las células NK son linfocitos citotóxicos innatos claves en la vigilancia inmunitaria, capaces de eliminar células tumorales sin necesidad de sensibilización previa. A diferencia de los linfocitos T, no expresan TCR ni CD3, y su activación depende del equilibrio entre señales inhibitorias y activadoras. Su capacidad para reconocer células con baja expresión del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-I, del inglés Major Histocompatibility Complex class I) las convierte en actores fundamentales en el control tumoral ¹⁵.

En humanos, estas células se caracterizan fenotípicamente como CD3⁻CD56⁺, dividiéndose funcionalmente en los subtipos CD56^{bright} y CD56^{dim}. El marcador CD56, además de ser fenotípico, participa activamente en la diferenciación terminal de estas células ¹⁶.

La proporción de subtipos de células NK varía según el compartimento inmunológico en el que se encuentren. En la sangre periférica, la mayoría corresponde al subtipo CD56^{dim}, que representa cerca del 90% del total. En cambio, las CD56^{bright}, constituyen solo alrededor del 10% en este entorno. Esta relación se invierte en los órganos linfoides secundarios, como los ganglios linfáticos, donde las células CD56^{bright} son ampliamente predominantes, con porcentajes que oscilan entre el 75% y el 95% ¹⁷. Además de su distribución diferencial en los distintos compartimentos inmunológicos, los subtipos CD56^{dim} y CD56^{bright} presentan funciones diferentes. Las CD56^{dim} destacan por su alta capacidad citotóxica y por expresar niveles elevados de CD16 que les permite ejecutar la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, del inglés Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity) lo que las hace eficaces en la eliminación directa de las células diana, como las células infectadas o tumorales. En contraste, las CD56^{bright}, aunque con baja citotoxicidad natural, cumplen un papel inmunomodulador relevante gracias a su alta producción de citoquinas proinflamatorias (como IFN γ), especialmente tras la interacción con otras células inmunes como los monocitos ¹⁸.

Las células NK reconocen a las células tumorales mediante un mecanismo altamente regulado **Figura 1**, que depende de la interacción entre diversos ligandos expresados en las células diana y los receptores activadores e inhibitorios presentes en la membrana de las células NK. El segundo mecanismo de reconocimiento de las células diana es dependiente de anticuerpos (ADCC), en el cual las células NK reconocen células opsonizadas mediante anticuerpos IgG, a través del receptor Fc γ RIIIa (CD16). Estas interacciones activan las células NK ¹⁹. Una vez activadas, las células NK pueden eliminar a las células diana a través de dos mecanismos principales: El primero es la liberación de gránulos citotóxicos que contienen perforina y granzimas (gzms): la perforina forma poros en la membrana plasmática de la célula diana, permitiendo la entrada de las gzms, las cuales activan cascadas proteolíticas intracelulares que culminan en apoptosis. El segundo mecanismo implica la inducción de apoptosis mediada por receptores de muerte, mediante la expresión de ligandos como TRAIL y FasL, que se unen a sus respectivos receptores (TRAIL R1/R2 y CD95/Fas) presentes en la superficie de las células transformadas ^{20,21}.

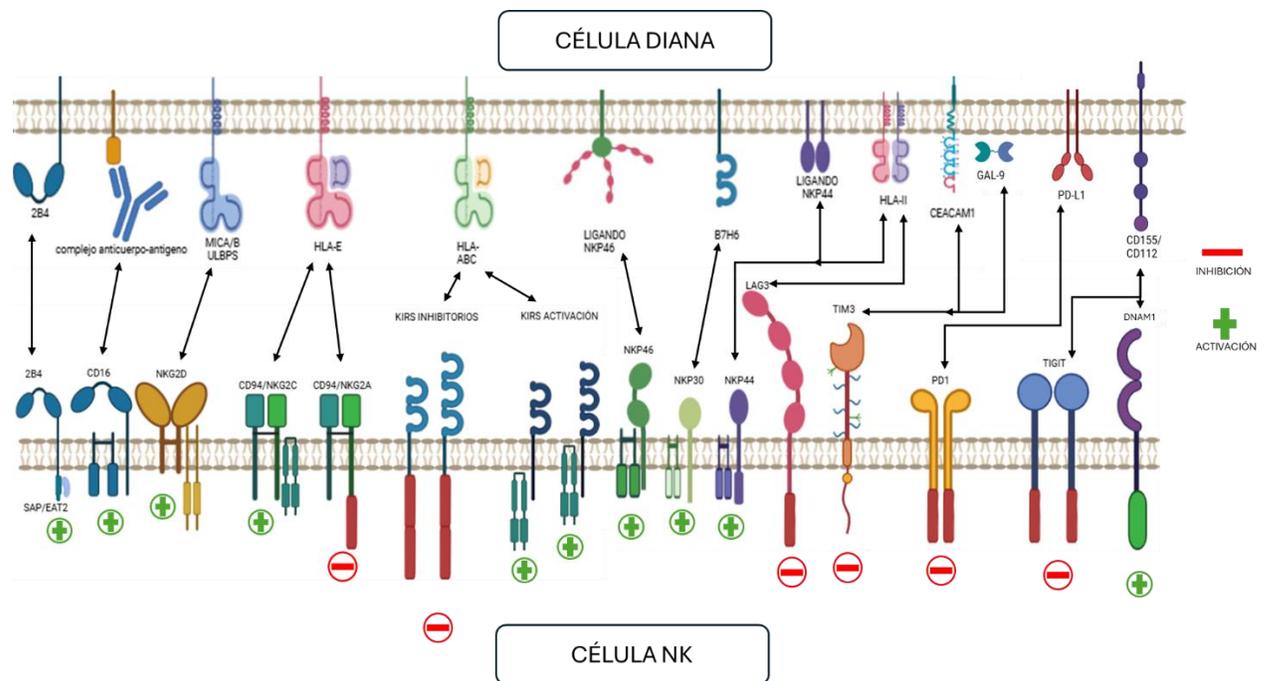


Figura 1. Representación gráfica del balance entre receptores y ligandos de activación e inhibición de célula NK y Diana, donde el signo (-) significa inhibición y el signo (+) activación. Modificado de Ramirez-Labrada et al. 2022²². Creado con BioRender.

1.2.1 Granzimas: características, funciones y relevancia

Las gzms son proteasas de serina contenidas en los gránulos citotóxicos de las células NK y los linfocitos T citotóxicos ²³, utilizadas para inducir la muerte de células diana, como las tumorales o infectadas. En las células NK, estos gránulos están preformados desde etapas tempranas de su desarrollo, lo que permite una respuesta inmediata tras el reconocimiento de la célula diana ²⁴.

En humanos, se han identificado cinco gzms funcionales: A, B, H, K y M, mientras que en ratones se han descrito once miembros activos (A, B, C, D, E, F, G, K, M, N y O) ²⁵. Todas las gzms comparten una tríada catalítica característica de las proteasas de serina, conformada por los residuos de histidina, ácido aspártico y serina **Figura2**. Estudios iniciales, realizados principalmente con proteínas purificadas, demostraron que las GzmA y B eran capaces de inducir la muerte celular mediante distintos mecanismos, principalmente diferenciados por la activación de caspasas en el caso de la GzmB y del complejo SET en el caso de la GzmA ^{23,26}. No obstante, investigaciones posteriores tanto en humanos como en modelos murinos con deleciones génicas revelaron que la GzmB posee una capacidad citotóxica significativamente superior, mientras que

dicha actividad es considerablemente reducida, y en algunos casos inexistente, en el caso de la GzmA ^{21,27,28}

Además de su función intracelular anteriormente mencionada, se ha demostrado que las gzms pueden ejercer otros efectos a nivel extracelular **Tabla1**, especialmente en contextos inflamatorios crónicos. Diversos estudios en modelos murinos in vivo, empleando tanto deleciones génicas como inhibidores farmacológicos, han evidenciado la participación de las gzms B, K y A en la exacerbación de múltiples enfermedades inflamatorias y autoinmunes. La gzmB ha sido implicada en dermatitis atópica, aterosclerosis, fibrosis cardíaca, enfermedades autoinmunes ampollosas, asma alérgica, enfermedad inflamatoria intestinal y diversos trastornos de cicatrización. La gzmK participa en dermatitis atópica y procesos de reparación tras lesiones térmicas. Por su parte la gzmA se ha relacionado con artritis reumatoide, colitis, sepsis abdominal y cáncer colorrectal asociado a colitis ²⁹.

Granzimas

	Granzima A	Granzima B
	PAR-1	Proteínas de unión celular
	Colágeno IV	$\alpha6\beta4$ Integrina
	Agregano	Colágeno XVII (BP180)
	uPA	Desmogleína-1,3
	Fibronectina	E-cadherina
	Receptor trombina	Filagrina
		JAM-A
		Occludina
		PECAM-1
		Unión estrecha derivada de células del epitelio pigmentario de la retina (RPE)
		VE-cadherina (CD144)
		ZO-1

Sustratos extracelulares

	Receptor acetilcolina	
	FGFR1 (CD331)	
	Receptor de glutamato neuronal 3	
	Notch1	
	PAR-1, PAR-2	
	Colágeno IV, VII	
	Fibrilina-1	
	Fibrinógeno	
	Fibronectina	
	Laminina-332, 511	
	Vitronectina	
	vWF	
	Decorina	
	Biglicano	
	β -glicano	
	Agrecano	
	Pro-IL-1 β	IL-1 α
	MBP	Pro-IL-18
	APE1	BID
	H1, H2B, H3	MCL1
	HMG2	Caspasa 3,7,8
	Lamina A/C	ICAD
	SET	DNA-PK
	Ku70	PARP
		NuMa
		Lamina B
		Rock II
		Alfa tubulina

*Sustratos
intracelulares*

Tabla 1. Clasificación de los sitios de acción de las gzm A y B según su localización intracelular o extracelular. Modificado de Bots et al. (2006) y Richardson et al. (2022)^{30,31}.

Recientemente, en un modelo murino de colitis y carcinogénesis inducido con DSS/AOM, Llipsy et al. 2020 demostraron que la ausencia o el bloqueo farmacológico de la GzmA extracelular disminuye la inflamación intestinal y frena tanto la iniciación del carcinoma colorrectal como la transición epitelio-mesenquimal ³².

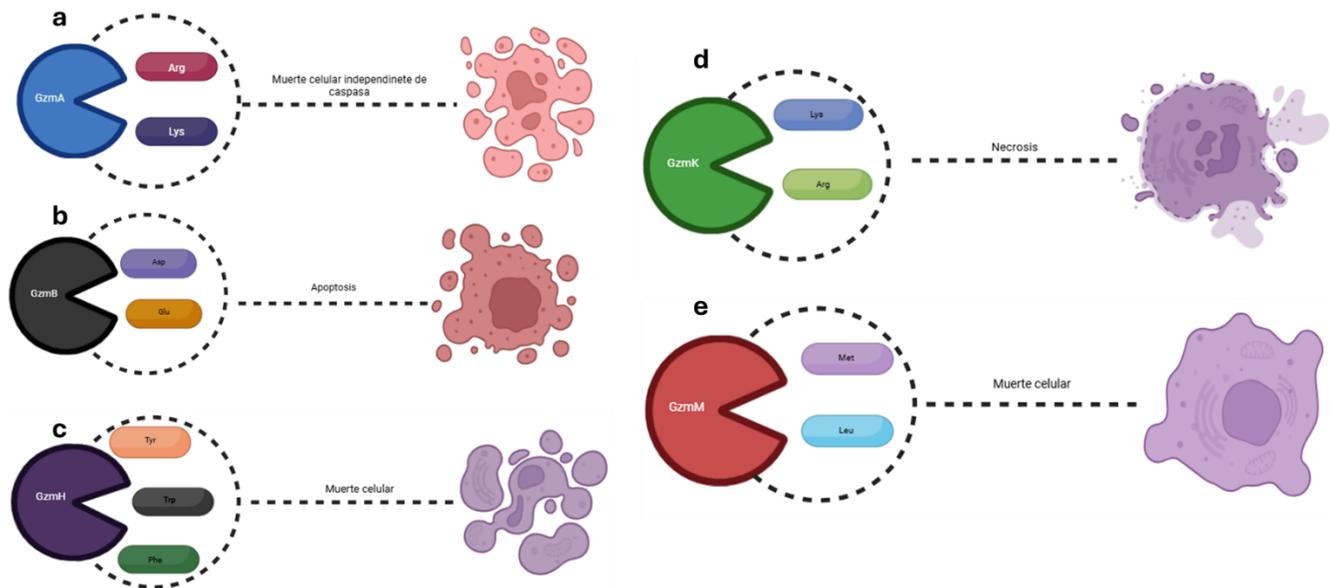


Figura 2. Especificidad de corte y tipos de muerte celular inducidos por gzm. En cada panel se muestra un esquema de la gzm (círculo coloreado) con sus residuos aminoacídicos preferidos en posición P₁ (óvalos), el tipo de muerte resultante y su morfología característica: (a) Gzm A (azul): reconoce Arg y Lys, induciendo muerte celular independiente de caspasas; (b) Gzm B (negro): escinde tras Asp y Glu, desencadenando apoptosis clásica; (c) Gzm H (púrpura): escinde Tyr, Trp y Phe, induciendo muerte celular; (d) Gzm K (verde): corta preferentemente Lys y Arg, promoviendo necrosis; (e) Gzm M (rojo): actúa sobre Met y Leu, provocando muerte celular. Modificado de Ramírez-Labrada et al. 2022³³. Creado con BioRender.

1.3 Neutrófilos asociados al tumor y su papel en la progresión neoplásica

Numerosos estudios han evidenciado que diversos tipos de cáncer pueden originarse a partir de focos de infección, o procesos inflamatorios crónicos ^{34–36}. En este contexto, el microambiente tumoral modulado en gran medida por células del sistema inmune innato como los

neutrófilos se reconoce actualmente como un componente esencial en la progresión neoplásica, favoreciendo la proliferación, supervivencia y diseminación de las células tumorales ³⁷.

En particular, los neutrófilos asociados al tumor (TAN) han sido implicados en múltiples mecanismos que favorecen el desarrollo y progresión de diversos tipos de neoplasias. Por ejemplo, en modelos murinos de linfoma T y carcinoma de células de Lewis (LLC), los oxisteroles inducen el reclutamiento de TAN, promoviendo el crecimiento tumoral y la angiogénesis ³⁸. Asimismo, en el hepatocarcinoma humano y murino, la secreción de CXCL5 por células tumorales estimula la transición epitelio mesenquimal (EMT), potenciando la capacidad invasiva del tumor y asociándose con mal pronóstico ^{39,40}. Factores como TNF- α ⁴¹, IL-17 ^{42,43} o HGF ^{44,45}, liberados por TAN en distintos modelos tumorales, han demostrado contribuir a la iniciación, crecimiento, invasión y migración tumoral. Además, enzimas como metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) ⁴⁶ y mediadores inmunosupresores como la arginasa 1 ⁴⁷, secretados por estos neutrófilos, facilitan la angiogénesis y la evasión de la respuesta inmunitaria, respectivamente.

Entre los principales moduladores de la actividad de los TAN en el microambiente tumoral, se encuentran diversas citoquinas inmunomoduladoras, destacándose el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) como una de las más relevantes. Esta molécula ejerce un papel crucial sobre múltiples tipos celulares, incluidos los neutrófilos infiltrados en el tumor, modulando significativamente su funcionalidad ⁴⁸.

En particular, el TGF- β actúa como un regulador proximal clave en la polarización de los (TAN), promoviendo su diferenciación hacia un fenotipo protumoral denominado N2, caracterizado por funciones inmunosupresoras, proangiogénicas y facilitadoras de la progresión tumoral. Por el contrario, estudios de laboratorio han demostrado que el bloqueo de la señalización mediada por TGF- β favorece la acumulación de TAN con fenotipo N1, los cuales presentan propiedades citotóxicas y actividad antitumoral ⁴⁹. Estos hallazgos sugieren que el TGF- β desempeña un papel central en la definición del fenotipo funcional de los TAN, inclinándolo su comportamiento hacia una función protumorigénica.

Además de las funciones proinflamatorias, proangiogénicas e inmunosupresoras descritas, los neutrófilos asociados al tumor también pueden ejercer efectos sobre el microambiente tumoral mediante la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) ⁵⁰. Este mecanismo,

conocido como NETosis, ha cobrado relevancia en los últimos años por su implicación en procesos como la promoción de metástasis, la evasión inmune y la remodelación del estroma tumoral.

1.4 Mecanismos de formación de NETs: Modalidades lítica y no lítica

Las NETs constituyen una estrategia efectora del sistema inmune innato, mediante la cual los neutrófilos liberan andamios compuestos por ADN descondensado en el espacio extracelular. Estas estructuras se forman en respuesta a diversos estímulos proinflamatorios, como la interleucina 8 (IL-8) o el éster de forbol miristato de acetato (PMA), y están recubiertas por enzimas citotóxicas y proteasas, entre las que se destacan la elastasa de neutrófilos (NE), la catelicidina, la catepsina G y la MMP **Figura3**. En conjunto, estos componentes permiten inmovilizar y eliminar patógenos, además de participar en procesos inflamatorios y de remodelación tisular ⁵¹.

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Brinkmann y colaboradores en 2004, quienes observaron que estas estructuras no solo atrapaban a los patógenos, sino que también degradaban factores de virulencia y facilitaban su eliminación. Además, identificaron la presencia abundante de NETs in vivo, en modelos experimentales de disentería y en casos de apendicitis humana espontánea, consolidando su rol como un componente clave de la respuesta inmune innata frente a procesos inflamatorios agudos ⁵².

La NETosis no es un proceso uniforme, sino que puede adoptar distintas modalidades en función del tipo y la intensidad del estímulo recibido. En este sentido, se han identificado al menos dos formas principales de formación de NETs: la NETosis “suicida” o lítica y la NETosis “vital” o no lítica cada una con características mecánicas y funcionales diferenciadas.

1.4.1 NETosis lítica

La NETosis lítica, también conocida como suicida, representa una de las principales formas mediante las cuales los neutrófilos liberan NETs en respuesta a diversos estímulos. PMA, IL-8 y los complejos inmunitarios han demostrado inducir este tipo de NETosis mediante la activación de la NADPH oxidasa (NOX) unida a membranas, lo que desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) ⁵³.

Entre la NETosis producida por IL-8 y PMA podemos encontrar diferencias, este último provoca principalmente una activación directamente de PKC (del inglés Protein kinase C). Esta

activación induce la formación y ensamblaje del complejo NADPH oxidasa, tanto en la membrana plasmática como en la membrana de los gránulos específicos del neutrófilo, lo que lleva a la producción de ROS extracelulares e intracelulares ⁵⁴⁻⁵⁵. En el caso de la IL-8, su interacción con los receptores CXCR1 y CXCR2 en la superficie del neutrófilo desencadena una cascada de señalización que involucra la activación de la tirosina quinasa esplénica (Syk). Esta quinasa es clave para la activación de MEK a través de TAK1 (Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase 1), permitiendo que la vía continúe de manera convergente con la inducida por PMA, culminando en la activación del complejo NADPH oxidasa (NOX) y la producción de ROS ^{56,57}.

Tras la acumulación de ROS, se produce la liberación de NE (elastasa de neutrófilos) y MPO (mieloperoxidasa) desde los azurosomos. Estas enzimas, junto con la peptidilarginina deiminasa 4 (PAD4), inducen la citrulinación de las histonas un proceso mediante el cual los residuos de arginina se convierten en citrulina, eliminando sus cargas positivas. Esta modificación epigenética facilita la descondensación de la cromatina. A continuación, se produce la ruptura de la envoltura nuclear, permitiendo que la cromatina descondensada y las proteínas nucleares se trasladen al citoplasma, donde interactúan con enzimas proteolíticas y péptidos antimicrobianos. Finalmente, la gasdermina D (GSDMD) facilita la ruptura de la membrana plasmática, permitiendo la liberación de NETs al espacio extracelular ⁵⁸.

1.4.2 NETosis no lítica o vital

No obstante, la formación de NETs no se limita exclusivamente al proceso lítico anteriormente descrito. En ciertos contextos fisiopatológicos, los neutrófilos pueden activarse mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), los cuales son detectados por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) localizados tanto en su superficie como en su interior ⁵⁹. Un ejemplo relevante es el lipopolisacárido (LPS), componente típico de bacterias gramnegativas, que es reconocido por el receptor TLR4 (receptor de tipo Toll). La unión de LPS a TLR4 induce la formación de NETs a través de al menos dos mecanismos diferentes. La unión directa a TLR4 en los neutrófilos y la unión a TLR4 en plaquetas. Sin embargo, mientras que la unión directa a neutrófilos induce NETosis lítica, la activación de las plaquetas favorece la interacción de estas con los neutrófilos y la liberación acelerada de NETs sin comprometer su viabilidad celular ^{60,61}. Además del LPS, otros estímulos moleculares pueden inducir NETosis a través de vías específicas: la proteína HMGB1 actúa mediante TLR2, TLR4, TLR9 y el receptor

RAGE; la flagelina, aunque clásicamente asociada a TLR5, requiere de la motilidad bacteriana para desencadenar NETosis de forma efectiva; las proteínas de choque térmico (HSPs) lo hacen a través de TLR2, TLR4 y CD91; y el fibrinógeno ejerce su acción mediante TLR4 e integrinas ^{62,63}. Este fenómeno destaca la importancia de la NETosis no lítica como una estrategia alternativa mediante la cual los neutrófilos expulsan su contenido extracelular manteniéndose funcionales, lo cual es esencial en escenarios que demandan una defensa antimicrobiana sostenida sin comprometer la disponibilidad de estas células.

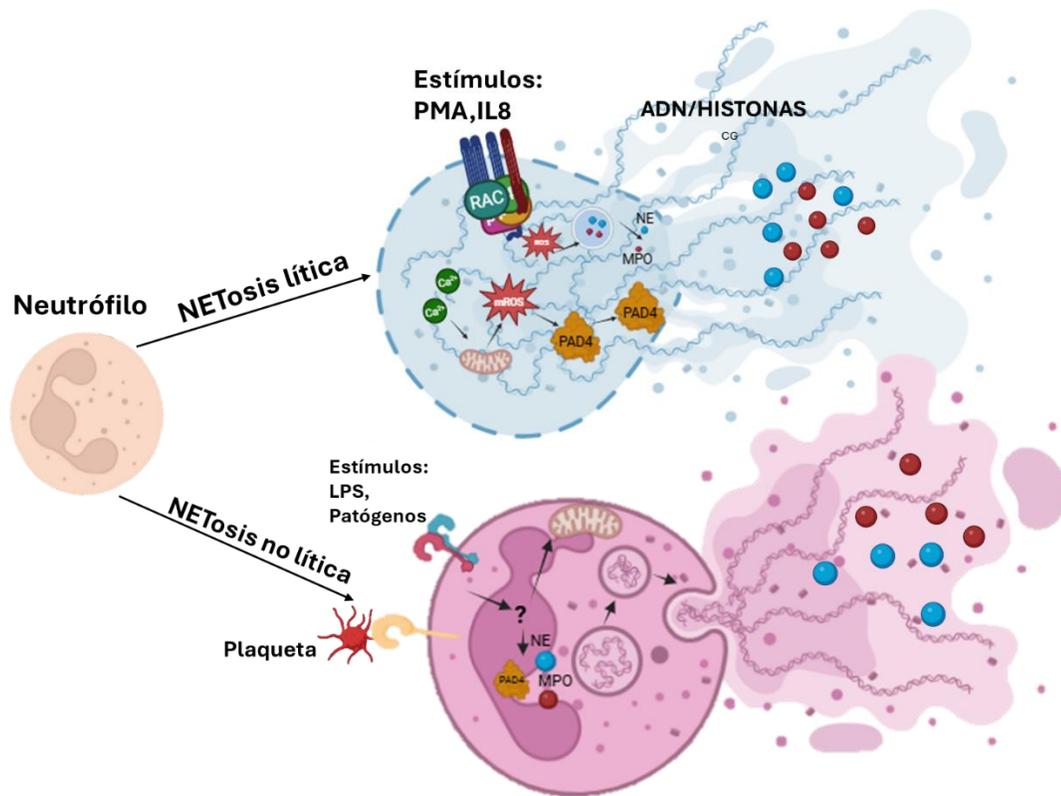


Figura 3. Mecanismos de NETosis lítica y no lítica en neutrófilos: Este esquema ilustra los dos modos principales de liberación de NETs. En la NETosis lítica, tras la estimulación con PMA o IL-8 se activa la NADPH oxidasa, ROS que promueven el reclutamiento de NE y MPO al núcleo, junto con la citrulinación de histonas por PAD4; como resultado, la cromatina se descondensa y finalmente la membrana celular se rompe para liberar una red de ADN, histonas y enzimas granulares. En la NETosis no lítica, inducida por LPS, patógenos o interacción con plaquetas, el neutrófilo expulsa fragmentos de cromatina y enzimas a través de vesículas o poros nucleares sin perder la integridad de su membrana, lo que le permite continuar funcionando tras la liberación de NETs. Las flechas señalan la secuencia de eventos desde el estímulo hasta la formación de la malla extracelular, destacando las diferencias en la integridad celular final. Modificado de Wang et al. 2024 ⁶⁴. creado con BioRender.

1.5 NETs como promotoras de la progresión tumoral

Además de su función defensiva frente a patógenos, las NETs han sido implicadas en la progresión del cáncer. En un estudio con pacientes con cáncer colorrectal metastásico, el aumento

postoperatorio de NETs se asoció con una menor supervivencia libre de enfermedad, y en modelos murinos, este efecto fue revertido mediante la inhibición de PAD4 o el tratamiento con DNasa ⁶⁵.

Este fenómeno se ha relacionado con la producción de IL-8 por parte de las células tumorales, como se observó en el HCC, donde dicha citoquina induce la formación de NETs, promoviendo la invasividad, la metástasis y un peor pronóstico. Estos efectos fueron evidenciados mediante la detección de biomarcadores como MPO-DNA y H3cit ⁶⁶. Además, esta progresión parece estar mediada por la activación de las vías TLR4/9-COX2, el aumento de catepsina G y la oxidación del ADN mitocondrial ^{65,66}. Por otro lado, IL-8 también se ha implicado en la inducción de NETs que favorecen la progresión difusa del linfoma de células B grandes a través de la señalización TLR9 ⁶⁷.

Asimismo, se ha observado que las NETs y el factor de transcripción NF- κ B cooperan para favorecer la progresión y metástasis en el cáncer de mama, como se evidenció mediante el uso de un péptido que interrumpe la interacción entre NEMO e IKK α/β mediada por NETs, bloqueando así la activación de NF- κ B *in vitro*. Además, el bloqueo de la formación de NETs mediante un inhibidor de PAD4 disminuyó tanto la activación de NF- κ B como la metástasis tumoral ⁶⁸. Estudios *in vitro* han demostrado que la formación de NETs estimula la invasión y migración de células de cáncer de mama, mientras que la inhibición de su formación o su digestión mediante DNasa I bloquea estos procesos. Asimismo, en modelos murinos, el tratamiento con nanopartículas recubiertas de DNasa I logró reducir significativamente las metástasis pulmonares ⁶⁹.

Finalmente, la compleja interacción entre el tumor y su microambiente también impacta a los neutrófilos en favor del crecimiento tumoral. Se ha demostrado que los tumores, mediante la liberación de G-CSF al torrente sanguíneo, inducen la formación de NETs por neutrófilos circulantes, favoreciendo así su acumulación intratumoral y proporcionando una ventaja de crecimiento para el tumor ⁷⁰.

1.6 Las NETs como moduladores de la respuesta citotóxica de las células NK en el contexto tumoral

La capacidad citotóxica de las células T CD8⁺ y NK es crucial para el control tumoral. Sin embargo, las NETs también pueden interferir en este mecanismo de defensa. Se ha descrito en un modelo 3D, que las NETs pueden envolver y recubrir las células tumorales, actuando como una barrera física que impide el contacto entre las células inmunitarias citotóxicas, como los linfocitos

T CD8⁺ y las células NK, y las células diana, protegiendo así al tumor de la citotoxicidad mediada por estas células ⁷¹.

Además, se ha observado que las NETs pueden inhibir la citotoxicidad de las células NK al reducir la expresión de gzm B. Esto se corroboró en un estudio mediante análisis de RT-qPCR, donde las células NK-92 cultivadas en presencia de NETs mostraron una disminución significativa en la expresión de GZMB y un leve aumento en la de IL-15, en comparación con las células NK-92 cultivadas de forma individual, indicando una supresión de su capacidad citotóxica mediada por las NETs ⁷².

Asimismo, las NETs pueden comprometer directamente la función de células T y NK a través de proteasas como NE, MPO y polipéptidos catiónicos. En modelos murinos de gota, la formación de NETs alrededor de cristales de urato ha evidenciado su capacidad para degradar proteolíticamente citoquinas proinflamatorias ⁷³. Asimismo, se ha propuesto que los genes relacionados con la formación de NETs podrían modular la respuesta inmunitaria al influir en la expresión de moléculas como LGALS9, CEACAM1 y TNFSF13B, afectando potencialmente la interacción con células NK ⁷⁴.

Otro mecanismo por el que las NETs afectan la función de células NK es la presencia de proteasas específicas en las NETs, como la catépsina G (CG), que han demostrado impactar directamente a las células NK. Estudios cinéticos evidenciaron que la exposición a CG reduce significativamente la expresión de NKp46 en células NK humanas de sangre periférica ⁷⁵.

Finalmente, se ha observado que diversos factores quimiotácticos, particularmente agonistas de los receptores CXCR1 y CXCR2, promueven la formación de NETs por neutrófilos y células supresoras de linaje mieloide las cuales impiden el reconocimiento y la destrucción por parte de linfocitos T citotóxicos y células NK. Estas NETs facilitan la evasión inmunitaria y contribuyen al desarrollo de metástasis y a la resistencia a inmunoterapia ⁷¹.

Estos datos refuerzan la noción de que las NETs representan un mecanismo multifacético mediante el cual los tumores pueden escapar de la vigilancia inmunitaria, subrayando su relevancia como potenciales dianas terapéuticas.

2 HIPÓTESIS

Las células NK desempeñan un papel clave en la respuesta inmunitaria antitumoral; sin embargo, su función puede verse afectada por las NETs, que actúan como barrera física y funcional. Dado que la grzm A, tiene capacidad para degradar proteínas como las histonas presentes en las NETs, se plantea que esta enzima podría contrarrestar el efecto inhibitorio de las NETs, restaurando así la citotoxicidad de las células NK frente a células tumorales.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Evaluar el impacto de las NETs sobre la citotoxicidad de células NK en modelos tumorales 2D y 3D, y determinar si la granzima A es capaz de interferir con la formación de la NETs y, por tanto, favorecer la restauración de la función citotóxica de las células NK.

3.2 Objetivos específicos:

- 1- Comparar el efecto inmunosupresor de las NETs sobre la función citotóxica de las células NK entre los modelos bidimensionales y tridimensionales.
- 2- Evaluar si el tratamiento con granzima A revierte la inhibición inducida por las NETs sobre la citotoxicidad de las células NK.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cultivo celular

4.1.1 Líneas celulares

En el presente trabajo se utilizaron las líneas celulares HCT116 y HT-29, las cuales fueron transfectadas con la proteína fluorescente GFP del inglés (Green Fluorescent Protein). Esta proteína presenta un pico de excitación a aproximadamente 488 nm y emite fluorescencia con un máximo en torno a los 509 nm, lo que permite su detección y seguimiento mediante técnicas como la microscopía de fluorescencia o la citometría de flujo.

Además de las líneas celulares previamente mencionadas, se emplearon células primarias obtenidas a partir de leucopacks proporcionados por el Banco de Tejidos y Sangre de Aragón. A partir de estas muestras se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y neutrófilos, los cuales fueron mantenidos en cultivo bajo condiciones controladas tras su obtención.

4.1.2 Condiciones de cultivo

Las células HT-29 y HCT-116 se mantuvieron en cultivo en frascos de 25 cm² (T25), en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), enriquecido con un 10 % de suero bovino fetal (SBF), 5 mL/L de GlutaMAX™, y antibióticos (penicilina/estreptomicina) a una concentración final estándar de 1 %. Las células fueron cultivadas en condiciones de esterilidad a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO₂.

Las células se subcultivaron de forma rutinaria cada 2 a 3 días, dependiendo del grado de confluencia observado al microscopio. Para el desprendimiento de las células adherentes (HT-29 y HCT-116), se utilizó una solución de tripsina-EDTA al 0,25 % (Gibco), previamente atemperada a 37 °C. Tras la aspiración del medio, se lavaron con PBS y se añadió la tripsina directamente sobre el monocapa celular, incubándose durante 5 minutos a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ para favorecer el desprendimiento celular.

Finalizada la incubación, la tripsina fue neutralizada mediante la adición de medio DMEM suplementado. La suspensión celular obtenida se transfirió a tubos Falcon de 15 mL estériles y se centrifugó a 330xg durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado, el pellet

celular fue resuspendido en medio fresco y las células se contaron para su posterior resiembra según los requerimientos experimentales.

Todas las manipulaciones se llevaron a cabo en una cabina de seguridad biológica tipo II, bajo condiciones estériles.

4.1.3 Evaluación de la viabilidad y conteo celular

Para determinar el número de células y evaluar su viabilidad, se procedió a mezclar la suspensión celular con azul de tripano en una proporción 1:1. Esta tinción permite distinguir entre células viables y no viables basándose en la integridad de la membrana plasmática. Las células viables, con membrana intacta, excluyen el colorante y permanecen incoloras, mientras que las células no viables, con membrana dañada, incorporan el colorante y adquieren una coloración azul.

Posteriormente, se cargaron 10 μ L de la mezcla en una cámara de Neubauer, evitando la formación de burbujas. El conteo celular se realizó mediante microscopía óptica a 10x de aumento, examinando los cuatro cuadrantes centrales de la cámara.

4.1.4 Crioconservación de líneas celulares

Las células en fase logarítmica de crecimiento fueron tripsinizadas, centrifugadas a 330xg durante 5 minutos y resuspendidas en SFB al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). El DMSO funcionó como crioprotector activo, penetrando en las células y previniendo la formación de cristales de hielo intracelulares.

Previo a la congelación, se verificó la viabilidad celular mediante tinción con azul de tripano. Este protocolo de criopreservación permitió mantener las características originales de las líneas celulares, asegurando su disponibilidad para futuros experimentos sin la necesidad de realizar numerosos pases in vitro. Para la recuperación de las células criopreservadas, se siguió un protocolo de descongelación rápida. El medio DMEM completo fue atemperado a 37°C en baño María. Posteriormente, se realizaron lavados repetidos para eliminar el DMSO residual, asegurando la viabilidad celular antes de proceder con el cultivo.

4.1.5 Citometría de flujo

Para la citometría de flujo realizada en este trabajo, las células fueron resuspendidas en el tampón de citometría con los anticuerpos específicos a utilizar, a una dilución de 1:50.

Las células fueron incubadas con los anticuerpos durante 20 minutos a 4°C, en condiciones oscuras para evitar la fotodegradación de los fluorocromos. Después de la incubación, se realizaron dos lavados adicionales con solución tampón de citometría para eliminar el exceso de anticuerpos no unidos. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en el tampón para su análisis en el citómetro de flujo.

Es importante señalar que, para prevenir uniones inespecíficas, se utilizó un anticuerpo bloqueador de fragmento cristalizante (Fc) en todos los pocillos antes de añadir los anticuerpos primarios, asegurando así la precisión y fiabilidad de los resultados obtenidos en el análisis de citometría.

En las células HT-29 se evaluaron diversas proteínas de superficie implicadas en la regulación de la respuesta inmune antitumoral. Entre ellas se incluyó B7 homolog 6 (B7-H6), una proteína asociada con la activación de células NK; (ICAM-I), del inglés intercellular adhesion molecule I, que participa en la adhesión entre células inmunes y tumorales; (ULBP3) del inglés UL16 binding protein 3 y el grupo conformado por UL16 2, 5 y 6 (ULBP-2, ULBP-5, ULBP-6), todas ellas ligandos de los receptores NKG2D en células NK. También se analizó la expresión de (PD-L1) del inglés programmed death ligand 1, conocido por su papel en la evasión inmune mediante la inhibición de la activación de linfocitos T.

Adicionalmente, se incluyeron moléculas asociadas al estrés y al reconocimiento inmunológico, como MICA/B (moléculas de estrés del MHC clase I), así como otras del complejo mayor de histocompatibilidad: MHC clase I clásicas (HLA-ABC y no clásicas (HLA-E, -G), y MHC clase II (HLA-DR), las cuales cumplen funciones relevantes en el reconocimiento y evasión inmune tumoral.

Finalmente, se analizaron otras moléculas inmunomoduladoras como (CD47) del inglés clúster of differentiation 47, CD155 involucrada en la interacción con receptores activadores e inhibidores de células NK; y calreticulina (CALR), una proteína asociada a la inmunogenicidad de la muerte celular tumoral.

Todos los anticuerpos son de Miltenyi Biotec®, a excepción del anticuerpo anti-CD-47, que es de R&D Systems®, y el anticuerpo anti-CALR, que es de Abcam.

4.1.6 Aislamiento de PBMCs

Dado que el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), es un paso fundamental para la posterior obtención de células NK, se procedió a la separación de (PBMCs). Para esto se mezclaron 2 mL de sangre del leucopack con 10 mL de PBS a temperatura ambiente en un tubo falcón de 15 mL. Esta mezcla se añadió cuidadosamente sobre 15 mL de Histopaque® 1077 (Ficoll) a temperatura ambiente en un tubo cónico de 50 mL, procurando no mezclar las fases debido a su diferencia de densidad.

La muestra fue centrifugada a 450xg durante 20 minutos a temperatura ambiente, sin aceleración y desaceleración. Tras la centrifugación, se recuperó el anillo de células formado en la interfase entre las fases acuosa y de Ficoll, el cual contiene las PBMCs. Este anillo fue transferido con precaución para evitar arrastrar células de otras fracciones.

Las células fueron resuspendidas en medio RPMI sin suplementar, centrifugadas nuevamente a 330xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, y finalmente resuspendidas para su posterior recuento y utilización experimental.

4.1.7 Activación y purificación de células NK

Tras el aislamiento de las PBMCs, se procedió a la siembra de 4×10^7 células en 20 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% y GlutaMAX™, omitiendo el uso de antibióticos para no interferir con la activación celular.

Para dicha activación, se añadieron 2 µL de IL-2, a partir de un stock concentrado de 10^5 µg/mL, y 1 µL de IL-15, a partir de un stock de 1000 µg/mL. Las interleucinas fueron refrescadas cada 3 días hasta el momento de la purificación celular. Las células se mantuvieron en cultivo durante un periodo de 7 días a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂, con el objetivo de inducir la activación de células NK mediante estimulación con citoquinas.

La separación de las células NK se realizó mediante la tecnología MACS™ del inglés (Magnetic Activated Cell Sorting), un método basado en la separación inmunomagnética de células a través del reconocimiento de marcadores específicos de superficie. Para este procedimiento se emplearon anti CD56 MicroBeads humanos (Miltenyi Biotec®), diseñados para unirse específicamente al antígeno CD56, altamente expresado en las células NK.

Estas microesferas están compuestas por nanopartículas magnéticas recubiertas con anticuerpos monoclonales, lo que permite dirigir las hacia las células diana. Una vez marcadas, las células pueden ser posteriormente separadas del resto de la población celular mediante la aplicación de un campo magnético.

Tras la activación durante el tiempo previamente mencionado, las células PBMCs fueron sometidas a su marcaje utilizando anti CD56 MicroBeads. Para ello, se centrifugaron las células a 330xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió el pellet en 80 μ L de medio MACS™ y 20 μ L de anti CD56 MicroBeads por cada 10 millones de células, manteniendo siempre el medio frío para evitar que se active durante el proceso. La suspensión celular marcada se incubó durante 15 minutos a 4 °C para asegurar que los microbeads se unieran específicamente a las células CD56⁺.

Después de la incubación, se añadió medio MACS™ hasta completar 15 mL y se centrifugó nuevamente a 330xg durante 5 minutos. El pellet resultante fue resuspendido en 1 mL de medio MACS™ por cada 10 millones de células. A continuación, se prepararon las columnas de purificación LS de Miltenyi Biotec®, colocando el imán en la campana de flujo laminar. Se añadió medio MACS™ a las columnas para humedecerlas antes de aplicar la muestra. La suspensión celular marcada se añadió a las columnas y, después de lavar el frasco de la muestra con medio MACS™, el líquido restante se pasó por la columna. Este proceso de lavado se repitió dos veces para asegurar una limpieza adecuada.

Una vez completado el lavado, se añadió medio MACS™ adicional para el eluido, y las células CD56⁺ purificadas fueron recuperadas. Las columnas fueron retiradas del imán y el eluido fue recogido en un falcón de 15mL. Posteriormente, se centrifugaron las células a 330xg durante 5 minutos a temperatura ambiente y el pellet resultante fue resuspendido en medio RPMI suplementado con SFB al 10% y GlutaMAX™ para su posterior conteo.

4.1.8 Aislamiento de neutrófilos

Para el aislamiento de neutrófilos a partir de leucopacks, se mezclaron 5 mL de sangre con 15 mL de PBS a temperatura ambiente en un tubo falcón de 50 mL. Posteriormente, se añadieron 20 mL de esta mezcla a 20 mL de una solución de dextrano al 6% en NaCl al 0.9%, dejándose reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir la sedimentación de eritrocitos.

Tras el reposo, se recuperaron cuidadosamente 15 mL del sobrenadante y se centrifugaron en tubos falcón de 50 mL a 330xg durante 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue eliminado con precaución y el pellet obtenido fue resuspendido en 5 mL de tampón de lisis de eritrocitos humanos, incubando la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.

La reacción de lisis se detuvo añadiendo 45 mL de PBS a temperatura ambiente, seguida de una centrifugación a 330xg durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 3 mL de PBS y se aplicó cuidadosamente sobre 5 mL de Histopaque® 1077 en un tubo falcón de 15 mL.

La mezcla fue centrifugada a 450xg durante 30 minutos a temperatura ambiente, sin aceleración y desaceleración, para separar los granulocitos por densidad. Tras la centrifugación, se eliminó el anillo de PBMCs y el sobrenadante, conservando el pellet compuesto principalmente por granulocitos. Finalmente, este pellet se resuspendió en medio DMEM sin suplementar, se centrifugó nuevamente a 330xg por 5 minutos y se resuspendió para su posterior recuento y uso experimental.

4.1.9 Formación de esferoides

Para la generación de esferoides tumorales se empleó metilcelulosa, un polímero derivado de la celulosa que actúa como agente espesante y gelificante. Esta característica favorece la agregación celular y la formación de estructuras tridimensionales más representativas del entorno tumoral in vivo. La mezcla utilizada consistió en un 20% de metilcelulosa y un 80% de medio DMEM.

Tras levantar y contar las células según el procedimiento previamente descrito, se calcularon los volúmenes necesarios para formar esferoides de aproximadamente 5000 células cada uno. La suspensión celular se mezcló con la metilcelulosa y se aplicó mediante la técnica de gota invertida sobre la tapa de una placa de Petri. En la base de la placa se colocó una capa de PBS estéril, con el fin de mantener la humedad y evitar la deshidratación de las gotas durante la incubación. Las tapas con las gotas se invirtieron cuidadosamente y se incubaron a 37 °C con 5% de CO₂ durante 3 días, tras lo cual los esferoides se utilizaron para los experimentos correspondientes.

4.1.10 Ensayos de citotoxicidad

Se realizaron ensayos de citotoxicidad con el objetivo de evaluar la eficacia de las células NK en la inducción de muerte celular sobre células tumorales, tanto en cultivos bidimensionales (2D) como tridimensionales (3D). Para ello, se establecieron distintas condiciones experimentales en las que se usaron diferentes ratios de células NK y células tumorales. Las condiciones evaluadas fueron: células tumorales con células NK (tumoral:NK), células tumorales con NETs y células NK (tumoral:NETs:NK), y células tumorales con NETs, células NK y gzm A (tumoral:NETs:NK:GzmA). Estas condiciones permitieron estudiar no solo el efecto directo de las células NK sobre las células tumorales, sino también su actividad citotóxica en presencia de Nets y gzm A.

Para el desarrollo del ensayo de citotoxicidad en cultivos 2D, se sembraron 5.000 células tumorales por pocillo, o bien un esferoide en caso de cultivos 3D, en 100 μ L de medio DMEM completo en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ hasta el día siguiente para permitir la adherencia o estabilización de los esferoides.

Al día siguiente, se retiró cuidadosamente el medio y se añadieron 60.000 neutrófilos por pocillo en 100 μ L de medio DMEM. Los neutrófilos utilizados fueron siempre recién aislados el mismo día del experimento. Una vez añadidos, se dejó reposar la placa durante 20 minutos a 37 °C con 5% de CO₂, con el fin de permitir que los neutrófilos se asentaran adecuadamente.

Posteriormente, se estimuló la formación de NETs mediante la adición de IL-8 a una concentración final de 100 ng/mL. Tras una hora de incubación, se añadió gzm A (GzmA) a una concentración final de 20 μ g/mL. Se completó el volumen a 150 μ L con medio DMEM sin suero ni aditivos y se dejó incubar toda la noche.

Al día siguiente, se añadieron células NK purificadas en 50 μ L de medio DMEM, ajustando su concentración para alcanzar distintos ratios efector: diana (E:T), concretamente 1:1, 2:1, 4:1 y 5:1, manteniendo constante el número de células tumorales.

La dinámica de citotoxicidad fue evaluada mediante el sistema Incucyte, realizando escaneos automáticos cada 6 horas durante un período de 48 horas y cuantificando la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP (*Green Fluorescent Protein*).

4.1.11 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico y tratamiento de los datos obtenidos en los ensayos, se utilizó el software GraphPad Prism versión 8.0.2. Los resultados fueron representados gráficamente teniendo en cuenta la media aritmética y su correspondiente desviación estándar, con el fin de mostrar la variabilidad de los datos y permitir una interpretación clara de los datos obtenidos.

Para comparar las diferencias entre los grupos experimentales, se aplicaron pruebas de análisis de varianza (ANOVA) del inglés Analysis of Variance y la prueba t de Student, lo que permitió determinar la significancia estadística entre las condiciones múltiples. Además, se calcularon las áreas bajo la curva (AUC) para evaluar de forma integrada la eficacia citotóxica a lo largo del tiempo.

4.1.12 Análisis bioinformático de NE

Obtuvimos la secuencia completa en formato FASTA de PD-L1 desde UniProt, extrayendo los residuos 19–238, que conforman el ectodominio de PD-L1, a continuación, empleamos PeptideCutter (Expasy) para predecir los posibles sitios de escisión por parte de NE y posterior a ello se verificó en NetSurfP-3.0 la accesibilidad de superficie relativa RSA del inglés Relative Surface Accessibility, la cual cuantifica cuánto queda expuesto al disolvente un residuo de aminoácido en una proteína, en comparación con su exposición máxima posible.

5 RESULTADOS.

5.1 Inhibición de la actividad citotóxica de células NK por NETs en modelos bidimensionales

Con el objetivo de evaluar el efecto de las NETs sobre la actividad citotóxica de células NK frente a líneas tumorales, se llevaron a cabo co-cultivos en modelos bidimensionales utilizando las líneas celulares HT-29 y HCT-116, representativas del carcinoma colorrectal. Los ensayos se realizaron con células NK activadas durante 7 días con IL2 e IL15 y posteriormente purificadas mediante selección magnética. La citotoxicidad se realiza con relaciones efectora:diana de 1:1 para las HT-29 y 4:1 para las HCT-116. Se usaron estas ratios diferentes ya que en ensayos preliminares observamos que estos ratios mostraban niveles de citotoxicidad comparables entre las dos líneas. La muerte celular inducida por las células NK se monitoreó durante 36 horas mediante el sistema Incucyte® mediante la determinación de la pérdida de fluorescencia de GFP, permitiendo evaluar la cinética de la citotoxicidad en condiciones basales al incubarlas con células NK y tras la exposición a NETs.

En el modelo HT-29 (relación 1:1) **Figura 4a**, las células NK demostraron una potente actividad citotóxica desde las primeras horas del co-cultivo, con un incremento progresivo y sostenido de la muerte celular, alcanzando valores cercanos al 80% a las 36 horas. En contraste, cuando las células NK fueron expuestas previamente a NETs (condición NK-NETs), se observó una inhibición marcada de su capacidad citotóxica, evidenciándose diferencias estadísticamente significativas en todos los puntos temporales analizados. El perfil de muerte celular en esta condición se mantuvo cercano a los niveles basales observados en el grupo control, sin incremento relevante.

Al realizar el ensayo con las células HCT-116, estas mostraron ser más resistentes a las células NK como ya comentamos por lo que usamos un ratio superior (4:1). De manera similar, en el modelo HCT-116 **Figura 4b**, las células NK también indujeron una muerte celular progresiva desde las primeras horas. En esta línea tumoral, la presencia de NETs, aunque redujo de forma significativa la citotoxicidad de las células NK, el efecto no fue tan marcado como con la línea celular HT-29. Aunque esto podría deberse a la mayor proporción de células NK usado.

Con el fin de cuantificar globalmente la eficacia citotóxica a lo largo del tiempo y comparar las condiciones experimentales de forma general, se calculó el AUC para cada experimento. En la línea HT-29 **Figura 4c**, las células NK no tratadas presentaron un AUC significativamente mayor que las NK expuestas a NETs, reflejando una pérdida sustancial de su actividad efectora. Este patrón se replicó en la línea HCT-116 **Figura 4d**, donde también se observó una reducción del AUC en presencia de NETs, aunque no al mismo nivel de las células HT-29, confirmando el efecto inmunosupresor de estas estructuras sobre la función de las células NK en ambos modelos tumorales, aunque mostrando una clara diferencia entre los dos modelos.

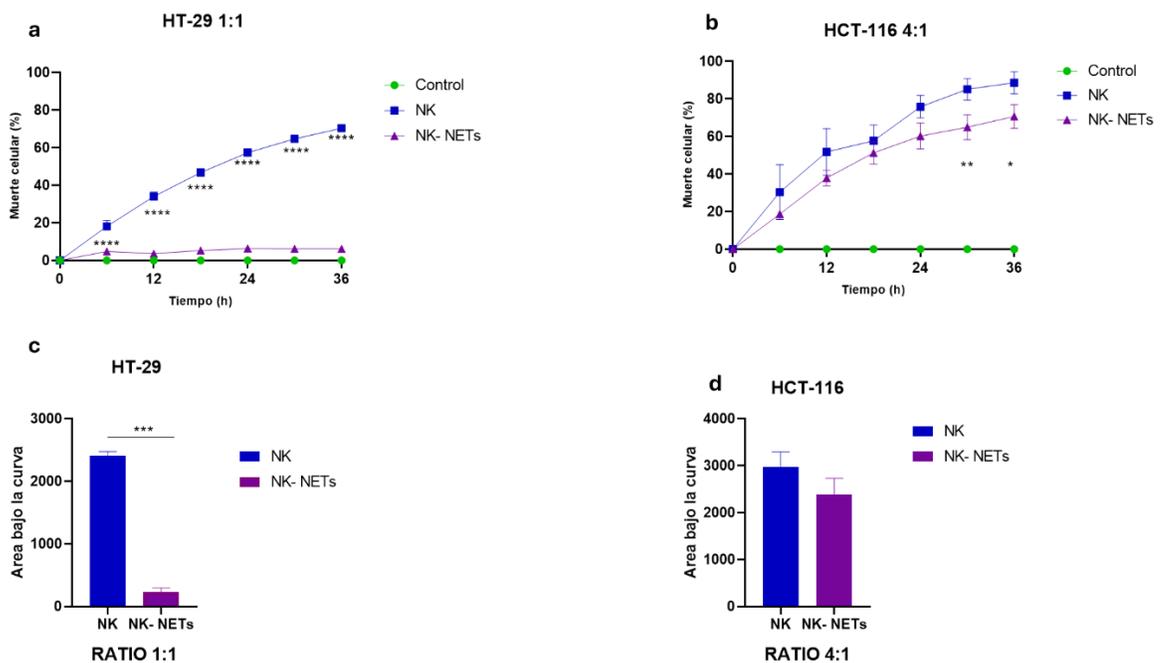


Figura 4. Inhibición de la citotoxicidad de células NK por NETs en cultivos bidimensionales: Células HT-29 (ratio NK:Diana 1:1; a, c) y HCT-116 (ratio 4:1; b, d) fueron co-cultivadas con células NK en ausencia o en presencia de NETs, junto con un control sin NK. (a, b), (c, d) AUC de la citotoxicidad acumulada en cada modelo. Se evaluó la cinética de muerte celular medida cada 6h mediante Incucyte cuantificando la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP y fue expresada como porcentaje de células muertas. En todos los casos, los valores P estadísticamente significativos se indican en los gráficos de la siguiente forma *, $P < 0.1$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$; $n = 6$.

En conjunto, estos resultados indican que las NETs interfieren de manera significativa con la capacidad citotóxica de las células NK en modelos 2D de cáncer colorrectal, limitando su eficacia y aunque este efecto fue mayor a ratios de células NK bajos se mantuvo incluso en condiciones con un número elevado de células efectoras. La reducción tanto en la cinética de muerte celular como en el AUC, mantenida hasta 36 horas, respalda la hipótesis de que las NETs

actúan como un mecanismo de evasión tumoral al suprimir la respuesta inmunitaria innata mediada por células NK.

5.1.1 Evaluación de la influencia de la granzima A sobre la función citotóxica de células NK expuestas a NETs

Con la finalidad de explorar si la actividad inmunosupresora de las NETs sobre las células NK podía ser revertida, se diseñó un experimento complementario en el que se incorporó GzmA como agente restaurador de la función efectora. En este enfoque, las células tumorales fueron expuestas inicialmente a NETs, como en los experimentos anteriores, y posteriormente tratadas con GzmA para analizar el potencial efecto de esta proteasa sobre las NETs. Posteriormente se añadieron las células NK y se analizó la citotoxicidad mediante el IncuCyte como en los ensayos anteriores. La duración del experimento se extendió durante 48.

En el modelo HT-29 ratio 1:1 **Figura 5a**, se confirmó que la exposición a NETs indujo una inhibición significativa de la actividad citotóxica de las células NK, en concordancia con los resultados anteriores. Al adicionar GzmA al cocultivo con NK, no se observó ningún tipo de alteración de la muerte celular inducidas por NK, comparable con la condición NK:Diana. La incorporación de GzmA (condición NK-NETs+GzmA) provocó un aumento notable en la muerte celular inducida por las células NK, duplicando aproximadamente los niveles observados en ausencia de GzmA. Aunque esta recuperación fue elevada, la citotoxicidad por las células NK no alcanzó los valores observados en ausencia de NETs, observándose solo un efecto parcial. Este resultado sugiere que GzmA puede contrarrestar en cierta medida el efecto inmunosupresor de las NETs, aunque sin lograr una reversión completa.

En el modelo HCT-116 ratio 4:1 **Figura 5b**, Al incluir GzmA en el cocultivo con células NK, no se detectaron cambios significativos en la muerte celular inducida por NK, manteniéndose comparable a la condición NK:diana. Se confirmó nuevamente el efecto de las NETs inhibiendo la citotoxicidad de las NK, aunque el efecto fue elevado, no fue tan marcado como en el caso de las células HT-29. Esto podría atribuirse al ratio efector:diana utilizado. Ya que estas células al ser más resistentes al efecto de las células NK se necesitó un ratio más alto y en estas condiciones las NETs parecen tener un efecto más leve. No obstante, la adición de GzmA permitió recuperar parte de la capacidad citotóxica, confirmándose los resultados observados en la línea HT-29.

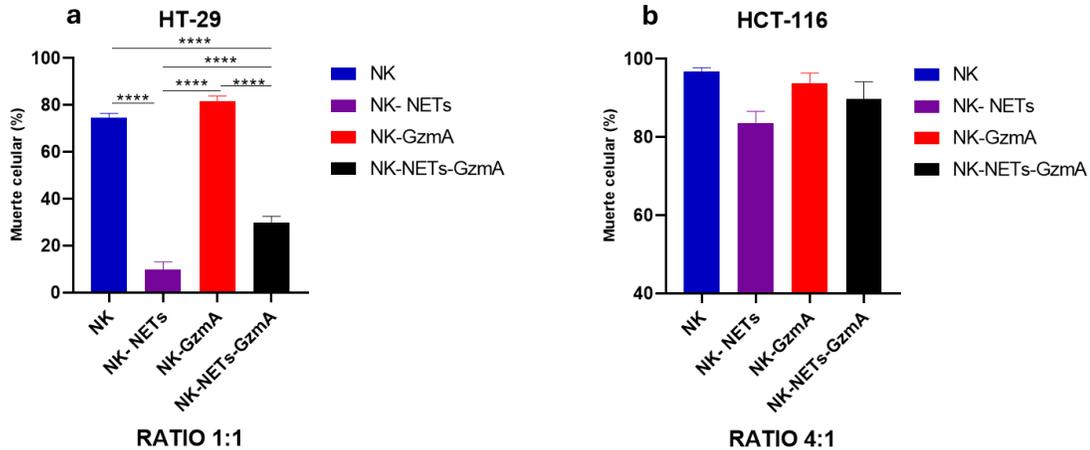


Figura 5. Papel de la GzmA en la citotoxicidad de las células NK en presencia de NETs en cultivos 2D: Células HT-29 (ratio NK:Diana 1:1; a) y HCT-116 (ratio 4:1; b) fueron cocultivadas durante 48 h con células NK en ausencia o presencia de NETs, y en el caso de “NK + GzmA” y “NK + NETs + GzmA” se añadió GzmA exógena tras la inducción de NETs. La muerte celular se evaluó al final de las 48 h de incubación y mediante Incucyte se cuantificó la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP y fue expresada como porcentaje de células muertas. En todos los casos, los valores P estadísticamente significativos se indican en los gráficos de la siguiente forma; ****, $P < 0.0001$; $n = 6$.

5.2 Impacto de las NETs en la citotoxicidad de células NK en esferoides tumorales HT-29

Para evaluar con mayor profundidad la influencia de las NETs sobre la citotoxicidad ejercida por células NK decidimos utilizar modelo tridimensional que simule con mayor fidelidad las características tumorales. Para esto, se utilizó un modelo de esferoides generados a partir de la línea celular HT-29. Este sistema permite una disposición multicelular compacta, semejante a la arquitectura de tejidos tumorales in vivo, que condicionan la eficacia de las células efectoras.

Se establecieron co-cultivos de esferoides por el método de la gota colgante en metilcelulosa. Posteriormente los esferoides se pasaron a pocillos y se incubaron con células NK en presencia o ausencia de NETs, utilizando dos ratios efector:diana 1:1 y 5:1. La muerte celular fue cuantificada cada 6 horas durante 36 horas, permitiendo registrar la evolución temporal de la citotoxicidad en cada condición. En la condición con ratio 1:1 **Figura 6a**, los valores de muerte celular permanecieron bajos a lo largo de todo el experimento, sin que se observaran diferencias significativas entre el grupo tratado con células NK y aquel en el que se incluyeron las NETs en el cocultivo. El análisis del AUC **Figura 6c**, evidenció una menor citotoxicidad en el grupo NK-NETs en comparación con el grupo NK, lo cual podría estar asociado al efecto inhibitor de las NETs sobre la citotoxicidad; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.

En contraste, al aumentar la proporción de células NK a un ratio de 5:1 **Figura 6b**, se observó un aumento progresivo y sostenido en los niveles de muerte celular a partir de las 18 horas. Esta tendencia fue más acentuada en el grupo tratado únicamente con células NK, alcanzando su punto máximo a las 36 horas. En este tiempo final, se detectó una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos NK y NK-NETs, con una menor muerte celular en presencia de NETs. No obstante, al integrar los datos mediante el cálculo del AUC **Figura 6d**, la diferencia global entre ambos grupos no alcanzó significancia estadística.

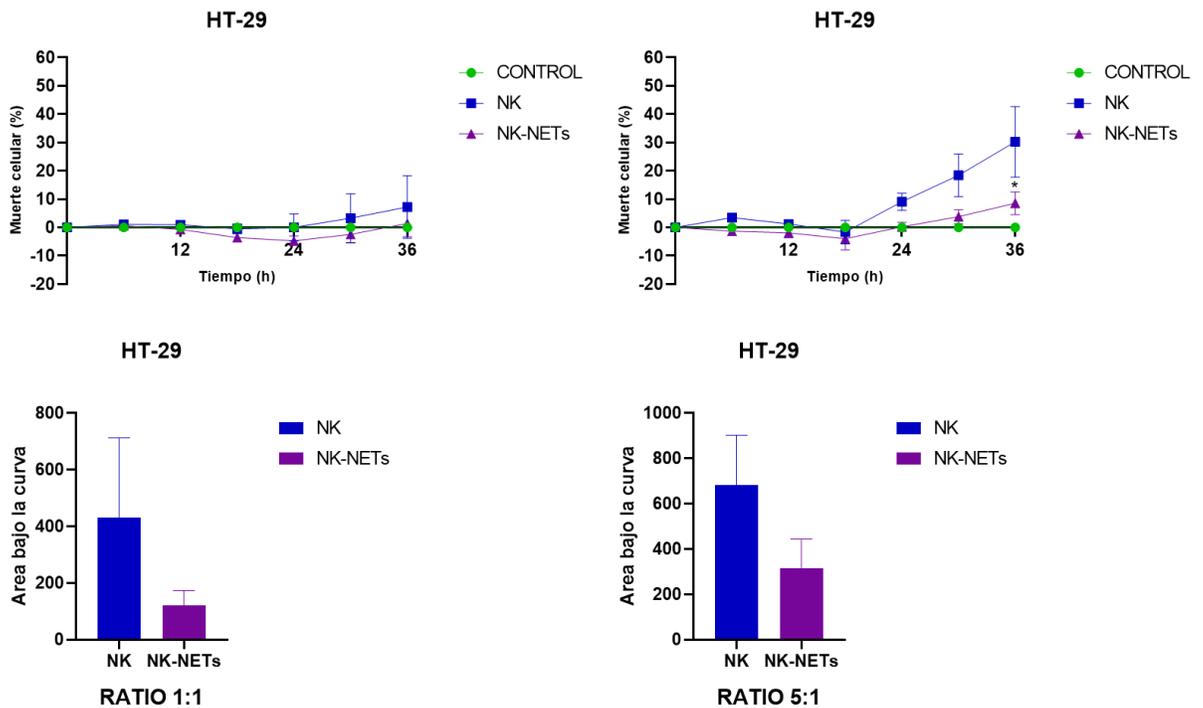


Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad de células NK sobre esferoides HT-29 en presencia de NETs en un modelo tridimensional: Esferoides HT-29 se cocultivaron con células NK en ausencia o presencia de NETs, junto a un control sin NK. Se evaluaron dos ratios Efector:Diana: 1:1 (a, c) y 5:1 (b, d). La muerte celular se cuantificó cada 6h durante 36h para generar las cinéticas de citotoxicidad (a, b), y adicionalmente se calculó el AUC para representar la actividad acumulada (c, d), mediante el sistema Incucyte cuantificó la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP y fue expresada como porcentaje de células muertas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ANOVA de un factor, $P > 0,05$; $n = 5$.

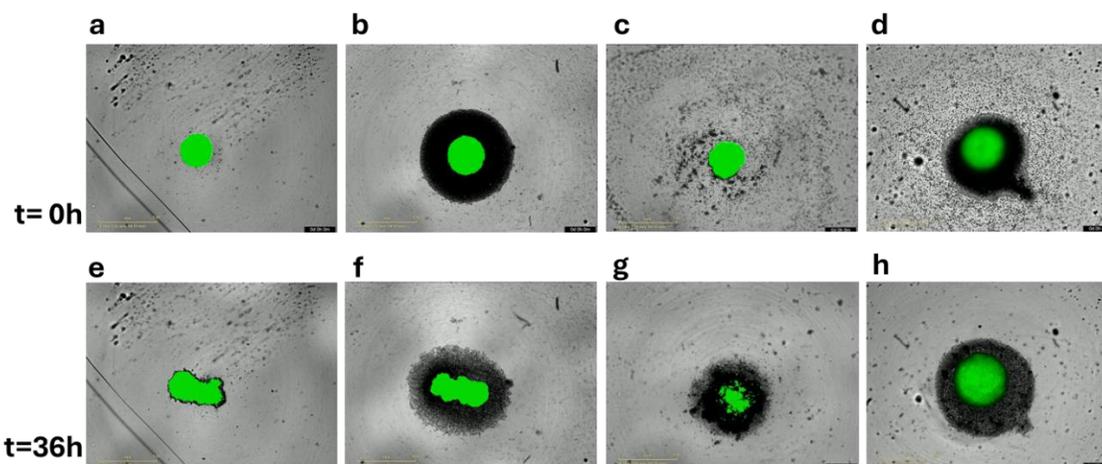


Figura 7 Seguimiento temporal de esferoides tumorales bajo diferentes condiciones experimentales, mostradas a tiempo 0 y al tiempo final. (a, e) Esferoides sin tratamiento; (b, f) esferoides tratados con NETs; (c, g) esferoides c-ocultivos con células NK a un ratio 5:1; (d, h) esferoides tratados con NETs y células NK a un ratio 5:1. mediante el sistema Incucyte se obtuvieron imágenes donde se puede observar la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP.

5.2.1 Impacto de la GzmA en el efecto inhibitorio de las NETs en un modelo tridimensional

Con el objetivo de analizar el potencial efecto de la GzmA, se usó el modelo tridimensional de esferoides tumorales HT-29. Para ello, se compararon las tres condiciones experimentales (NK, NK-NETs, NK+GzmA y NK-NETs-GzmA) en dos ratios efector:diana 1:1 y 5:1.

En el ratio 1:1 **Figura 8a**, las células NK indujeron una muerte celular moderada en el esferoide, alcanzando aproximadamente un 20%. En contraste, la presencia de NETs redujo drásticamente la citotoxicidad, lo que indica una inhibición de la citotoxicidad. Cuando se añade GzmA a las NK sin NETs, la muerte celular también está en torno al 5%. Sin embargo, al incorporar GzmA en la presencia de NK-NETs, se evidenció una recuperación parcial de la muerte celular, alcanzando niveles cercanos al 10%. Aunque esta recuperación no resultó estadísticamente significativa.

En el ratio 5:1 **Figura 8b**, la actividad citotóxica de las células NK fue notablemente mayor, con una reducción del tamaño del esferoide y un porcentaje de muerte celular cercano al 40%. Este efecto citotóxico fue reducido por las NETs (NK-NETs), donde la muerte celular apenas alcanzó un 10%, evidenciando una fuerte inhibición mediada por las NETs. De manera análoga a lo observado en el ratio 1:1, la presencia de GzmA sin NETs no mejoró la función NK, manteniéndose por debajo del 10% de muerte. En este contexto, la adición de GzmA permitió una

recuperación de la citotoxicidad en la condición, con niveles de muerte celular cercanos al 20%. Si bien esta diferencia no alcanzó significancia estadística frente al grupo NK-NETs, el incremento observado sugiere una tendencia consistente a la recuperación parcial de la función efectora de las células NK.

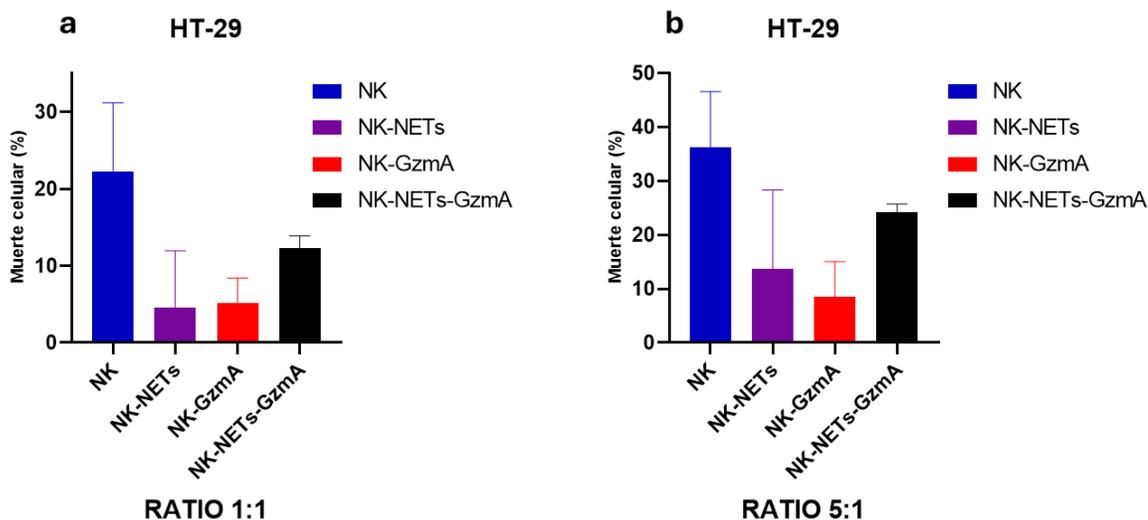


Figura 8. Citotoxicidad de células NK sobre esferoides HT-29 en presencia de NETs y GzmA: Esferoides HT-29 se generaron y co-cultivaron con células NK en ausencia o presencia de NETs. Se emplearon ratios efector:diana de 1:1 (a, c) y 5:1 (b, d). (a y b) muestran la cinética de muerte celular medida cada 6 h hasta las 36 h. (c y d) recogen el AUC de la citotoxicidad acumulada en cada condición. La muerte celular se evaluó al final de las 48 h de incubación y mediante Incucyte se cuantificó la viabilidad celular a partir de la pérdida de la fluorescencia de GFP y fue expresada como porcentaje de células muertas. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ANOVA de un factor, $P > 0,05$; $n = 5$.

En conjunto, los datos obtenidos muestran que, aunque la adición de GzmA no permitió alcanzar niveles de citotoxicidad comparables a los del grupo NK sin NETs, sí se evidenció un incremento en la muerte celular respecto a la condición NK-NETs en ambos ratios analizados 1:1 y 5:1. y aunque en ninguno de los dos casos se alcanzó la significancia estadística se muestra una tendencia consistente que demuestra que la GzmA puede tener un papel relevante en este contexto.

5.3 Fenotipado de moléculas relevantes en la interacción célula tumoral – célula NK

Con el fin de determinar si las condiciones experimentales empleadas en este estudio (presencia de IL-8, neutrófilos o NETs) inducían modificaciones en la expresión de ligandos tumorales involucrados en la activación o inhibición de células NK, se realizó un fenotipado por citometría de flujo de células HT-29. Esta caracterización resultaba relevante, ya que los datos obtenidos previamente en este trabajo indicaban una disminución de la citotoxicidad de las células

NK en condiciones con NETs, lo cual también podría estar mediado por cambios fenotípicos en las células tumorales que afecten su reconocimiento o eliminación por parte de las células efectoras.

Para facilitar el análisis e interpretación, los marcadores estudiados se agruparon en dos bloques temáticos según su función inmunológica: (1) moléculas asociadas a la activación de células NK, (2) moléculas inhibitorias para células NK.

5.3.1 Bloque 1: Moléculas asociadas a la activación de células NK

Se evaluó la expresión de los marcadores B7-H6, ULBP3, ULBP2/5/6, MICA/B y CD155 en células HT-29 tras la exposición a diferentes condiciones experimentales: IL-8, neutrófilos y NETs. La intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada marcador fue normalizada en función del control, establecida como 100%, con el objetivo de facilitar una comparación clara entre las diferentes condiciones. En cuanto a la expresión de B7-H6 **Figura 9a**, se observó un incremento leve del 15% en la condición con IL-8, mientras que la exposición a neutrófilos y a NETs también resultó en un aumento de la expresión, aunque en niveles comparables entre sí (5% y 10 %) con respecto al control. En el caso de ULBP3 **Figura 9b**, la presencia de IL-8 no produjo modificaciones relevantes en la expresión del marcador, sin embargo, se evidenció una disminución del 25% en la condición con neutrófilos, que fue más acentuada al exponer las células a NETs, con una disminución del 30%, indicando una tendencia descendente progresiva en relación con el tipo de estímulo. De manera similar, la expresión de ULBP2/5/6 **Figura 9c** mostró un patrón decreciente en las condiciones con neutrófilos 25% y NETs 30%, siendo esta última la que presentó la mayor reducción respecto al control. En cuanto al marcador MICA/B **Figura 9d**, la estimulación con IL-8 generó una disminución del 25% en su expresión, similar al estar en presencia de neutrófilos 30% y alcanzó su punto más bajo con la exposición a NETs 35%, reflejando una pérdida progresiva de la señal. Por último, en la **Figura 9e** se presentan los resultados obtenidos para CD155, donde se detectó un ligero aumento del 5% de la fluorescencia media tras el tratamiento con IL-8. No obstante, en presencia de neutrófilos se observó una reducción del 15% en la expresión de este marcador, la cual fue aún más pronunciada en la condición con NETs 17%.

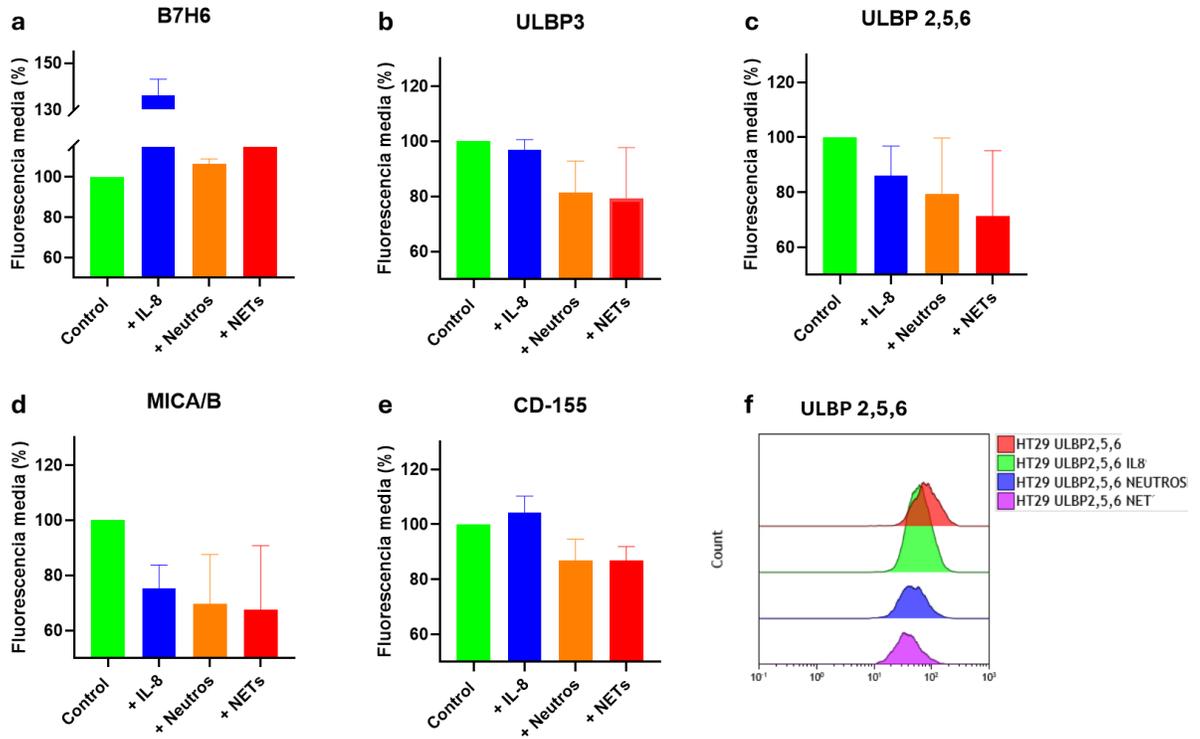


Figura 9. Niveles de expresión de ligandos de activación de células NK en HT-29 tras distintos tratamientos HT-29 fueron cultivadas en ausencia o presencia de IL-8, neutrófilos o NETs. La expresión en superficie de los ligandos (a) B7-H6, (b) ULBP3, (c) ULBP2,5,6, (d) MICA/B, (e) CD155 y (f) overlay ULBP2,5,6 se cuantificó por citometría de flujo y se muestra como intensidad media de fluorescencia normalizada al 100 % del control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ANOVA de un factor, $P > 0,05$.

5.3.2 Bloque 2: Moléculas inhibitorias para células NK

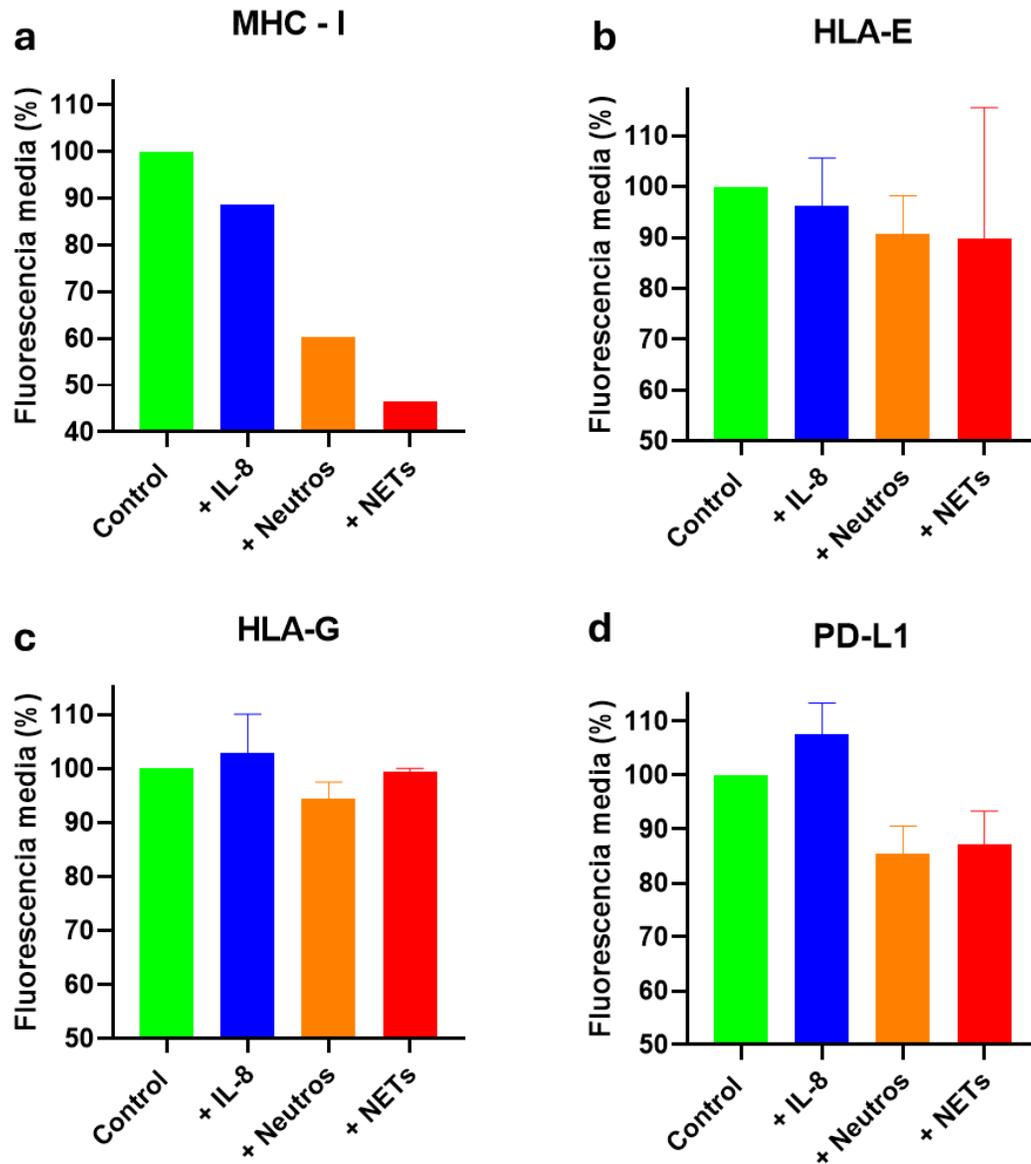


Figura 10. Expresión de moléculas inhibitorias de NK en HT-29 tras distintos tratamientos: Células HT-29 se cultivaron en ausencia o presencia de IL-8, neutrófilos o NETs. La expresión en superficie de (a) MHC-I, (b) HLA-E, (c) HLA-G y (d) PD-L1 se cuantificó por citometría de flujo y se muestra como intensidad media de fluorescencia normalizada al 100 % del control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ANOVA de un factor, $P > 0,05$.

En este apartado se evaluó la expresión de MHC-I, HLA-E, HLA-G y PD-L1 tras la exposición a IL-8, neutrófilos o NETs. En la **Figura 10a** se observa que la expresión de MHC-I disminuyó de forma progresiva y marcada en todas las condiciones de estímulo. La exposición a IL-8 generó una reducción notable del 15%, mientras que la presencia de neutrófilos acentuó aún

más dicha disminución siendo esta cerca del 40%. Esta tendencia fue más evidente con NETs, donde la expresión alcanzó su nivel más bajo, aproximadamente del 50%. En contraste, la expresión de HLA-E **Figura 10b** mostró variaciones mínimas entre las condiciones experimentales. Aunque se registró una ligera disminución tras el contacto con NETs, esta fue solo del 15%, los niveles generales permanecieron cercanos al control. Por su parte, HLA-G **Figura 10c** mantuvo una expresión estable en todas las condiciones, con valores muy similares al control, lo que sugiere que su regulación no se ve significativamente influida por la estimulación con IL-8, neutrófilos ni NETs. Finalmente, la expresión de PD-L1 (**Figura 10d**) presentó una disminución tras la exposición a neutrófilos con un 22% y una reducción similar del 20% en la condición con NETs. Aunque IL-8 no modificó significativamente su expresión, se observó una ligera elevación del 5% con respecto al control.

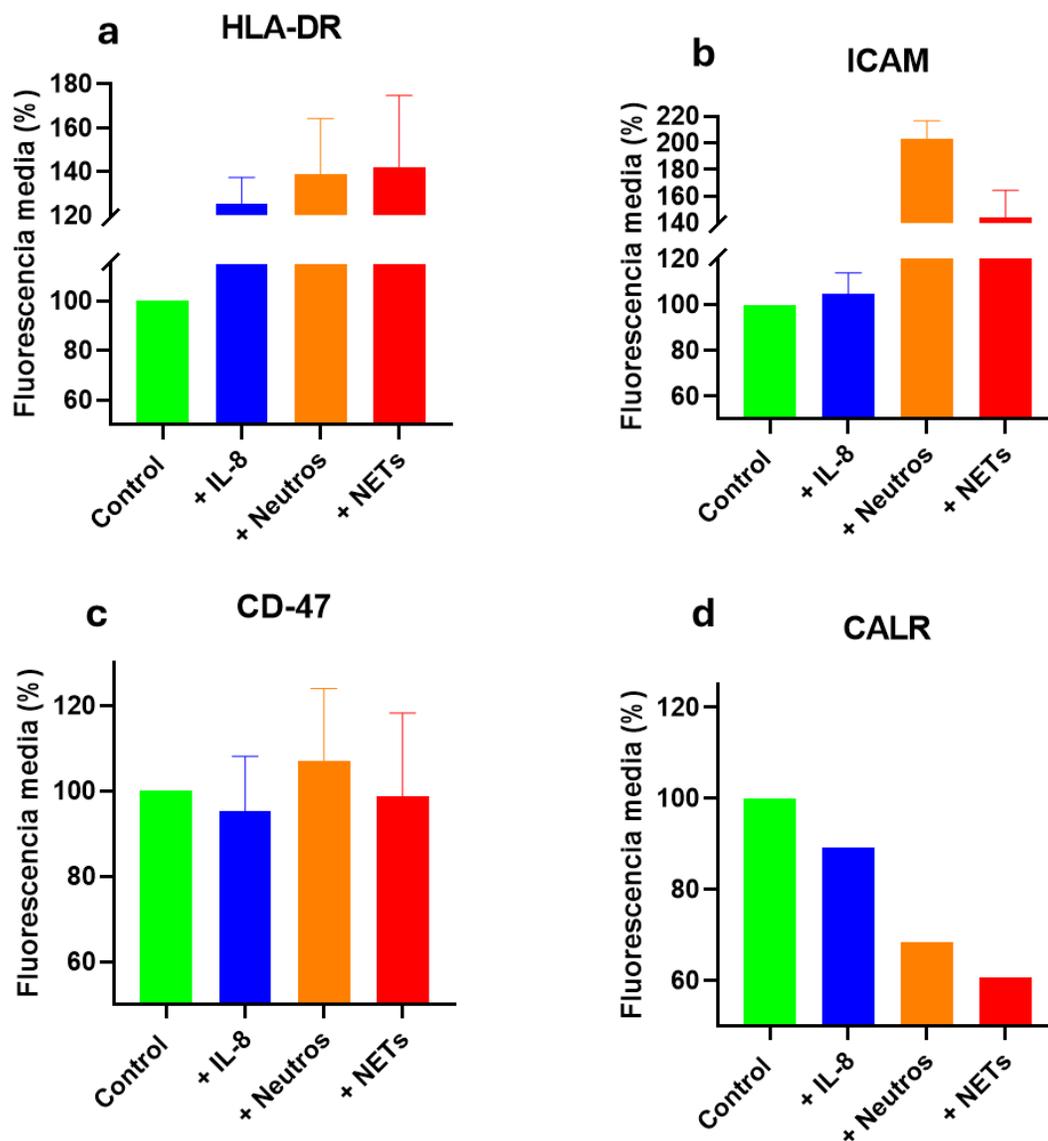


Figura 11. Expresión de moléculas de presentación antigénica, relacionadas al estado de estrés o evasión tumoral en HT-29 tras exposición a IL-8, neutrófilos o NETs: Células HT-29 fueron cultivadas en ausencia o en presencia de IL-8, neutrófilos o NETs. La expresión en superficie de (a) HLA-DR, (b) ICAM, (c) CD47 y (d) CALR se cuantificó por citometría de flujo y se muestra como intensidad media de fluorescencia normalizada al 100 del control. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones ANOVA de un factor, $P > 0,05$.

En la **Figura 11a**, correspondiente a HLA-DR, la incubación con IL-8 incrementó la expresión aproximadamente un 25 % del control. Esta elevación se acentuó en presencia de neutrófilos cerca de 30 % y alcanzó el valor más alto con NETs alrededor de 40 %. Para ICAM-1 **Figura 11b**, el estímulo con IL-8 produjo un aumento muy leve, cercano al 5 %, mientras que el

cocultivo con neutrófilos o la exposición a estos disparó la señal hasta aproximadamente el 40 % con respecto al control. En la **Figura 11c**, la expresión de CD47 se mantuvo alrededor del control, con una ligera reducción tras IL-8 del 10 %, un aumento moderado con neutrófilos al 10 % y valores próximos al control en presencia de NETs. Finalmente, CALR (**Figura 11d**) mostró un descenso progresivo: la exposición a IL-8 redujo la expresión en un 15%, mientras que neutrófilos y NETs provocaron disminuciones más pronunciadas, hasta un 30% y un 40% respectivamente.

5.4 Análisis in silico de la capacidad de la NE de cortar PD-L1

La expresión de PD-L1 tiene gran relevancia en el contexto clínico. En nuestros resultados observamos una bajada de los niveles PD-L1 en la superficie de las células tumorales en presencia de las NETs por lo que decidimos analizar la capacidad que puede tener la NE en la reducción de la expresión de PD-L1 a nivel de la superficie de las células por medio de su corte proteolítico. Para esto usamos las herramientas UniProt, PeptideCutter (ExPASy) y NetSurfP-3.0. Nuestro análisis *in silico* usando la herramienta PeptideCutter reveló que NE podría realizar 31 cortes potenciales de PD-L1. Tras evaluar la accesibilidad de esas posiciones con NetSurfP-3.0 **Figura12**, solo 16 resultaron expuestos y, por tanto, susceptibles al corte de NE. Estos cortes internos en el ectodominio de PD-L1 se distribuyen en el subdominio IgV (62,5 %) y en el subdominio IgC2 (37,5 %).

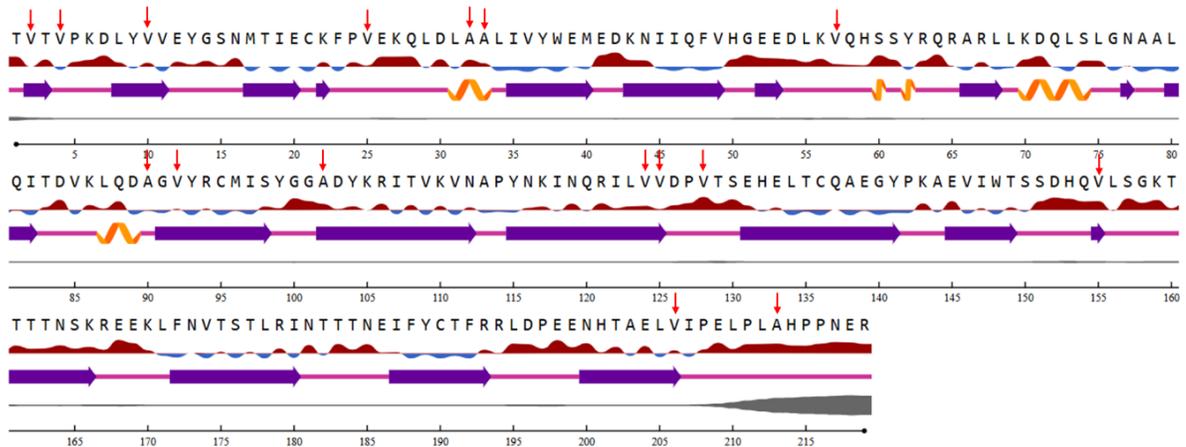


Figura 12. Estructura esquemática del ectodominio de PD-L1 (residuos 19–238) con los 16 sitios de escisión predichos para la NE marcados en rojo. Para obtener estos sitios, se extrajo la secuencia FASTA correspondiente a los residuos 19–238 de PD-L1 y se cargó en PeptideCutter (ExPASy) para predecir todos los posibles puntos de corte por NE. A continuación, cada posición de corte sugerida por PeptideCutter se analizó en NetSurfP-3.0 para calcular la RSA de los residuos, de modo que solo los sitios con RSA suficientemente alta indican que estaban expuestos al disolvente y fueron incluidos y señalados con flechas rojas.

6 DISCUSIÓN

Se ha observado que la formación de NETs es un mecanismo de inmuno-evasión tumoral que favorece el desarrollo tumoral y la resistencia a inmunoterapia mediante la interferencia con la actividad antitumoral de células citotóxicas como los linfocitos T CD8⁺ y las células NK. Sin embargo, todavía existe poca información sobre como modular este proceso para favorecer la respuesta antitumoral y la eficacia de los tratamientos de inmunoterapia. Nuestro trabajo ha pretendido contribuir al estudio del papel de las NETs sobre la acción antitumoral de células NK y añadir luz sobre el posible papel de una de las proteasas de mayor expresión en estas células, la GzmA, en la modulación de la formación de NETs. Nuestros resultados confirman que las NETs interfieren en la actividad antitumoral de células NK sobre cáncer colorectal y además muestra por primera vez que la gzmA podría regular la formación de NETs, y más concretamente, interfeirir con su formación, potenciado la actividad antitumoral de células NK.

En nuestro modelo bidimensional, las células NK mostraron un potente efecto citotóxico, sin embargo, la preincubación de las células tumorales con NETs provocó una reducción marcada y significativa estadísticamente de la muerte tumoral. Estos resultados sugieren que las NETs, a través de sus fibras de ADN e histonas, podrían actuar como barreras físicas que impiden el contacto entre las células tumorales y las células NK y por tanto de la formación de sinapsis inmunológicas, tal y como describieron Teijeira et al. 2021⁷¹. Al mismo tiempo durante la formación de las NETs se liberan proteasas y péptidos capaces de degradar citoquinas proinflamatorias, afectando directamente los mecanismos de reconocimiento y ataque de las NK⁷³, Además de estos efectos, se ha reportado que la inducción de NETs reduce los niveles de perforina y de las gzmA y B en las células citotóxicas contribuyendo así a la inmunosupresión⁷⁶.

El análisis cuantitativo mediante el cálculo del AUC; integró la cinética de citotoxicidad y demostró que las NETs reducen significativamente la actividad efectora de las células NK en ambos modelos, aunque con un efecto más pronunciado en HT-29. Este enfoque refuerza la noción de que las NETs actúan como barreras multifactoriales físicas y bioquímicas que alteran la sinapsis inmunológica. Inhibición similar de la función NK en presencia de NETs ha sido descrita en trabajos experimentales y revisiones^{71,77-79}.

Pese a la claridad de estos hallazgos en 2D, la monocapa celular no reproduce la compleja estructural tumoral in vivo. Por ello, generamos esferoides de HT-29 para evaluar si este entorno mucho más similar al tumoral modificaría la eficacia citotóxica de las NK y el impacto de las NETs sobre esta.

A diferencia de los ensayos en 2D, la citotoxicidad de las NK en el modelo 3D fue mucho menor lo que sugiere que la compactación celular y la mayor densidad limitan la infiltración y el contacto estable de las NK con las células tumorales, lo que a su vez deja claro la validez de este modelo ^{80,81}. Por otro lado, la inhibición de la citotoxicidad por parte de las NETs que fue muy marcada en el modelo en 2D, en el modelo 3D fue más moderada pero aun estadísticamente significativa.

Para evaluar si la inmunosupresión inducida por las NETs podía revertirse, incorporamos GzmA. Este enfoque se sustenta en la actividad proteasa de GzmA descrito anteriormente en la introducción y su capacidad para degradar algunas histonas como H1, H2B y H3 ⁸². Este estudio se orientó hacia el papel intracelular de GzmA observándose que la degradación de las histonas mediada por GzmA una vez internalizada a través de la perforina, modulaba su capacidad para afectar la estructura nuclear. Basándonos en esos datos, y la posterior caracterización de la presencia extracelular de GzmA y la presencia de histonas en las NETs, abordamos este proyecto. En HT-29 2D ratio 1:1, la citotoxicidad, previamente suprimida por las NETs, se duplicó al añadir GzmA, aunque sin alcanzar los niveles del control sin NETs. Un mecanismo plausible es que GzmA, al cortar las histonas ⁸²⁻⁸⁵, potencie la degradación NETs, facilitando que las NK recuperen parcialmente su función efectora al mejorar el contacto entre estas y las células diana, además la no recuperación completa de esta citotoxicidad puede deberse factores que no se ven afectados por la acción de GzmA como puede ser la expresión de ligandos estimulados por NETs, proteasas capaces de escindir ligandos de activación o degradar citoquinas proinflamatorias ⁷³.

Trasladado al modelo 3D de HT-29, la GzmA, también incremento la muerte tumoral frente al grupo NK-NETs. Estos resultados ponen de manifiesto que las NETs mediante la liberación de ADN, histonas y proteasas actúan como barrera física y posiblemente también bioquímica inhibiendo la actividad citotóxica de las células NK.

En el modelo 3D, se observó que la citotoxicidad ejercida por las células NK se redujo significativamente cuando estas fueron expuestas a GzmA, en comparación con la condición de

NK solas. Este hallazgo resulta particularmente llamativo, dado que la GzmA es tradicionalmente reconocida como una proteasa implicada en la inducción de muerte celular mediada por células citotóxicas. Una posible explicación es que, en el entorno tridimensional, donde la difusión de moléculas está limitada y el contacto entre células y proteínas solubles es más prolongado, la exposición sostenida de las células NK a GzmA podría interferir con su funcionalidad citotóxica. No obstante, esta interpretación sigue siendo especulativa, ya que no se dispone de suficiente evidencia en la literatura que respalde directamente este fenómeno observado en cultivos 3D.

Para evaluar si los cambios en la citotoxicidad observados en presencia de NETs podían además deberse a la alteración de moléculas de superficie expresadas por las células tumorales, analizamos su fenotipo. En este análisis hallamos que, si bien en conjunto, los datos revelan que mientras la quimiocina IL-8 tiene un efecto, en la mayoría de los casos leve, tiende a potenciar ligeramente algunos ligandos de activación para células NK. Sin embargo, la presencia de neutrófilos y especialmente de NETs induce un patrón mayoritariamente supresor, con reducciones de ligandos críticos, por ejemplo, CD155 (ligando de DNAM-1) y ULBP3, ULBP2/5/6 y MICA/B (ligandos activadores de NKG2D) Aunque no se tenga evidencia directa de como las NETs puedan causar el descenso de estos ligandos, algunas investigaciones sobre Nets mencionan que además de formar una barrera física durante el proceso de NETosis se concentran NE y cathepsina G en su malla de ADN, y estas enzimas degradan moléculas de superficie de las células objetivo ⁷¹. Además, los ADAMs (del inglés A disintegrin and A metalloprotease) son enzimas proteolíticas capaces de escindir ligandos de NKG2D el cual es un mecanismo de evasión tumoral bien caracterizado ⁸⁶.

Aunque las NETs provocaron una reducción marcada de la expresión de MHC-I lo que teóricamente debería favorecer el reconocimiento (missing-self o pérdida de lo propio) por parte de las NK, no observamos un aumento de la citotoxicidad. Esto sugiere que las células HT-29 compensan esa pérdida de señal inhibidora clásica mediante la pérdida de señales activadoras o mediante impedimento físico ejercido por las propias NETs ^{87,88}. El tumor también puede compensar la pérdida de MHC-I reforzando rutas de evasión más específicas ⁸⁹ como la reducción de PD-L1 con NETs. Esta disminución en presencia de NETs podría relacionarse con ADAMs, los cuales escinden el ectodominio de PD-L1 desde la superficie celular, generando su forma soluble (sPD-L1) y reduciendo la fracción de PD-L1 de membrana ⁹⁰.

De manera general, estos hallazgos definen un microambiente donde la señal de “self o propio” disminuye, pero es compensada por mecanismos de escape reforzando la necesidad de combinar estrategias terapéuticas más allá de la neutralización de las NETs. Una posible combinación sería emplear anticuerpos bloqueantes de PD-L1 para desactivar por completo estas rutas de evasión.

Un hallazgo especialmente interesante fue la reducción de la expresión de PD-L1 en presencia de NETs, un fenómeno con claras implicaciones clínicas. En las inmunoterapias basadas en bloqueadores de PD-1/PD-L1, el nivel de PD-L1 se emplea como biomarcador predictivo de respuesta, de modo que su disminución podría llevar a la selección inadecuada de pacientes Gall et al. 2016, demostraron que la NE afecta los mecanismos de regulación transcripcional de PD-L1, provocando una reducción de su síntesis involucrando vías de STAT1, STAT3 y Jun ⁹¹. Por otro lado, la sobreexpresión de la quimiocina CXCL8 clave en la quimioatracción y activación de neutrófilos se ha asociado con una menor expresión de PD-L1 y con una respuesta menos favorable a tratamientos como Cemiplimab ⁹².

Debido a lo anteriormente mencionado, se plantea si NE pudiese además ejecutar la escisión de ectodominios de PD-L1, el cual consta de una porción extracelular (posición 19-238). El dominio extracelular puede dividirse en dos dominios funcionales similares a Ig: tipo V (posición 19-127) y tipo C2 (posición 133-225) ⁹³. por otro lado, la NE tiene una especificidad de corte por residuos de Valina (Val), Alanina (Ala), Leucina (Leu), Isoleucina (Ile), pero raramente corta tras residuos Ácido aspártico (Asp)/Ácido glutámico (Glu), Lisina (Lys)/Arginina (Arg) o prolina ^{94,95}.

Realizando un análisis in silico centrado en el ectodominio de PD-L1 demostró que la NE produce múltiples cortes internos en el ectodominio de PD-L1, principalmente dentro de los subdominios IgV (62,5 %) y IgC2 (37,5 %). Dado que no existe un único sitio de escisión, se generaría un pool heterogéneo de fragmentos solubles que abarcan distintas porciones de la región extracelular, con diferentes posibles consecuencias como puede ser unirse a anticuerpos anti-PD-L1 (p. ej. atezolizumab, durvalumab), actuando como señuelos y reduciendo la concentración efectiva del anticuerpo, estos fragmentos de sPD-L1 se han observado en líneas celulares de melanoma⁹⁶. También podría inhibir linfocitos a distancia, ya que el sPD-L1 resultante también podría circular en plasma y unirse a PD-1 en células citotóxicas periféricas, induciendo estados de

agotamiento o apoptosis lejos del tumor ⁹⁷. Sin embargo, también se podría monitorear sPD-L1 en suero de pacientes con niveles elevados que podrían correlacionar con actividad de NE y resistencia al bloqueo de punto de control, además se ha observado que los niveles de sPD-L1 se correlacionaron positivamente con la proporción de neutrófilos y negativamente con la proporción y el número total de linfocitos ⁹⁸. Asimismo, se ha demostrado que las MMP contribuyen a esta disminución al escindir el ectodominio de PD-L1 y generar formas solubles que permanecen en el microambiente tumoral ⁹⁹.

En la práctica, esto implicaría que los tumores con alta formación de NETs podrían mostrar niveles bajos de PD-L1 en la superficie de las células tumorales y, por lo tanto, aunque en el análisis histológico se aprecien altos niveles de PD-L1 esta se encontraría en su forma soluble o intracelularmente por lo que la terapia sería inefectiva.

Por otro lado, la señal mediada por CD47 permaneció prácticamente inalterada, mientras que CALR, cayó hasta un 40 % con NETs. Esta combinación de conservar intactos mecanismos inhibitorios de CD47 ^{100,101} y eliminar la señal de CALR ¹⁰² refuerza la evasión tumoral. Así, las NETs no solo inhiben la función de las NK, sino que también distorsionan la comunicación con otros efectores del sistema inmune, consolidando un microambiente tolerogénico.

Dentro de las limitaciones de nuestro trabajo cabe destacar que nos hemos centrado en estudiar el posible papel de la GzmA en la formación de las NETs mediante estudios funcionales analizando su influencia sobre la actividad antitumoral de células NK. Los resultados globales indican que la GzmA es capaz de interferir en la NETosis aumentando la actividad de células NK. Sin embargo, para confirmar que esto se debe a la desestructuración tras la degradación de las histonas presentes se necesitarán realizar experimentos donde se evalúe de modo específico este proceso. Otros aspectos que requerirán más experimentación es la pregunta de porque una célula que expresa grandes cantidades de GzmA, como las células NK, no son capaces de utilizar su GzmA endógena para destruir las NETs y acceder a la célula tumoral. Frente a esta pregunta se debe indicar que las células NK secretan la GzmA cuando sus receptores de activación se unen a los ligandos adecuados con suficiente potencia y en este caso, las NETs además de prevenir el acceso a los tumores y por tanto a los ligandos de activación de células NK, no expresan ligandos para estas células.

Nuestros resultados deberán ser complementados y validados para lograr una mejor comprensión del mecanismo, lo cual permitirá diseñar estrategias terapéuticas basadas en el uso de GzmA, ya sea mediante su administración exógena o mediante la regulación de su expresión y secreción por parte de las células NK o T endógenas, con el objetivo de potenciar la eficacia de los tratamientos de inmunoterapia.

7 CONCLUSIONES

- Las NETs suprimen la citotoxicidad de las células NK en cultivo 2D y 3D, reduciendo la actividad antitumoral de las células NK
- Factores endógenos asociados al tipo de célula tumoral condicionan la magnitud de la inhibición, ya que la línea HT-29 mostró una mayor sensibilidad a las células NK que HCT-116, lo que, entre otras cosas, podría ser debido a diferencias en la expresión de ligandos de activación/inhibición.
- La estructura de las células HT-29 que crecen en un modelo 3D de esferoides reduce la capacidad de las células NK para eliminar las células tumorales.
- La granzima A revierte parcialmente el efecto inhibitorio de las NETosis sobre la función citotóxica de las células NK.
- Las NETs reprograman el microambiente tumoral hacia la inmunoevasión, al reducir ligandos de estrés, mantener moléculas inhibidoras clásicas, generar fragmentos solubles de PD-L1 y alterar señales como calreticulina, reforzando rutas de escape de las células NK.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Medina, K. L. Overview of the immune system. *Handb Clin Neurol* **133**, 61–76 (2016).
2. De Visser, K. E. & Coussens, L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **54**, 1143–1152 (2005).
3. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* **31**, 318 (2010).
4. Zhang, H. *et al.* Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis. *Clin Transl Med* **13**, e1170 (2023).
5. Rosales, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front Physiol* **9**, 324475 (2018).
6. de Visser, K. E. & Joyce, J. A. The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. *Cancer Cell* **41**, 374–403 (2023).
7. Stanton, S. E. & Disis, M. L. Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer. *J Immunother Cancer* **4**, 59 (2016).
8. Li, K. *et al.* Myeloid-derived suppressor cells as immunosuppressive regulators and therapeutic targets in cancer. *Signal Transduct Target Ther* **6**, 362 (2021).
9. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* **71**, 209–249 (2021).

10. Adebayo, A. S., Agbaje, K., Adesina, S. K. & Olajubutu, O. Colorectal Cancer: Disease Process, Current Treatment Options, and Future Perspectives. *Pharmaceutics* **15**, 2620 (2023).
11. Krul, M. F. *et al.* Initial Impact of National CRC Screening on Incidence and Advanced Colorectal Cancer. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **21**, 797-807.e3 (2023).
12. Cervantes, A. *et al.* Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up ☆. *Annals of Oncology* **34**, 10–32 (2023).
13. Roshandel, G., Ghasemi-Kebria, F. & Malekzadeh, R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)* **16**, 1530 (2024).
14. Pei, J., Gao, Y. & Wu, A. An inflammation-related subtype classification for analyzing tumor microenvironment and clinical prognosis in colorectal cancer. *Front Immunol* **15**, 1369726 (2024).
15. Zhang, Y. *et al.* In vivo kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology* **121**, 258 (2007).
16. Wu, S. Y., Fu, T., Jiang, Y. Z. & Shao, Z. M. Natural killer cells in cancer biology and therapy. *Mol Cancer* **19**, 120 (2020).
17. Graham, L. V., Khakoo, S. I. & Blunt, M. D. NK Cells in the Lymph Nodes and Their Role in Anti-Tumour Immunity. *Biomedicines 2024, Vol. 12, Page 1667* **12**, 1667 (2024).
18. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633–640 (2001).

19. Malmberg, K. J. *et al.* Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. *Semin Immunol* **31**, 20–29 (2017).
20. Prager, I. & Watzl, C. Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *J Leukoc Biol* **105**, 1319–1329 (2019).
21. Martínez-Lostao, L., Anel, A. & Pardo, J. How Do Cytotoxic Lymphocytes Kill Cancer Cells? *Clinical Cancer Research* **21**, 5047–5056 (2015).
22. Ramírez-Labrada, A. *et al.* All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol* **13**, 896228 (2022).
23. Chowdhury, D. & Lieberman, J. Death by a Thousand Cuts: Granzyme Pathways of Programmed Cell Death. *Annu Rev Immunol* **26**, 389 (2008).
24. Russell, J. H. & Ley, T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* **20**, 323–370 (2002).
25. Ewen, C. L., Kane, K. P. & Bleackley, R. C. A quarter century of granzymes. *Cell Death & Differentiation* *2012 19:1* **19**, 28–35 (2011).
26. Pipkin, M. E. & Lieberman, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* **19**, 301–308 (2007).
27. Joeckel, L. T. & Bird, P. I. Blessing or curse? Proteomics in granzyme research. *Proteomics Clin Appl* **8**, 351–381 (2014).
28. Metkar, S. S. *et al.* Human and Mouse Granzyme A Induce a Proinflammatory Cytokine Response. *Immunity* **29**, 720–733 (2008).

29. Aubert, A., Jung, K., Hiroyasu, S., Pardo, J. & Granville, D. J. Granzyme serine proteases in inflammation and rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology* 2024 20:6 **20**, 361–376 (2024).
30. Bots, M. & Medema, J. P. Granzymes at a glance. *J Cell Sci* **119**, 5011–5014 (2006).
31. Richardson, K. C., Jung, K., Pardo, J., Turner, C. T. & Granville, D. J. Noncytotoxic Roles of Granzymes in Health and Disease. *Physiology* **37**, 323–348 (2022).
32. Santiago, L. *et al.* Extracellular Granzyme A Promotes Colorectal Cancer Development by Enhancing Gut Inflammation. *Cell Rep* **32**, (2020).
33. Ramírez-Labrada, A. *et al.* All About (NK Cell-Mediated) Death in Two Acts and an Unexpected Encore: Initiation, Execution and Activation of Adaptive Immunity. *Front Immunol* **13**, 896228 (2022).
34. Jamieson, T. *et al.* Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. *J Clin Invest* **122**, 3127 (2012).
35. Carus, A., Ladekarl, M., Hager, H., Nedergaard, B. S. & Donskov, F. Tumour-associated CD66b+ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. *Br J Cancer* **108**, 2116 (2013).
36. Powell, D., Lou, M., Barros Becker, F. & Huttenlocher, A. Cxcr1 mediates recruitment of neutrophils and supports proliferation of tumor-initiating astrocytes in vivo. *Scientific Reports* 2018 8:1 **8**, 1–12 (2018).
37. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **420**, 860 (2002).

38. Raccosta, L. *et al.* The oxysterol–CXCR2 axis plays a key role in the recruitment of tumor-promoting neutrophils. *J Exp Med* **210**, 1711 (2013).
39. Zhou, S. L. *et al.* Overexpression of CXCL5 mediates neutrophil infiltration and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **56**, 2242–2254 (2012).
40. Zhou, S. L. *et al.* CXCR2/CXCL5 axis contributes to epithelial-mesenchymal transition of HCC cells through activating PI3K/Akt/GSK-3 β /Snail signaling. *Cancer Lett* **358**, 124–135 (2015).
41. Moore, R. J. *et al.* Mice deficient in tumor necrosis factor- α are resistant to skin carcinogenesis. *Nat Med* **5**, 828–831 (1999).
42. Coffelt, S. B. *et al.* IL17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. *Nature* **522**, 345 (2015).
43. Benevides, L. *et al.* IL-17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res* **75**, 3788 (2015).
44. Finisguerra, V. *et al.* MET is required for the recruitment of anti-tumoural neutrophils. *Nature* **522**, 349–353 (2015).
45. Wislez, M. *et al.* Tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor prolong the survival of neutrophils infiltrating bronchoalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma. *American Journal of Pathology* **159**, 1423–1433 (2001).

46. Nozawa, H., Chiu, C. & Hanahan, D. Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12493 (2006).
47. Rotondo, R. *et al.* IL-8 induces exocytosis of arginase 1 by neutrophil polymorphonuclears in nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer* **125**, 887–893 (2009).
48. Shen, L. *et al.* Inhibition of human neutrophil degranulation by transforming growth factor- β 1. *Clin Exp Immunol* **149**, 155 (2007).
49. Fridlender, Z. G. *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : ‘N1’ versus ‘N2’ TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194 (2009).
50. Fuchs, T. A. *et al.* Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**, 231 (2007).
51. Mousset, A. *et al.* Neutrophil extracellular traps formed during chemotherapy confer treatment resistance via TGF- β activation. *Cancer Cell* **41**, 757-775.e10 (2023).
52. Brinkmann, V. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science (1979)* **303**, 1532–1535 (2004).
53. Hu, W. *et al.* Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2022 149:5 **149**, 2191–2210 (2022).
54. Karlsson, A. & Dahlgren, C. Assembly and Activation of the Neutrophil NADPH Oxidase in Granule Membranes. <https://home.liebertpub.com/ars> **4**, 49–60 (2004).

55. Karlsson, A., Nixon, J. B. & McPhail, L. C. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* **67**, 396–404 (2000).
56. Teijeira, A. *et al.* Differential Interleukin-8 thresholds for chemotaxis and netosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* **51**, 2274–2280 (2021).
57. Alemán, O. R., Mora, N., Cortes-Vieyra, R., Uribe-Querol, E. & Rosales, C. Transforming Growth Factor- β -Activated Kinase 1 Is Required for Human Fc γ RIIIb-Induced Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Front Immunol* **7**, 277 (2016).
58. Cahilog, Z. *et al.* The Role of Neutrophil NETosis in Organ Injury: Novel Inflammatory Cell Death Mechanisms. *Inflammation* **43**, 2021 (2020).
59. Yipp, B. G. & Kubes, P. NETosis: how vital is it? *Blood* **122**, 2784–2794 (2013).
60. Clark, S. R. *et al.* Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nature Medicine* 2007 13:4 **13**, 463–469 (2007).
61. Pieterse, E., Rother, N., Yanginlar, C., Hilbrands, L. B. & van der Vlag, J. Neutrophils discriminate between lipopolysaccharides of different bacterial sources and selectively release neutrophil extracellular traps. *Front Immunol* **7**, (2016).
62. Yipp, B. G. *et al.* Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nature Medicine* 2012 18:9 **18**, 1386–1393 (2012).
63. Dempsey, L. A., Fehervari, Z. & Visan, I. Motile recognition. *Nature Immunology* 2016 18:1 **18**, 14–14 (2016).

64. Wang, H. *et al.* Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1 **9**, 1–40 (2024).
65. Tohme, S. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Progression of Liver Metastases after Surgical Stress. *Cancer Res* **76**, 1367 (2016).
66. Hu, W. *et al.* Neutrophil extracellular traps facilitate cancer metastasis: cellular mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2022 149:5 **149**, 2191–2210 (2022).
67. Nie, M. *et al.* Neutrophil Extracellular Traps Induced by IL8 Promote Diffuse Large B-cell Lymphoma Progression via the TLR9 Signaling. *Clinical Cancer Research* **25**, 1867–1879 (2019).
68. Zhu, B. *et al.* NF- κ B and neutrophil extracellular traps cooperate to promote breast cancer progression and metastasis. *Exp Cell Res* **405**, 112707 (2021).
69. Park, J. *et al.* Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps. *Sci Transl Med* **8**, 361ra138 (2016).
70. Demers, M. *et al.* Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. *Oncoimmunology* **5**, e1134073 (2016).
71. Teijeira, Á. *et al.* CXCR1 and CXCR2 Chemokine Receptor Agonists Produced by Tumors Induce Neutrophil Extracellular Traps that Interfere with Immune Cytotoxicity. *Immunity* **52**, 856-871.e8 (2020).
72. Babatunde, K. A. *et al.* Naive primary neutrophils play a dual role in the tumor microenvironment. *iScience* **27**, 110632 (2024).

73. Schauer, C. *et al.* Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine* 2014 20:5 **20**, 511–517 (2014).
74. Wang, J. *et al.* Excessive Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Front Immunol* **11**, 568950 (2020).
75. Valayer, A. *et al.* Neutrophils can disarm NK cell response through cleavage of NKp46. *J Leukoc Biol* **101**, 253–259 (2017).
76. Xu, L. *et al.* Neutrophil extracellular traps promote growth of lung adenocarcinoma by mediating the stability of m6A-mediated SLC2A3 mRNA-induced ferroptosis resistance and CD8(+) T cell inhibition. *Clin Transl Med* **15**, e70192 (2025).
77. Ronchetti, L. *et al.* Neutrophil extracellular traps in cancer: not only catching microbes. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* **40**, 1–9 (2021).
78. Wang, H. *et al.* Neutrophil extracellular traps in homeostasis and disease. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1 **9**, 1–40 (2024).
79. Fang, Q. *et al.* No NETs no TIME: Crosstalk between neutrophil extracellular traps and the tumor immune microenvironment. *Front Immunol* **13**, 1075260 (2022).
80. Lanuza, P. M. *et al.* Activated human primary NK cells efficiently kill colorectal cancer cells in 3D spheroid cultures irrespectively of the level of PD-L1 expression. *Oncoimmunology* **7**, e1395123 (2018).
81. Poggi, A. *et al.* Three-Dimensional Culture Models to Study Innate Anti-Tumor Immune Response: Advantages and Disadvantages. *Cancers* 2021, Vol. 13, Page 3417 **13**, 3417 (2021).

82. Zhang, D. *et al.* Induction of Rapid Histone Degradation by the Cytotoxic T Lymphocyte Protease Granzyme A. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 3683–3690 (2001).
83. Bell, J. K. *et al.* The oligomeric structure of human granzyme A is a determinant of its extended substrate specificity. *Nat Struct Biol* **10**, 527–534 (2003).
84. Fan, Z. *et al.* Cleaving the oxidative repair protein Ape I enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* **4**, 145–153 (2003).
85. Beresford, P. J. *et al.* Granzyme A Activates an Endoplasmic Reticulum-associated Caspase-independent Nuclease to Induce Single-stranded DNA Nicks. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 43285–43293 (2001).
86. Zingoni, A., Vulpis, E., Loconte, L. & Santoni, A. NKG2D Ligand Shedding in Response to Stress: Role of ADAM10. *Front Immunol* **11**, 530304 (2020).
87. Li, Y. *et al.* Unlocking the therapeutic potential of the NKG2A-HLA-E immune checkpoint pathway in T cells and NK cells for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer* **12**, e009934 (2024).
88. Fisher, J. G., Doyle, A. D. P., Graham, L. V., Khakoo, S. I. & Blunt, M. D. Disruption of the NKG2A:HLA-E Immune Checkpoint Axis to Enhance NK Cell Activation against Cancer. *Vaccines* 2022, Vol. 10, Page 1993 **10**, 1993 (2022).
89. Sasaki, T. *et al.* Microenvironmental stresses induce HLA-E/Qa-1 surface expression and thereby reduce CD8⁺ T-cell recognition of stressed cells. *Eur J Immunol* **46**, 929–940 (2016).

90. Orme, J. J. *et al.* ADAM10 and ADAM17 cleave PD-L1 to mediate PD-(L)1 inhibitor resistance. *Oncoimmunology* **9**, 1744980 (2020).
91. Gall, V. *et al.* Abstract 3243: Neutrophil elastase regulates PD-L1 expression in breast cancer. *Cancer Res* **76**, 3243–3243 (2016).
92. De Falco, V. *et al.* Overexpression of CCL-20 and CXCL-8 genes enhances tumor escape and resistance to cemiplimab, a programmed cell death protein-1 (PD-1) inhibitor, in patients with locally advanced and metastatic cutaneous squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* **13**, 2388315 (2024).
93. Zhang, S. *et al.* Palmitoylation of PD-L1 Regulates Its Membrane Orientation and Immune Evasion. *Langmuir* (2025)
doi:10.1021/ACS.LANGMUIR.4C04441/ASSET/IMAGES/LARGE/LA4C04441_0006.JPEG.
94. Kasperkiewicz, P. *et al.* Design of ultrasensitive probes for human neutrophil elastase through hybrid combinatorial substrate library profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2518–2523 (2014).
95. Korkmaz, B. *et al.* Discriminating between the activities of human neutrophil elastase and proteinase 3 using serpin-derived fluorogenic substrates. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 39074–39081 (2002).
96. Zhou, J. *et al.* Soluble PD-L1 as a biomarker in malignant melanoma treated with checkpoint blockade. *Cancer Immunol Res* **5**, 480 (2017).

97. Hayashi, H. *et al.* Soluble immune checkpoint factors reflect exhaustion of antitumor immunity and response to PD-1 blockade. *J Clin Invest* **134**, e168318 (2024).
98. Oh, S. Y. *et al.* Soluble PD-L1 is a predictive and prognostic biomarker in advanced cancer patients who receive immune checkpoint blockade treatment. *Sci Rep* **11**, 1–11 (2021).
99. Regulation of programmed-death ligand in the human head and neck squamous cell carcinoma microenvironment is mediated through matrix metalloproteinase-mediated proteolytic cleavage. <https://www.spandidos-publications.com/ijo/52/2/379>.
100. Deuse, T. *et al.* The SIRP α -CD47 immune checkpoint in NK cells. *Journal of Experimental Medicine* **218**, (2021).
101. Advani, R. *et al.* CD47 Blockade by Hu5F9-G4 and Rituximab in Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* **379**, 1711 (2018).
102. Sen Santara, S. *et al.* The NK cell receptor NKp46 recognizes ecto-calreticulin on ER-stressed cells. *Nature* **2023 616:7956 616**, 348–356 (2023).