



A.C. Camargo Cancer Center

Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente
Área de Oncologia

Pedro Henrique Barbosa Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INTRATUMORAIS E
PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM
COLANGIOCARCINOMA**

Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

São Paulo

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Pedro Henrique Barbosa .

Caracterização de linfócitos intratumorais e periféricos em pacientes com colangiocarcinoma . / Pedro Henrique Barbosa Pereira. São Paulo, 2022.

60f.

Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Tiago da Silva Medina.

1. Colangiocarcinoma , 2. Infiltrado Inflamatório , 3. Inflamação sistêmica

CDU 616

Pedro Henrique Barbosa Pereira

**CARACTERIZAÇÃO DE LINFÓCITOS INTRATUMORAIS E
PERIFÉRICOS EM PACIENTES COM COLANGIOCARCINOMA**

Aprovado em: 15/12/2022

Banca examinadora

Orientador: Dr. Tiago da Silva Medina

Instituição: Fundação Antônio Prudente

Membro da banca: Dr. Martín Hernan Bonamino

Instituição: A.C. Camargo Cancer Center

Membro da banca: Dra. Ludmilla Thomé Domingos Chinen

Instituição: Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC)

Membro da banca: Dra. Fabíola Attié de Castro

Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar aos pacientes, obrigado a todos que aceitaram participar desse estudo, por acreditar e apoiar a ciência sem pedir nada em troca. Sem vocês este e tantos outros trabalhos que fazemos não seria possível.

Ao meu orientador, Dr. Tiago da Silva Medina, obrigado por todo o conhecimento e ensinamento compartilhado e principalmente por acreditar em mim, pelo apoio e pela paciência comigo ao longo desses dois anos de muito trabalho. Uma excelente pessoa e profissional que com certeza me inspira muito a ser um cientista melhor.

Aos meus pais, Wliete Líriam e Almir Pereira, por sempre apoiarem minhas decisões, mesmo que as vezes nem soubessem do que se tratava. Pelos ensinamentos abdições e cuidados comigo e minhas irmãs, Patrícia e Priscila, a quem também agradeço muito pela amizade e companheirismo e por todo o apoio emocional, conselhos e ajuda que se fez necessária ao longo dos últimos anos. A toda a família, obrigado por tudo.

Ao meu grupo, Leticia, Amadinha, Gabriela, Glauco, Alexandre e aos recém-chegados, Mariela, Ariane e Emmanuel, que foram muito mais do que colegas de trabalho durante o período que passamos juntos. Obrigado a todos pelos conselhos, puxões de orelha, ajuda com os experimentos, conversas sobre trabalho e sobre a vida, foi uma honra poder trabalhar com vocês.

À Carol, Hadassa, Dimas, Amanda, Anny, Cintia, Fernanda, Glenda e Regiane, obrigado a todos vocês pela amizade, companheirismo, incentivo e trocas ao longo de toda a minha formação acadêmica. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Ao A.C.Camargo Cancer Center, pela oportunidade de fazer parte desse programa de pós-graduação, por todo o apoio técnico, com funcionários incríveis que estão sempre dispostos a ajudar, fazendo bem mais do que o que seria seu trabalho.

E por último, mas não menos importante, as agências de fomento, CAPES, CNPQ e FAPESP, pela bolsa que foi de grande ajuda e pelo suporte financeiro que tornou esse e tantos outros projetos possíveis.

RESUMO

Pereira, Pedro Henrique Barbosa. Caracterização de linfócitos intratumorais e periféricos em pacientes com colangiocarcinoma [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

INTRODUÇÃO: Com origem nos dutos biliares, o colangiocarcinoma (CCA) pode ser classificado de acordo com a sua localização anatômica em intra- e extra-hepático. Com escassas opções terapêuticas, o CCA é altamente agressivo, em virtude do seu crescimento silencioso e da formação de metástases precoces. **OBJETIVO:** Partindo do pressuposto de que o perfil inflamatório e as características imunológicas relacionadas ao microambiente tumoral apresentam relevância terapêutica, nós caracterizamos a composição de populações linfocitárias em pacientes com CCA virgens de tratamento, nos debruçando principalmente sobre características fenotípicas e funcionais das células NK isoladas de amostras de sangue periférico e de ressecções de tecidos peritumoral e intratumoral. **MATERIAL E MÉTODOS:** Nesse contexto, as células imunes foram analisadas por meio da técnica de citometria de fluxo de alta dimensão, utilizando-se painéis de anticorpos complexos para identificar populações de células da linhagem linfóide. Além disso, fizemos ensaio *in vitro* de proliferação de células NK para compreender a capacidade proliferativa de subpopulações de células NK. **RESULTADOS:** O infiltrado linfóide dos pacientes analisados se mostrou substancialmente heterogêneo, revelando frequências que variaram de 1% a 27.3% nos tecidos tumorais e de 0,4% a 46,8% nos tecidos peritumorais. De modo geral, não houve diferença na frequência do infiltrado inflamatório entre o tecido tumoral e o peritumoral dos pacientes analisados. Porém, os linfócitos T CD4 e T CD8 estavam abundantemente representados no microambiente tumoral desses pacientes. Por outro lado, as células NK e os linfócitos B estavam representados numa frequência menor no microambiente tumoral. As células T CD4 e T CD8 expressaram amplamente o marcador de ativação celular CD69, enquanto as células B expressaram altos níveis de CD38 e HLA-DR, sugerindo uma possível participação como células apresentadoras de antígeno (APC). Além disso, um denso infiltrado de plasmócitos foi observado no TME. Também identificamos uma nova subpopulação de células NK periféricas, com fenótipo bastante distinto das células NK convencionais, caracterizada pela alta capacidade proliferativa, pela expressão de CD39 e de outros *immune checkpoints* e pela produção de IL-10, sugerindo uma atividade potencialmente supressora. Além disso, nós encontramos uma população de células NK na região tumoral caracterizada pela alta expressão de CD39, sugerindo que tal

população possa contribuir para a geração de um microambiente imunossupressor em colangiocarcinoma. **CONCLUSÃO:** Pacientes com CCA apresentam infiltrado imune intratumoral composto sobretudo de linfócitos T ativados. Além disso, a descoberta de uma população de células NK potencialmente supressora abundantemente encontrada na periferia e que pode atingir a região tumoral pode despontar como alvo terapêutico para a reversão do microambiente supressivo em pacientes com CCA.

Palavras-chave: Colangiocarcinoma; infiltrado inflamatório; inflamação sistêmica; células NK supressoras; IL-10.

ABSTRACT

Pereira, Pedro Henrique Barbosa. Characterization of systemic and intratumor lymphocytes in patients with cholangiocarcinoma [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2022.

INTRODUCTION: Cholangiocarcinoma (CCA) is a rare type of cancer that affects the bile ducts and has been classified according to its anatomical location into intra- and extra-hepatic. With scarce therapeutic options, CCA is highly aggressive, due to its silent growth and the capacity of generating early metastases. **AIMS:** Accumulating evidence shows that both the inflammatory profile and the immunological characteristics related to the tumor microenvironment are therapeutically relevant across tumor types. Thus, we characterized the composition of lymphocyte (sub)populations in treatment-naïve CCA patients, focusing mainly on the phenotypic and functional characteristics of NK cells from blood samples as well as peritumor and intratumor tissue resections. **MATERIAL AND METHODS:** Here, systemic and intratumor immune cell populations were analyzed using the high-dimensional flow cytometry technique, where complex antibody panels were used to identify lymphoid cell populations. Furthermore, we performed in vitro proliferation assay to assess the proliferative capacity of NK cell subpopulations. **RESULTS:** The immune cell infiltrate within tissue resections was substantially heterogeneous, revealing frequencies that ranged from 1% to 27.3% in tumor tissues and from 0.4% to 46.8% in peritumor tissues. Overall, the inflammatory infiltrate was similar between tumor and peritumoral tissues from CCA patients. However, CD4 and CD8 T lymphocytes were abundantly found within the tumor microenvironment of these patients. On the other hand, NK cells and B lymphocytes were present in lower frequencies within the tumor microenvironment. CD4 and CD8 T cells widely expressed the cell activation marker CD69, while B cells expressed high levels of CD38 and HLA-DR, suggesting a possible participation as antigen presenting cells (APC). Additionally, an exuberant infiltration of plasma cells was found in the TME. Finally, we identified a not-yet-characterized non-classical subpopulation of highly proliferative peripheral NK cells, which is phenotypically different from conventional NK cells, as they highly express CD39, other immune checkpoints, and IL-10, thus suggesting a new regulatory NK cell subpopulation. More interestingly, we found an intratumor NK population that highly express CD39, suggesting that such population could contribute to the generation of a suppressive TME in cholangiocarcinoma. **CONCLUSION:** Patients with ACC exhibit an immune infiltrate mainly composed of active T lymphocytes within the tumor microenvironment. Moreover, the identification of a potentially suppressive

NK cell subpopulation commonly found in the periphery - which could reach the intratumor regions of CCA patients - can emerge as a promising therapeutic target capable of reversing the suppressive tumor microenvironment of CCA.

Keywords: Cholangiocarcinoma; inflammatory infiltrate; systemic inflammation; suppressive NK cells; IL-10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra tumores	3
Figura 2. Funções biológicas das células NK.....	5
Figura 3. Estratégia de Gates.....	16
Figura 4. Caracterização da composição imune intratumoral de pacientes com CCA.	18
Figura 5. Caracterização da composição imune intratumoral de pacientes com CCA.	20
Figura 6. Dotplot representativo mostrando células CD56 ⁺ do sangue periférico de paciente com CCA.	21
Figura 7. Expressão de marcadores de exaustão em células NK de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis.....	23
Figura 8. Expressão de marcadores de exaustão em linfócitos T e células NK de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis.	24
Figura 9. Caracterização de células NK clássicas e não clássicas no sangue periférico de pacientes com CCA..	25
Figura 10. Caracterização de células NK clássicas e não clássicas na circulação de pacientes com CCA.	27
Figura 11. Caracterização de células NK no microambiente tumoral de pacientes com CCA.	29
Figura 12. Proliferação induzida por IL-2 de células NK pré-ativadas por citocinas.	Erro!
Indicador não definido.	

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

A2AR	Receptor de adenosina A2A
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
APC	Células apresentadoras de antígeno
CCA	Colangiocarcinoma
CRLM	Metástases hepáticas de câncer colorretal
CTL	Linfócitos T citotóxicos
CTLA4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CTV	<i>Celltrace Violet</i> (marcador celular)
dCCA	Colangiocarcinoma distal
eCCA	Colangiocarcinoma extra-hepático
ESCC	Carcinoma de células escamosas do esôfago
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FVS575V	Marcador de viabilidade fixável (do inglês, <i>Fixable Viability Stain</i>)
HCC	Carcinoma hepatocelular
HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
iCCA	Colangiocarcinoma intra-hepático
IFN-γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina-10
IL-2	Interleucina-2
LAG3	Gene 3 de ativação de linfócitos
LCMV	Vírus da coriomeningite linfocitária
MDSCs	Células mieloides supressoras
MFI	Intensidade de fluorescência média
NK	Células matadoras naturais (do inglês, <i>Natural killers</i>)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
pCCA	Colangiocarcinoma peri-hilar
PD-1	Proteína de morte programada 1
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
rHuIL-12	IL-12 Recombinante humana
SD	Desvio padrão (do inglês, <i>standard deviation</i>)

SEM	Erro padrão da média (do inglês, <i>standard error of the mean</i>)
TAM	Macrófagos associados ao tumor (do inglês, <i>tumor-associated macrophages</i>)
TAN	Neutrófilos associados ao tumor (do inglês, <i>tumor-associated neutrophils</i>)
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGF-β	Fator de crescimento transformador beta
TIGIT	Imunoreceptor de células T com domínios imunoglobulina e ITIM
TIM3	Proteína Ig dos domínios de mucina e imunoglobulina de célula T
TLS	Estruturas linfoides terciárias (do inglês, <i>tertiary lymphoid structures</i>)
TME	Microambiente tumoral (do inglês, <i>tumor microenvironment</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
UMAP	do inglês, <i>Uniform Manifold Approximation and Projection</i>
URSA	Abortos espontâneos recorrentes inexplicados
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Biologia do Câncer e Infiltrado Inflamatório.....	1
1.2 Resposta Imune no câncer	2
1.3 Colangiocarcinoma	6
1.4 Resposta Imune em Colangiocarcinoma.....	8
2. JUSTIFICATIVA	10
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAIS E MÉTODOS	11
4.1 Pacientes	11
4.2 Coleta e isolamento de Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de sangue periférico dos pacientes com CCA e controles saudáveis	11
4.3 Coleta de tecidos e processamento inicial	11
4.4 Análise de citometria de fluxo	12
4.5 Ensaio de proliferação	12
4.6 Análise Estatística e Representação de Dados.....	13
5. RESULTADOS	14
5.1 Características clínicas dos pacientes.....	14
5.2 Estratégias de análise para a identificação das populações linfoides intratumorais e sistêmicas	15
5.3 Composição imune e perfil de ativação de linfócitos T, B e NK.....	17
5.4. Caracterização da composição imune sistêmica de pacientes com colangiocarcinoma. 21	
5.5. Descoberta e caracterização de células NK com potencial supressor	24

6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia do Câncer e Infiltrado Inflamatório

Células normais necessitam de sinais de crescimento exógenos para alcançar um estado ativo de proliferação. Esses sinais são transmitidos para as células através de receptores transmembrana, que se ligam em classes distintas de moléculas de sinalização. A dependência da sinalização para o crescimento e proliferação celular é o que garante a homeostase e o comportamento adequado dos vários tipos de células dentro de seus respectivos tecidos¹. O câncer é caracterizado por um crescimento descontrolado de células aberrantes que podem afetar diferentes partes do corpo e se disseminar por locais e tecidos diversos². Um dos fatores que regula a gênese da formação tumoral é a eliminação e/ou redução da dependência de fatores de crescimento exógenos para a propagação e crescimento das células tumorais, uma vez que as células aberrantes passam a produzir sinais de crescimento próprios, reduzindo assim a sua dependência de sinais exógenos¹.

Para a sustentação do crescimento tumoral, as células tumorais demandam grandes quantidades de nutrientes e oxigênio. Na ausência dessas condições, a capacidade de crescimento e proliferação das células tumorais pode ser interrompida ou reduzida. Como mecanismo compensatório, as células tumorais podem produzir moléculas que induzem a neovascularização, promovendo um acúmulo local de fatores pró-angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)^{2, 3}. Esse processo contribui para a rápida formação de vasos tumorais com características disfuncionais. A vasculatura resultante é bastante permeável, tortuosa, com padrões aleatórios de interconexões e aleatoriamente distribuídos. Como resultado, as células endoteliais que revestem esses vasos adquirem uma morfologia aberrante e são frouxamente ligadas umas às outras, enquanto os pericitos são fracamente fixados ao endotélio ou mesmo ausentes, o que dificulta a regulação da permeabilidade vascular^{3,4}. As células endoteliais também podem expressar baixos níveis de moléculas de adesão celular, como VCAM1 e ICAM1, o que dificulta a interação entre células do sistema imune e células endoteliais, dificultando a migração destas células para microambiente tumoral (TME), contribuindo assim para o surgimento dos chamados “tumores frios”. Além disso, essas propriedades aberrantes dos vasos geram um estado de hipóxia e promovem um acúmulo de moléculas menores, como glicose e aminoácidos, que podem afetar a função das células imunes no TME²⁻⁵.

A necrose e a acidose - fenômenos resultantes da hipóxia e da glicólise locais, respectivamente -, juntamente com o acúmulo de fatores de crescimento, citocinas anti-inflamatórias e quimiocinas, como TGF- β , VEGF, IL-10 e CXCL12, atuam para promover um TME imunossupressor, recrutando células imunes anti-inflamatórias ou reprogramando populações celulares efetoras em populações alternativamente ativadas ou exaustas, que são incapazes de eliminar eficientemente as células tumorais¹³. O ambiente anti-inflamatório se torna ideal para o recrutamento de células mieloides supressoras (MDSCs) via CXCL8⁹⁻¹⁰, de células dendríticas com capacidade de processamento e apresentação de antígenos reduzida ou inibida⁶⁻⁸, de macrófagos associados ao tumor (TAM) polarizados para o perfil M2^{13,14}, de células T CD4 convertidas em células T reguladoras (Treg) através do acúmulo de CCL28, CCL17, CCL22^{11,12}, de neutrófilos associados ao tumor (TAN) polarizados para neutrófilos N2 e de células T CD8 e natural killers (NK) exaustas¹²⁻¹⁴.

1.2 Resposta Imune no câncer

Um dos principais mecanismos de proteção contra tumores é a morte de células tumorais por linfócitos T, em especial, por linfócitos T CD8 citotóxicos (CTLs). Estas células são ativadas dentro do linfonodo por células apresentadoras de antígeno (APCs) que já passaram pelo processo de reconhecimento e processamento de antígenos tumorais e por células T auxiliares. Após a ativação e expansão, os CTLs migram para a região tumoral, onde são capazes de reconhecer antígenos tumorais expressos via MHC-I e erradicar as células tumorais de forma seletiva¹⁵(**Fig. 1**). Valendo-se de mecanismos efetores bastante sofisticados, os CTLs patrulham a superfície das células que compõem o TME. No momento em que um determinado antígeno tumoral é reconhecido com alta avidéz, um processo complexo de eliminação tumoral é então orquestrado. Com a formação da sinapse imunológica, tão necessária para a discriminação antigênica, ao reconhecer um antígeno estranho, as CTLs produzem e secretam perforinas na fenda sináptica, com posterior indução de poros na superfície tumoral. Os poros formados facilitam a ação de granzimas, que rapidamente promovem a morte tumoral por apoptose, um mecanismo dependente da via das caspases. No entanto, apesar da presença das CTLs, mesmo tumores altamente imunogênicos progridem frequentemente¹⁶.

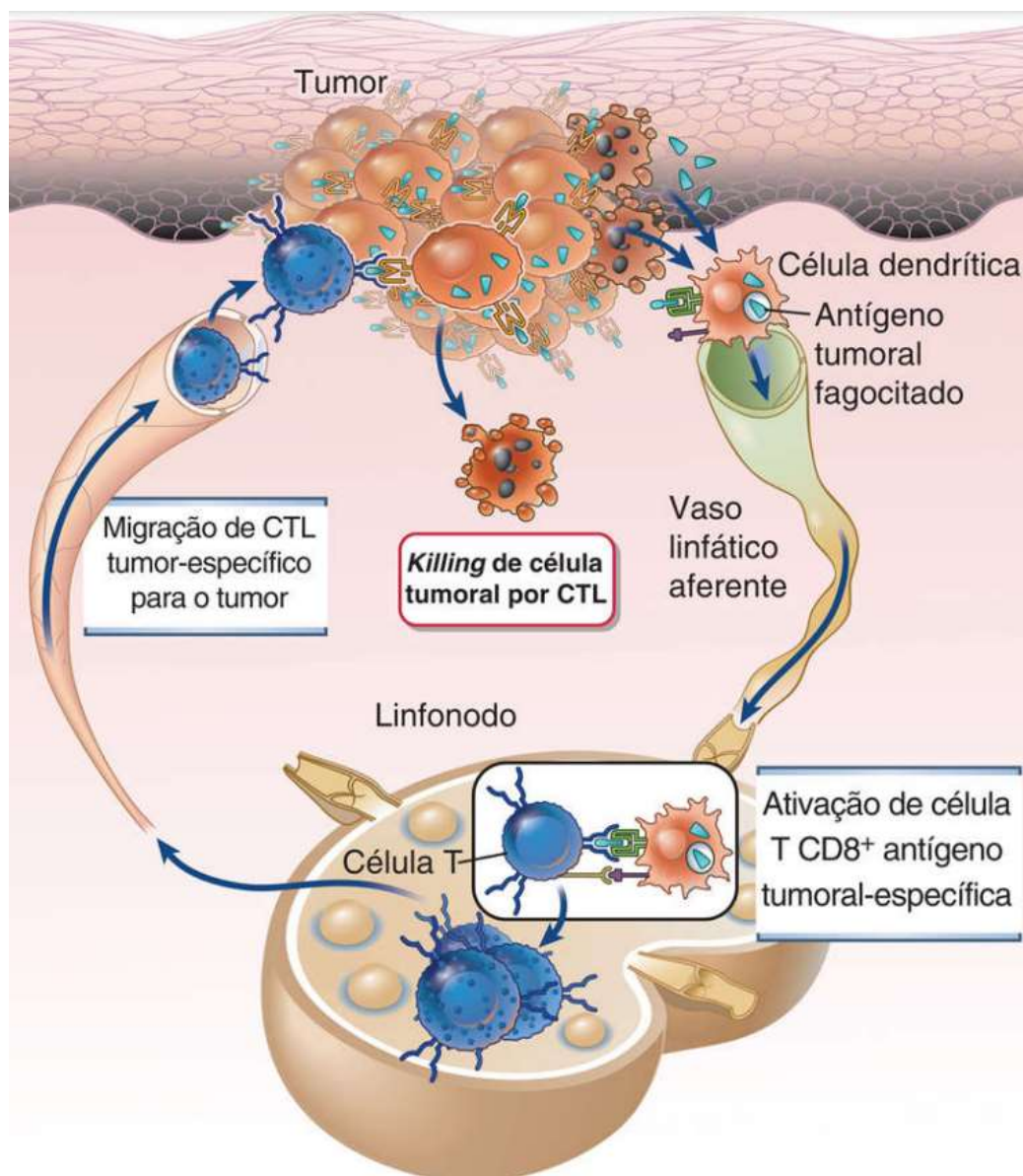


Figura 1. Resposta de linfócitos T citotóxicos (CTL) contra tumores. Células dendríticas capturam e processam antígenos tumorais, migram para os linfonodos drenantes e apresentam os antígenos para células T, que sofrem expansão clonal. As células T reativas migram para o sítio tumoral, onde desempenham as suas funções efetoras.

Fonte: Adaptado de Abbas A.K., Lichtman A.H. *Imunologia Básica* 9ª Edição

O processo de progressão tumoral está frequentemente associado com a aquisição de um estado disfuncional por CTLs¹⁷. Este estado disfuncional, também conhecido por exaustão celular¹⁸, é causado pela apresentação de antígenos e neoantígenos tumorais de forma crônica e persistente às CTLs. Como consequência, os CTLs se tornam incapazes de desempenhar suas atividades citotóxica e inflamatória, o que compromete substancialmente a sua capacidade de eliminação tumoral. Tais mudanças funcionais são acompanhadas de mudanças fenotípicas. Os CTLs exaustos passam a expressar diversos receptores inibitórios, como a proteína de morte

programada 1 (PD-1), proteína Ig dos domínios de mucina e imunoglobulina de célula T (TIM3), gene 3 de ativação de linfócitos (LAG3), imunoreceptor de células T com domínios imunoglobulina e ITIM (TIGIT), antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4) e CD39. Este último é sabidamente uma ectoenzima pertencente à família das ectonucleotidases e que foi inicialmente descrita em células T reguladoras (Tregs). À época, notou-se que o CD39 e o CD73 expressos conjuntamente na superfície de Tregs atuam na conversão do ATP disponível no meio extracelular em adenosina, uma molécula com alto potencial supressor. Atribuiu-se assim um papel estritamente supressor ao CD39. Recentemente, porém, com o advento de ferramentas multi-ômicas e o maior entendimento da complexidade funcional e fenotípica das células imunes, o CD39 também tem sido identificado em outras células imunes e tem ganhado contornos funcionais que vão além da atividade de ectonucleotidase em Tregs. Por exemplo, em linfócitos T CD8, o CD39 tem sido descrito como um marcador de exaustão celular¹⁹. No TME, o CD39 é expresso seletivamente por células T CD8 reativas ao tumor^{20,21}. Os linfócitos T CD8 CD39⁺ intratumorais são enriquecidos em genes associados à proliferação e exaustão, à produção prejudicada de Interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 2 (IL-2)²² e exibem uma diversidade reduzida de clonótipos de TCR. Além disso, os linfócitos T CD8 CD39⁺ são abundantemente encontrados no TME de diversos tipos tumorais, incluindo bexiga²³, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC), melanoma, câncer de cólon, câncer retal, câncer de pulmão, CRLM e câncer de ovário²⁴ mama e melanoma²⁵ ovário²⁶ e carcinoma renal de células claras²⁷. Frequentemente, a presença dos linfócitos T CD8 CD39⁺ intratumorais está associada a um melhor prognóstico para o paciente, com exceção do carcinoma renal de células claras, dentre os aqui citados²⁸. Ratificando essa ideia, dados preliminares do nosso grupo mostram a capacidade antitumoral dos linfócitos T CD8 CD39⁺ intratumorais. Nesse sentido, o CD39 surge como um marcador que caracteriza uma subpopulação de linfócitos T CD8 antitumorais, porém em estado de exaustão.

A imunidade inata também pode contribuir de forma significativa para a proteção contra tumores, principalmente através da ação antitumoral das células NK. As células NK foram identificadas pela primeira vez em 1975 e classificadas como linfócitos efetores inatos por exibir atividade citotóxica contra células tumorais, elas representam de 5 a 15% de todas as células mononucleares presentes na corrente sanguínea e no baço e são um componente importante da resposta imune antiviral e antitumoral²⁹. Essas células são vistas como células efectoras citotóxicas que possuem uma capacidade de matar células infectadas ou disfuncionais como as células tumorais, de forma rápida e sem necessidade de uma pre-ativação, através da

liberação de perforina-1 e granzimas (**Fig. 2A**). Elas também desempenham um papel importante no estímulo e recrutamento de outras células do sistema imunológico através da liberação de citocinas como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos GM-CSF, IL-10 e IL-13^{30, 31}. Dessa forma, as células NK podem atuar de forma direta, matando células infectadas e disfuncionais, ou indireta, através da ativação de macrófagos via IL-12/IFN- γ , onde os macrófagos secretam à IL-12 que faz as células NK produzirem o IFN- γ que ativa os macrófagos para matarem os microrganismos fagocitados (**Fig. 2B**)¹⁵. As células NK também podem atuar na imunidade adaptativa, trabalhando em conjunto com as células B através da citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC)³², processo no qual as células NK matam as células alvo que foram recobertas com anticorpos IgG que são reconhecidos por meio dos seus receptores Fc.

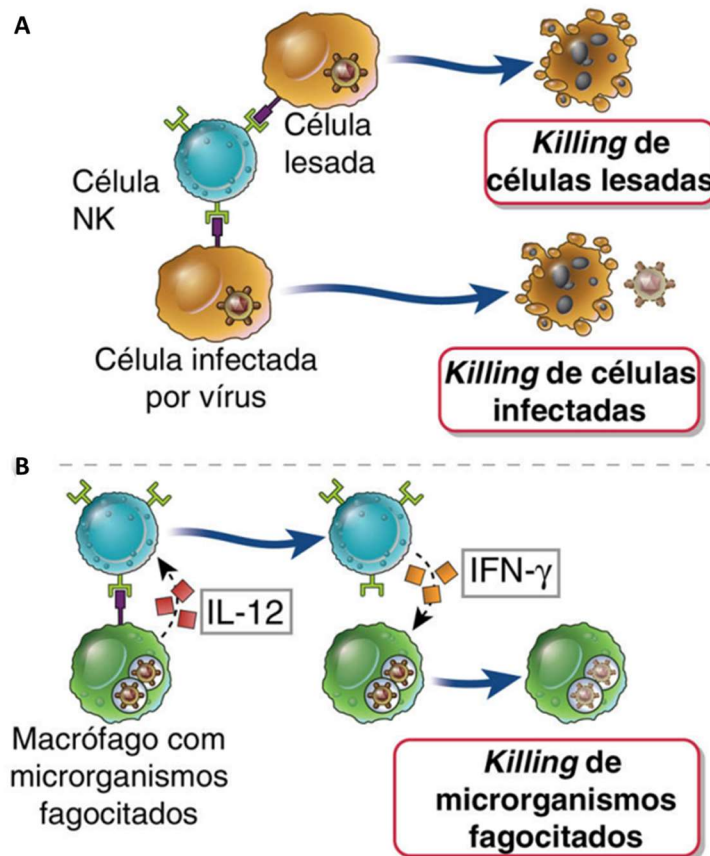


Figura 2. Funções efetoras das células NK. (A) Reconhecimento de células estressadas ou infectadas por células NK. (B) Ativação de macrófagos por células NK produtoras de IFN- γ .
Fonte: Adaptado de Abbas A.K., Lichtman A.H. Imunologia Básica 9ª Edição

As atividades funcionais das células NK são reguladas por um balanço fino entre

receptores de ativação e de inibição expressos normalmente na sua superfície³³. Durante o reconhecimento celular, há um equilíbrio entre sinais de ativação e de inibição enviados por ligantes expressos em células normais, o que impede a ativação das células NK. Contudo, no câncer, este equilíbrio é quebrado, sobretudo quando as células tumorais regulam negativamente a expressão de MHC-I, a fim de evitar a ação de CTLs, visto que moléculas de MHC-I são o principal estímulo inibitório no controle das células NK^{34, 35}, tumores que deixam de expressá-las tornam-se permissivos à ação citotóxica das células NK³⁶. Assim, durante o reconhecimento de células tumorais que regulam negativamente a expressão de MHC-I, os sinais de ativação das células NK se sobressaem aos de inibição, tornando-as ativadas. Como consequência, as células NK podem eliminar as células tumorais por mecanismos citotóxicos bastante parecidos aos descritos anteriormente para CTLs³⁷.

Mecanismos adicionais de escape da morte de células tumorais mediada por células NK podem envolver o engajamento de outros receptores inibitórios, além dos receptores que interagem com as moléculas de MHC-I. Dentre esses receptores estão os *immune checkpoints* TIGIT, PD-1, CD96, LAG3 e TIM3, cujos ligantes podem ser regulados positivamente por células tumorais e, assim, inibir os efeitos antitumorais das células NK³⁸.

1.3 Colangiocarcinoma

O Colangiocarcinoma (CCA) é um câncer extremamente agressivo que afeta as células epiteliais dos dutos biliares. Como os sintomas são observados apenas em estágios mais avançados da doença, quando as células tumorais bloqueiam o trato biliar, o CCA é quase fatal quando diagnosticado^{39,40}. O CCA é classificado em dois tipos distintos, de acordo com a sua localização anatômica ao longo dos ductos biliares, a saber: o intra-hepático (iCCA) e o extra-hepático (eCCA). O iCCA surge nos ductos biliares periféricos dentro do parênquima hepático, é o subtipo mais raro, representando cerca de 10% de todos os CCA. Já o eCCA é mais heterogêneo e pode ser classificado em dois subtipos bem diferenciados, de acordo com características histológicas e moleculares (ref hayashi / chung, pegar no zotero): o peri-hilar (pCCA), que surge próximo à confluência dos ductos intra-hepáticos direito e esquerdo com o ducto biliar comum; e o distal (dCCA), que surge na porção do ducto biliar comum¹⁶.

Apesar de ser um tumor raro, o CCA é a segunda neoplasia hepática mais comum, atrás apenas do carcinoma hepatocelular (HCC), e representa cerca 3% de todos os tumores gastrointestinais. A incidência e as causas do CCA variam entre os subtipos e regiões

geográficas em todo o mundo. Em países com IDH alto, a incidência de CCA é baixa, variando entre 0,35 a 2 casos por 100.000 habitantes anualmente. No entanto, em algumas regiões da China e Tailândia, onde a incidência de CCA está relacionada com a infecção pelos parasitas trematódeos *Opisthorchis viverrini*, *O. felinus* e *Clonorchis sinensis*, esses parasitas se instalam nos ductos biliares causando inflamação e sua infecção é causada pelo consumo de peixe cru infectado, essa incidência pode chegar a 115 casos por 100.000 homens ou 40 casos por 100.000 mulheres⁴⁰⁻⁴².

Dentre os principais fatores que contribuem para a gênese do CCA, além das infecções parasitárias que são endêmicas em algumas regiões da Ásia, estão as doenças que são responsáveis por causar inflamação crônica da árvore biliar, como por exemplo a colangite esclerosante primária, doença autoimune caracterizada por inflamação e fibrose nos ductos biliares intra e extra-hepáticos e que promove processos pró-oncogênicos, como proliferação celular, indução de danos ao DNA e alterações da matriz extracelular. A doença de Caroli, a hepatolitíase, a cirrose e as hepatites B e C também podem contribuir para o aparecimento do CCA⁴¹⁻⁴⁴. Além disso, doença hepática associada à obesidade e diabetes, idade e sexo também são considerados fatores de risco para o surgimento de CCA. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos pacientes com CCA fora da Ásia não apresenta fatores de risco identificáveis. Mutações em genes críticos envolvidos no reparo de DNA, na proteção celular contra toxinas e na vigilância imunológica, como *MTHFR*, *TYMS*, *ABCC2*, *CYP1A2*, *KLRK1* e *MICA*, também predispõem à doença⁴³⁻⁴⁵.

O diagnóstico do CCA ainda é um desafio, e os sintomas da doença podem surgir de forma direta, com a obstrução total dos ductos biliares, ou devido a patologias subjacentes causadas por complicações do tumor, como por exemplo a doença hepática crônica. No entanto, como os sintomas são perceptíveis apenas quando a doença já se encontra em estágio avançado, essas características conferem ao CCA um caráter silencioso. Em virtude também da inespecificidade dos sintomas, os pacientes geralmente apresentam doença em estágio avançado quando diagnosticado^{41, 44, 45}.

As opções terapêuticas para o CCA ainda são bem limitadas, e a ressecção cirúrgica com intenção curativa, a mais adequada. Entretanto, tal intervenção só é possível quando os tumores são diagnosticados em estágios iniciais, o que acontece em menos de 50% dos casos para tumores extra-hepáticos e em 22% dos casos para tumores intra-hepáticos. Após a ressecção cirúrgica, o prognóstico para estes pacientes ainda é preocupante. Estima-se que a sobrevida global mediana é de 40 meses, e a sobrevida em 5 anos varia de 25 a 40% para iCCA. Nos casos

de pCCA e dCCA, a sobrevida em 5 anos é de 30% a 41% e 27 a 37%, respectivamente⁴⁴.

1.4 Resposta Imune em Colangiocarcinoma

A falta de estudos abrangentes em CCA, decorrente da dificuldade em se obter um número razoável de amostras de pacientes, prejudica o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da doença, e a cirurgia continua sendo a única opção potencialmente curativa⁴⁶. Nesse sentido, a nossa compreensão da composição imune intratumoral e de como as células imunes interagem entre si em pacientes com CCA ainda é limitada.

Estudos realizados nos últimos anos têm se limitado a mostrar a presença de poucos marcadores celulares relacionados a populações imunes no tumor, principalmente por meio de ensaios de imuno-histoquímica. Em geral, sabe-se que linfócitos T CD4 e T CD8 estão abundantemente infiltrados no tumor, e tal perfil está associado a uma sobrevida global mais longa em pacientes com CCA⁴⁷. As células B, embora menos abundantes, também parecem exercer um papel importante no CCA, visto que um maior infiltrado de linfócitos B também está relacionado a uma sobrevida global mais longa^{47, 48}. Portanto, as células B e T parecem conferir benefício clínico para pacientes com CCA. Ao contrário, a presença de neutrófilos, macrófagos e células T reguladoras no microambiente tumoral parece ter uma associação negativa com a presença e resposta de células T CD8, conferindo a esses pacientes um pior prognóstico⁴⁸.

Nos últimos anos, as terapias com inibidores de *checkpoint* imunológico têm se estabelecido como uma opção de terapia sistêmica eficaz para o tratamento de muitos tumores sólidos. No entanto, apesar de alguns estudos mostrarem uma alta frequência da expressão de PD-L1 em pacientes com CCA, e que esta expressão está associada a uma pior sobrevida para esses pacientes⁴⁹⁻⁵¹, estudos que avaliam a eficácia de tratamentos com bloqueadores de *immune checkpoint* têm mostrado resultados modestos para esta linha de tratamento. Estudos clínicos de fase II, que avaliaram a eficácia e a segurança do tratamento com nivolumabe, um anticorpo monoclonal anti-PD-1, sozinho ou combinado com ipilimumabe, um anticorpo monoclonal anti-CTLA4, em pacientes com CCA metastático, mostram uma mediana de sobrevida livre de progressão modesta (2,9 a 3,1 meses) e sem diferença estatística quando avaliado o status de PD-L1 nesses pacientes^{52, 53}. Embora mais estudos sejam necessários para avaliar em definitivo a eficácia de tratamentos que visam o bloqueio do eixo PD-1/PD-L1 em pacientes com CCA, estes resultados mostram que há uma lacuna a ser preenchida quanto à caracterização do

infiltrado imune destes pacientes para que novos *immune checkpoints* com potencial terapêutico possam ser identificados.

Diante deste cenário, os dados acima sugerem que as células T e B são peças-chave necessárias para uma melhor resposta no CCA, embora ainda sejam desconhecidos potenciais mecanismos que possam contribuir para o controle tumoral. Uma das hipóteses exploradas atualmente no nosso grupo é que linfócitos T e B podem se organizar em nichos celulares que promovem intensa resposta antitumoral denominados de estruturas linfoides terciárias (TLSs). Além disso, como demonstrado mais à frente, a descoberta de populações fenotipicamente distintas de células NK em pacientes com CCA tem despertado a nossa atenção. Desse modo, temos caracterizado de forma abrangente as células imunes periféricas e infiltrantes no tumor de pacientes com CCA, com o intuito de compreender como linfócitos T e B interagem entre si e dissecar os estados funcionais das subpopulações de células NK desses pacientes.

2. JUSTIFICATIVA

As mudanças no programa intracelular das células imunes que se infiltram no tumor são conduzidas pelo dinamismo da progressão tumoral. Além disso, a migração das células imunes em direção à região intratumoral é influenciada pela composição do microambiente do tumor. Neste trabalho, lançamos a hipótese de que as células B e T estão abundantemente presentes nas regiões intratumorais de CCA. Além disso, trabalhamos com a hipótese de que células NK efetoras e reguladoras terão efeito clínico diametralmente oposto, envolvidas com melhor e pior desfechos clínicos, respectivamente.

3. OBJETIVOS

- Dissecar a composição celular imune em ressecções de tecido peritumoral e tumoral de pacientes com CCA;
- Dissecar a composição celular imune em amostras sanguíneas de pacientes com CCA;
- Caracterizar células NK efetoras e reguladoras em pacientes com CCA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Este é um estudo prospectivo, que foi submetido e aprovado pelo Comitê de ética em Pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center (CEP 2712/19). Amostras de sangue periférico, tecidos tumoral e peri-tumoral foram coletadas de pacientes diagnosticados com CCA. Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, maiores de 18 anos, sem comorbidades, que não tenham sido submetidos a terapias anti-neoplásicas prévias ou estejam fazendo uso de medicação que interfiram na resposta imune. Esses critérios visam minimizar a heterogeneidade imune entre os pacientes. Também foram coletadas amostras de sangue periférico de pacientes com CCA que não foram elegíveis para ressecção cirúrgica como primeira linha de tratamento e seguiram para quimioterapia neoadjuvante. Todas as coletas foram previamente autorizadas pelo próprio paciente mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.2 Coleta e isolamento de Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de sangue periférico dos pacientes com CCA e controles saudáveis

Para a caracterização da resposta imune dos pacientes com CCA, 8mL de sangue periférico foram coletados em tubos de EDTA num período máximo de até 10 dias antes da cirurgia. O sangue foi centrifugado a 400g por 10 minutos em temperatura ambiente para a separação do plasma sanguíneo, que foi armazenado a -80°C para procedimentos posteriores. Em seguida, o PBMC foi isolado utilizando gradiente de separação por Ficoll® Paque Plus (Cytiva); as células viáveis foram contadas fazendo uso da coloração de azul de Trypan (SIGMA) em câmara de Neubauer. Uma fração das células foi analisada a fresco por citometria de fluxo e a fração sobressalente foi armazenada em solução de criopreservação (10% DMSO + 90% de soro fetal bovino) e congelada gradualmente (1°C/min) até atingir -80°C para procedimentos posteriores. De modo paralelo, foram coletados 8 mL de sangue de 10 indivíduos saudáveis (sem diagnóstico de neoplasia maligna) com idades semelhantes (± 2 anos) aos pacientes recrutados.

4.3 Coleta de tecidos e processamento inicial

Ressecções teciduais peritumorais (tecido saudável a pelo menos 2 cm da margem tumoral) e tumorais frescas de pacientes com CCA foram coletadas no momento da cirurgia

sob supervisão de um patologista qualificado. Aproximadamente dois terços de cada peça cirúrgica foram imediatamente dissociados por digestão enzimática com coquetel de collagenases contendo 200U/mL I (Gibco), 200U/mL IV (Gibco) e 250U/mL de Benzonase Nuclease (Sigma Aldrich) por 40 minutos a 37°C. Após a digestão, as células foram filtradas, lavadas, contadas e armazenadas a -80°C em solução de criopreservação, como descrito para células sanguíneas. Um terço das amostras de tecido foi imediatamente preservado em RNALater *solution* (Invitrogen) para posterior extração de RNA.

4.4 Análise de citometria de fluxo

A fim de se caracterizar o infiltrado imune nos tumores coletados, bem como as o perfil fenotípico das células imunes periféricas, células isoladas das ressecções de tecidos e dos PBMCs foram marcadas com os seguintes coquetéis de anticorpos extracelulares: CD45 PerCP-Cy™5.5, CD3 BV785, CD4 APC/Cy7, CD8 BB515, CD56 BV421, PD-1 BV605, TIGIT PE/Dazzle594, LAG3 APC-R700, TIM3 PE e CD39 PE-Cy7, para identificação de células T, NK e NKT. Para marcação intracelular de IL-10, as células foram permeabilizadas utilizando o kit *BD Cytofix/Cytoperm* e marcadas com o anticorpo anti-IL10 APC. Para o painel de células B, foram utilizados os anticorpos CD19 APC-H7, CD20 PE, HLA-DR APC CD38 PECy7, CD45 PerCP-Cy™5.5, CXCR5 APC-R700 e CD3-FITC. Utilizamos nestes ensaios o *BD Horizon™ Fixable Viability Stain 575V* (FVS575V) para exclusão de células mortas. A leitura foi realizada utilizando-se o citômetro *BD FACSymphony™*. As análises foram feitas utilizando o software FlowJo 10.8.1, para identificar as principais populações de células imunes presentes nos sítios peri e intratumoral e na circulação sanguínea.

4.5 Ensaio de proliferação

Para o estabelecimento do protocolo de análise de proliferação de células NK, células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis foram isoladas por meio de centrifugação com gradiente de densidade Ficoll e marcadas com *CellTrace™ Violet Cell Proliferation Kit, for flow cytometry* (Invitrogen) na concentração de 2.5 µM, de acordo com a recomendação do fabricante. Para a indução da proliferação, utilizamos o protocolo estabelecido por Terrén *et al.*, (2018) ⁽⁵⁴⁾. com algumas modificações. Para tanto, as células mononucleares do sangue periférico foram mantidas durante 18 h na presença de IL-12 e IL-15 recombinantes (Biolegend) (fase de pré-ativação) nas concentrações de 10 e 100ng/mL, respectivamente, e incubadas a 37°C em meio RPMI (GIBCO) suplementado com 10% de Soro

Fetal Bovino (SFB), 1% de GlutaMax 100x (GIBCO) e 1% de penicilina/estreptomicina na concentração de 2×10^6 células/mL em placas de 24 poços. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS 1x, plaqueadas a 2×10^6 células/mL em novas placas de 24 poços e cultivadas a 37°C em RPMI suplementado pelo período de 4, 6 e 8 dias (fase de expansão) com IL-2 na concentração de 1 ng/mL. Por último, as células foram lavadas e marcadas com painel de anticorpos contendo os seguintes marcadores: CD3 PerCP-CyTM5.5.5, CD56 APC, CD39 PE-Cy7 e Sytox FITC para exclusão de células mortas. As amostras foram então adquiridas no citômetro *BD FACSymphonyTM* e analisadas no software FlowJo 10.8.1.

4.6 Análise Estatística e Representação de Dados

Os softwares GraphPad Prism v8.4.3 e FlowJo v10.8.1 foram utilizados para análise estatística e representação gráfica dos dados. Os dados foram representados mostrando médias com desvio padrão (SD) ou erro padrão da média (SEM). Foi utilizado o teste T não paramétrico de Mann Withney para determinar a diferença estatística entre os dados de pacientes e doadores saudáveis.

5. RESULTADOS

5.1 Características clínicas dos pacientes

Para a caracterização da composição imune periférica e intratumoral, foram coletadas, prospectivamente, amostras de sangue periférico e de tecidos tumorais e peritumorais de 9 pacientes com CCA submetidos à cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center, entre 2019 e 2022, conforme descrito na **Tabela 1**. A rigor, os pacientes possuem idades entre 31 e 76 anos, com média e mediana de 59 e 57 anos, respectivamente, dos quais dois terços são do sexo feminino e um terço é do sexo masculino. Os tumores eram intra-hepáticos em 44.5% dos casos, peri-hilar (33.3%) e distal (22.2%), sendo 7 do subtipo histológico de grandes ductos e um de pequenos ductos – a informação de um dos pacientes não estava disponível.

Tabela 1: Características demográficas e clinicopatológicas dos pacientes com CCA.

Características	N	%
Idade (anos)		
Média	59	
Mediana	57	
Mínima	31	
Máxima	76	
Gênero		
Masculino	3	33.3
Feminino	6	66.7
Tipo de tumor		
Colangiocarcinoma Intra-hepático	4	44.5
Colangiocarcinoma Peri-hilar	3	33.3
Colangiocarcinoma Distal	2	22.2
Tipo histológico		
Grandes ductos	7	77.8
Pequenos ductos	1	11.1
Não disponível	1	11.1

Dois pacientes, uma mulher de 74 anos e um homem de 47 anos, com tumor peri-hilar e intra-hepático, respectivamente, tiveram apenas o PBMC coletado para avaliar o perfil inflamatório sistêmico. A mulher teve cirurgia abortada para aguardar recuperação de um quadro infeccioso e não seguiu para a cirurgia posteriormente. O homem foi classificado como M1 para linfonodos mediastinais e retroperitoneais e não foi operado.

5.2 Estratégias de análise para a identificação das populações linfoides intratumorais e sistêmicas

O perfil imune dos pacientes foi avaliado por citometria de fluxo multiparamétrica utilizando-se a estratégia de *gates* descrita na **Figura 3**. Como filtro, eliminamos inicialmente os eventos *doublets* da nossa análise (**Fig. 3A**) e selecionamos em seguida as células viáveis (**Fig. 3B**) a partir da utilização do *Fixable Viability Stain 575V* (FVS575V), um corante que penetra nas células mortas ou necróticas através da membrana permeável e então se liga somente às aminas intracelulares das células mortas, possibilitando assim a separação das células vivas e das mortas. Posteriormente, segregamos os leucócitos das demais populações celulares por meio da expressão diferencial de CD45 (**Fig. 3C**), identificamos as populações linfoides a partir de parâmetros característicos de tamanho e granulosidade celulares (**Fig. 3D**) e analisamos as frequências das populações de células NK e de células T a partir da expressão de CD3 e de CD56 (**Fig. 3E**). Por fim, as células T foram classificadas em T CD4 e T CD8 a partir da expressão diferencial desses marcadores (**Fig. 3F**).

Para quantificação de linfócitos B, foi utilizada a mesma estratégia descrita nas **Fig. 3A-3D**, excluindo-se os *doublets* e identificando-se inicialmente as células vivas, então os leucócitos e por fim os linfócitos. Em seguida, as células B foram identificadas pela expressão diferencial de CD19 e CD3, sendo classificadas como CD3⁻ e CD19⁺.

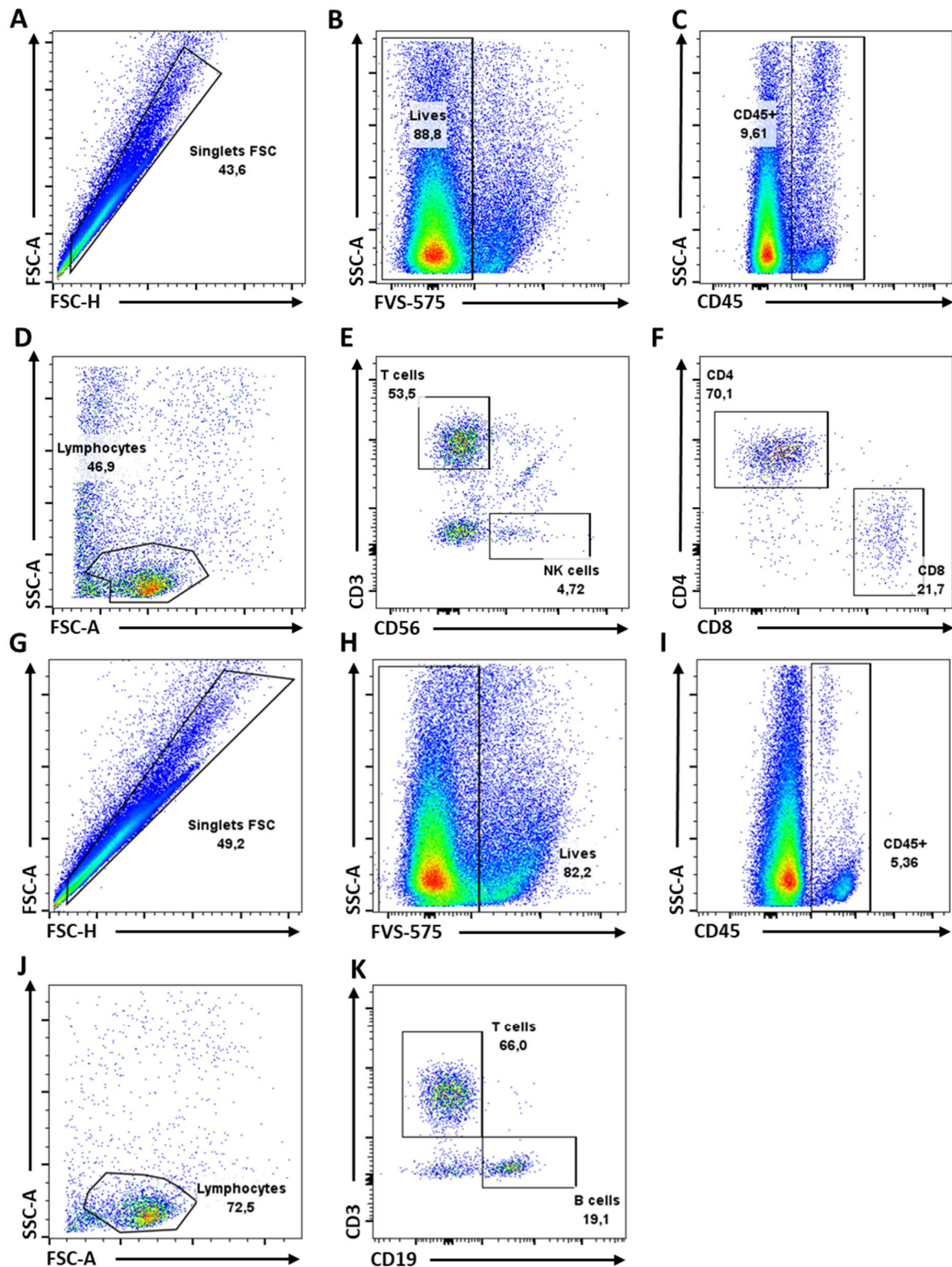


Figura 3. Estratégia de Gates. (A-G) Dotplots representativos de células do tecido tumoral de paciente com CCA intra-hepático, mostrando a estratégia utilizada para identificar a frequência de células imunes (CD45⁺), bem como populações de células T CD4, T CD8 e células NK. (H-K) Dotplots representativos mostrando a estratégia utilizada para identificar a frequência de populações de linfócitos B em amostra de ressecção tumoral de paciente com CCA. A mesma estratégia de *gates* foi utilizada para a identificação das populações imunes em amostras de tecido peritumoral e de sangue dos pacientes com CCA.

5.3 Composição imune e perfil de ativação de linfócitos T, B e NK

Feitas as devidas marcações, nós analisamos as frequências das populações imunes de origem linfóide presentes no microambiente tumoral, bem como em tecidos adjacentes livres macroscopicamente de neoplasia (referidos aqui como peritumor). Por limitações técnicas, só foi possível fazer a marcação de citometria fluxo com células frescas de 6 pacientes. As outras 3 amostras foram marcadas após descongelamento, e a viabilidade das células tumorais ficou comprometida. Neste caso, para evitarmos vieses na quantificação das proporções celulares, excluimos esses pacientes das análises de frequência de células vivas. Sobre a composição imune dos pacientes com CCA, inicialmente foi avaliada a frequência de leucócitos CD45⁺ em 6 pacientes com CCA. A frequência de leucócitos nos tecidos tumorais e peritumorais se mostrou substancialmente heterogênea, revelando frequências que variaram de 1% a 27.3% nos tecidos tumorais e de 0,4% a 46,8% nos tecidos peritumorais (**Fig. 4A**). De modo geral, não houve diferença na frequência do infiltrado inflamatório entre o tecido tumoral e o peritumoral dos pacientes analisados (**Fig. 4A**). Analogamente, não observamos diferença na abundância de células T CD4 (**Fig. 4B**) e de T CD8 totais (**Fig. 4C**) nas diferentes localizações anatômicas do tecido. Também não observamos diferença na frequência de células T CD4 ou T CD8 ativadas no compartimento tecidual em relação à periferia (**Fig. 4D-E**), embora o número de amostras analisadas nesse contexto tenha sido pequeno. Vale ressaltar, porém, que todos os pacientes analisados tiveram frequência elevada de células T CD4 e T CD8 expressando CD69, sobretudo no tecido tumoral (**Fig. 4D-E**), sugerindo que as células T do microambiente tumoral apresentam um programa funcionalmente ativo. Vale ressaltar que o número limitado de pacientes analisados quanto a frequência de CD69 foi devido a mudanças feitas durante a expansão do painel de anticorpos, com a retirada do anti-CD69 para acomodar outros marcadores celulares. Em seguida, analisamos a abundância de células imunes ativadas presentes tanto na circulação quanto no TME (**Fig. 4F**). É possível observar que os linfócitos ativados ocupam mais frequentemente o tecido tumoral do que a circulação sanguínea (**Fig. 4F**).

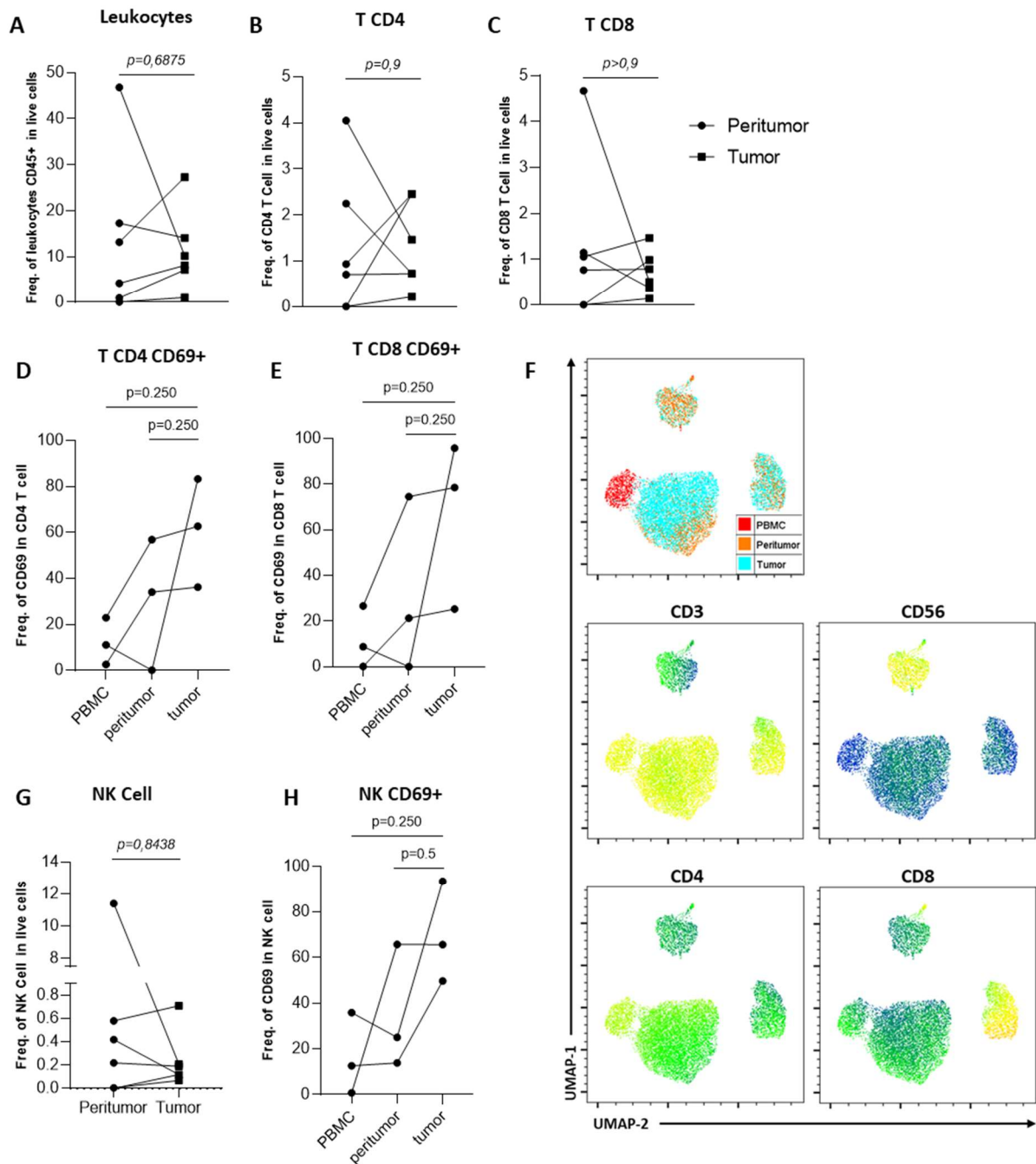


Figura 4. Caracterização da composição imune intratumoral de pacientes com CCA. (A) Frequência de leucócitos (CD45⁺) viáveis em amostras de tecido tumoral e peritumoral de pacientes com CCA. (B-C) Frequências de linfócitos T CD4 e T CD8 infiltradas em tecidos peritumorais e tumorais. (D-E) Frequência de marcador de ativação (CD69 em linfócitos T CD4 e T CD8 de amostras de tecidos peritumorais e tumorais. (F) Distribuição de células T CD4, T CD8 e NK CD69⁺ de amostras de sangue periférico, tecido peritumoral e tumoral visualizadas em UMAP e heatmap para CD3, CD56, CD4 e CD8. (G) Frequência de células NK infiltradas em amostras de tecidos peritumorais e tumorais. (H) Frequência de CD69 expresso em células NK infiltradas em tecidos peritumorais e tumorais de pacientes com CCA. Gráficos de símbolos e linhas representam amostras pareadas em cada compartimento analisado.

Quando analisamos especificamente as células NK, observamos uma frequência similar entre as regiões peritumoral e intratumoral (Fig. 4G). Como esperado, a frequência de células

NK intratumorais foi inferior à frequência de células T (**Fig. 4B-C e G**). Embora não tenhamos observado diferenças estatísticas entre as frequências de células NK ativadas no tecido tumoral e na circulação periférica, notamos que as células NK intratumorais possuem majoritariamente um perfil ativado (**Fig. 4H**), sugerindo que esta população possa estar funcionalmente ativa nesta região.

Analisamos então a frequência de células B presentes no TME de pacientes com CCA e de alguns de seus marcadores de funcionalidade, além da presença de plasmócitos, aqui caracterizados pela expressão de CD19, alta expressão de CD38, ausência da expressão do HLA-DR e expressão baixa ou ausente de CD20 (**Fig. 5A**). Encontramos frequências de células B totais similares entre as regiões intratumoral e peritumoral (**Fig. 5B**). Entretanto, as frequências de células B com fenótipo ativado (**Fig. 5C**) e de células B expressando o receptor migratório CXCR5 (**Fig. 5D**) foram maiores na circulação periférica do que no tecido tumoral. Verificamos também uma correlação positiva entre células B ativadas no tumor e na circulação (**Fig. 5E**), sugerindo um possível efeito sistêmico da inflamação causada pela doença. Embora sem diferença estatística, também observamos frequência mais elevada de plasmócitos no microambiente tumoral do que na circulação (**Fig. 5F**), sugerindo que estas células possam estar desempenhando um papel importante na formação de resposta imune antitumoral através da produção de anticorpos específicos contra antígenos tumorais.

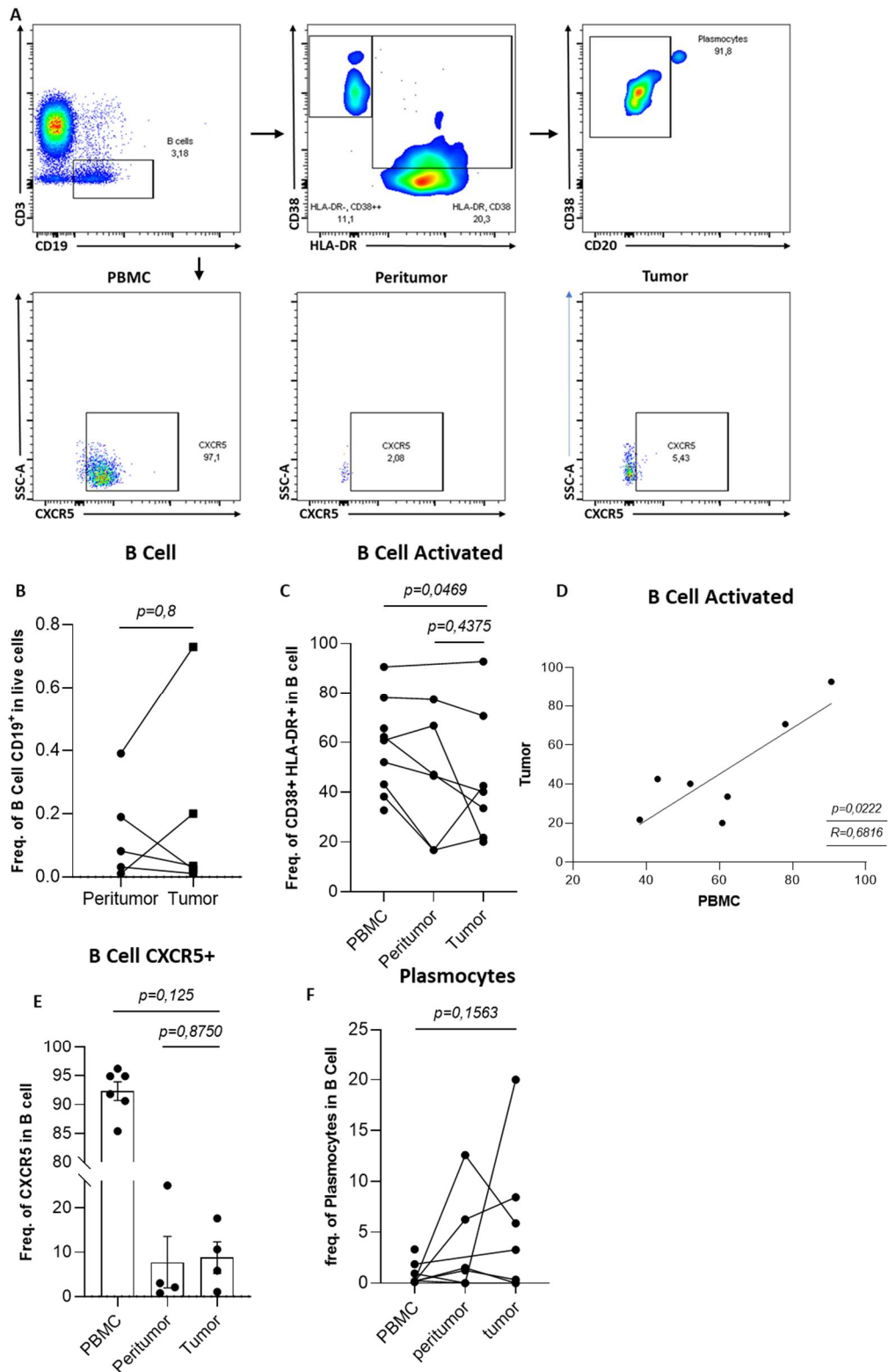


Figura 5. Caracterização da composição imune intratumoral de pacientes com CCA. (A) Dotplot representativo mostrando a estratégia utilizada para identificar células B totais ($CD19^+CD3^-$), células B ativadas ($CD19^+CD38^+HLA-DR^+$) e plasmócitos ($CD19^+CD38^{high}HLA-DR^+CD20^{low}$) (superior) e expressão de CXCR5 em células B totais do sangue periférico, peritumor e tumor. (B) Frequência de células B viáveis em amostras de tecidos peritumorais e tumorais de pacientes com CCA. (C) Frequência de marcadores de ativação (CD38) e de apresentação de antígeno (HLA-DR) em células B totais do sangue periférico, tecidos peritumorais e tumorais. (D) Gráfico de correlação das frequências de células B $CD38^+$ e $HLA-DR^+$ em amostras

de sangue periférico e tumorais de pacientes com CCA. (E) Frequência da expressão de CXCR5 em células B do sangue periférico, peritumor e tumor de pacientes com CCA. (F) Frequência de plasmócitos identificados no sangue periférico, peritumor e tumor de pacientes com CCA. Os gráficos de barra mostram a média com SEM. Gráficos de símbolos e linhas representam amostras pareadas em cada compartimento analisado.

5.4. Caracterização da composição imune sistêmica de pacientes com colangiocarcinoma

A seguir, analisamos as populações imunes intratumorais e sistêmicas quanto a expressão de marcadores anti-inflamatórios ou de exaustão celular. Analisamos, portanto, a frequência de populações imunes expressando diversos *immune checkpoints* de interesse clínico (como PD-1, CD39, TIM3, TIGIT e LAG3) e a interleucina 10 (IL-10) (uma citocina anti-inflamatória conhecida por ser expressa por populações supressoras, como as células T reguladoras) na periférica e no TME de pacientes com CCA. Curiosamente, dentre todas as populações imunes analisadas, as células CD56⁺, um marcador definidor de células NK, co-expressaram CD39, TIM3 e IL-10 em frequências significativamente maiores do que todas as outras populações linfoides identificadas na circulação dos pacientes com CCA. Os *dot plots* representativos abaixo mostram as estratégias de *gates* utilizadas para a identificação de células NK expressando tais marcadores (**Fig. 6**).

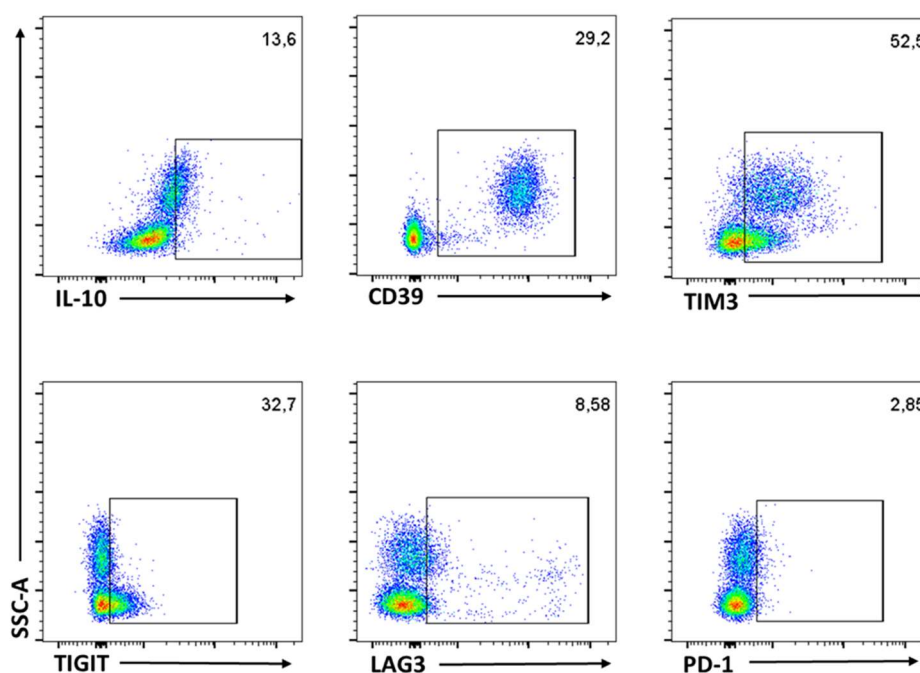


Figura 6. Dotplot representativo mostrando células CD56⁺ do sangue periférico de paciente com CCA, analisadas quanto a expressão de marcadores de exaustão e da citocina anti-inflamatória IL-10.

Desse modo, a frequência elevada de células NK do sangue periférico expressando os *immune checkpoints* CD39, LAG3, PD-1, TIGIT e TIM3, além da citocina anti-inflamatória IL-10 no grupo de pacientes com CCA nos chamou a atenção (**Fig. 6 e 7**) e passou a ser objeto de investigação. As células CD56⁺ foram heterogêneas quanto a expressão do marcador CD39, formando-se uma subpopulação CD39⁺ e outra subpopulação CD39⁻ (**Fig. 6 e 7**). Para verificar se a expressão elevada de marcadores de exaustão e de IL-10 em células NK é uma característica intrínseca ao CCA, nós avaliamos a presença da população de células NK co-expressando CD39 e IL-10 também em amostras sanguíneas de doadores saudáveis pareados em relação à idade e ao gênero com o grupo de pacientes.

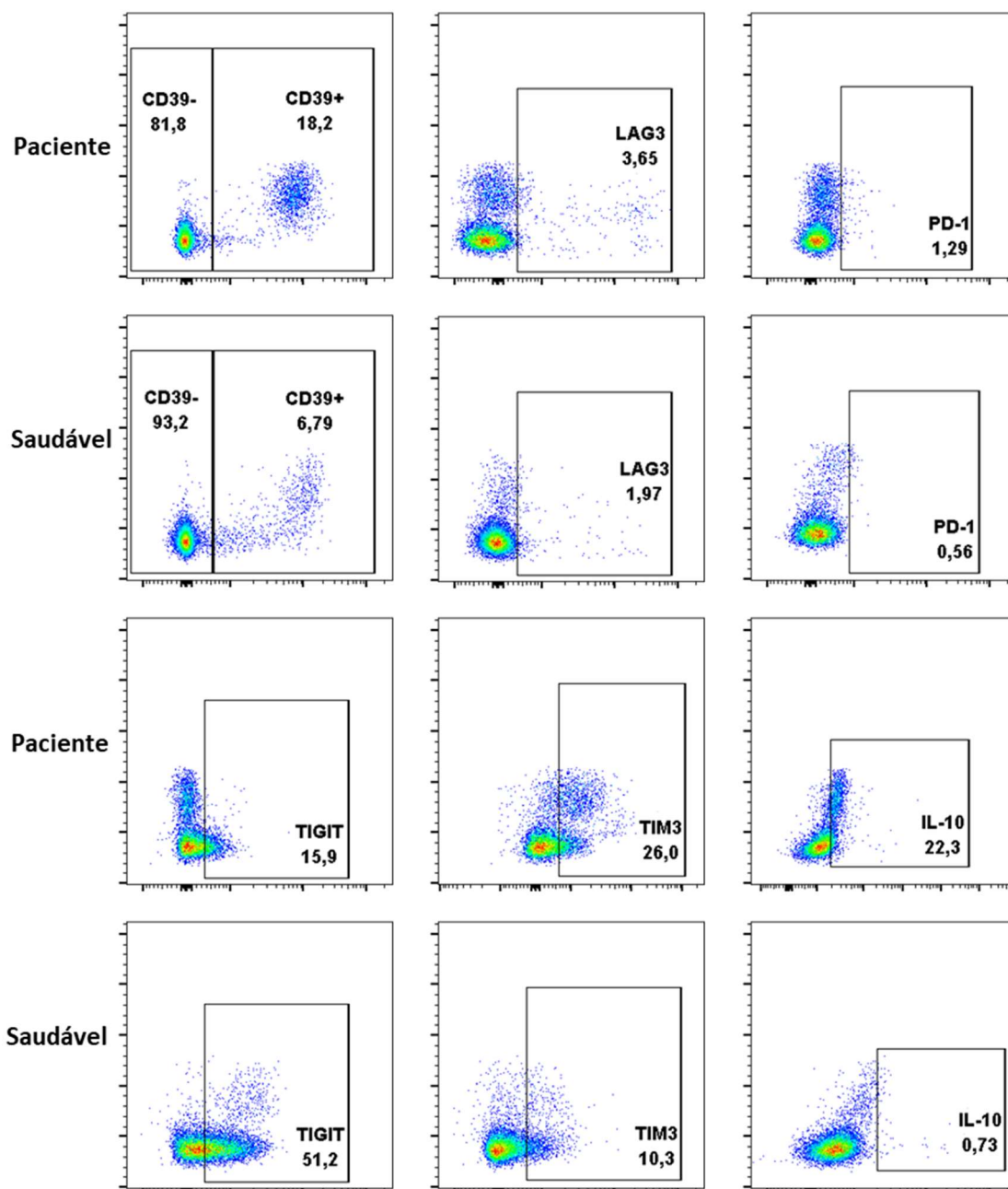


Figura 7. Expressão de marcadores de exaustão em células NK de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis. Dotplot representativo mostrando células NK do sangue periférico de paciente com CCA e doadores saudáveis pareados, analisadas quanto a expressão de marcadores de exaustão e da citocina anti-inflamatória IL-10.

Verificamos que as frequências de células NK circulantes expressando CD39, LAG3, PD-1, TIM3 ou IL-10 são significativamente maiores em pacientes com CCA do que em indivíduos saudáveis. Porém, a frequência de células NK TIGIT⁺ foi significativamente acentuada na periferia de doadores saudáveis quando comparada com aquela observada em pacientes com CCA (**Fig. 7 e 8A**). Além disso, a frequência de linfócitos T CD4 e T CD8 expressando PD-1 e TIM3 também foi significativamente mais alta no sangue periférico de

pacientes com CCA em comparação com o grupo controle (**Fig. 8 B-C**), embora a frequência de células T expressando TIM3 também estivesse reduzida nesses pacientes em comparação com o grupo controle (**Fig. 8 B-C**).

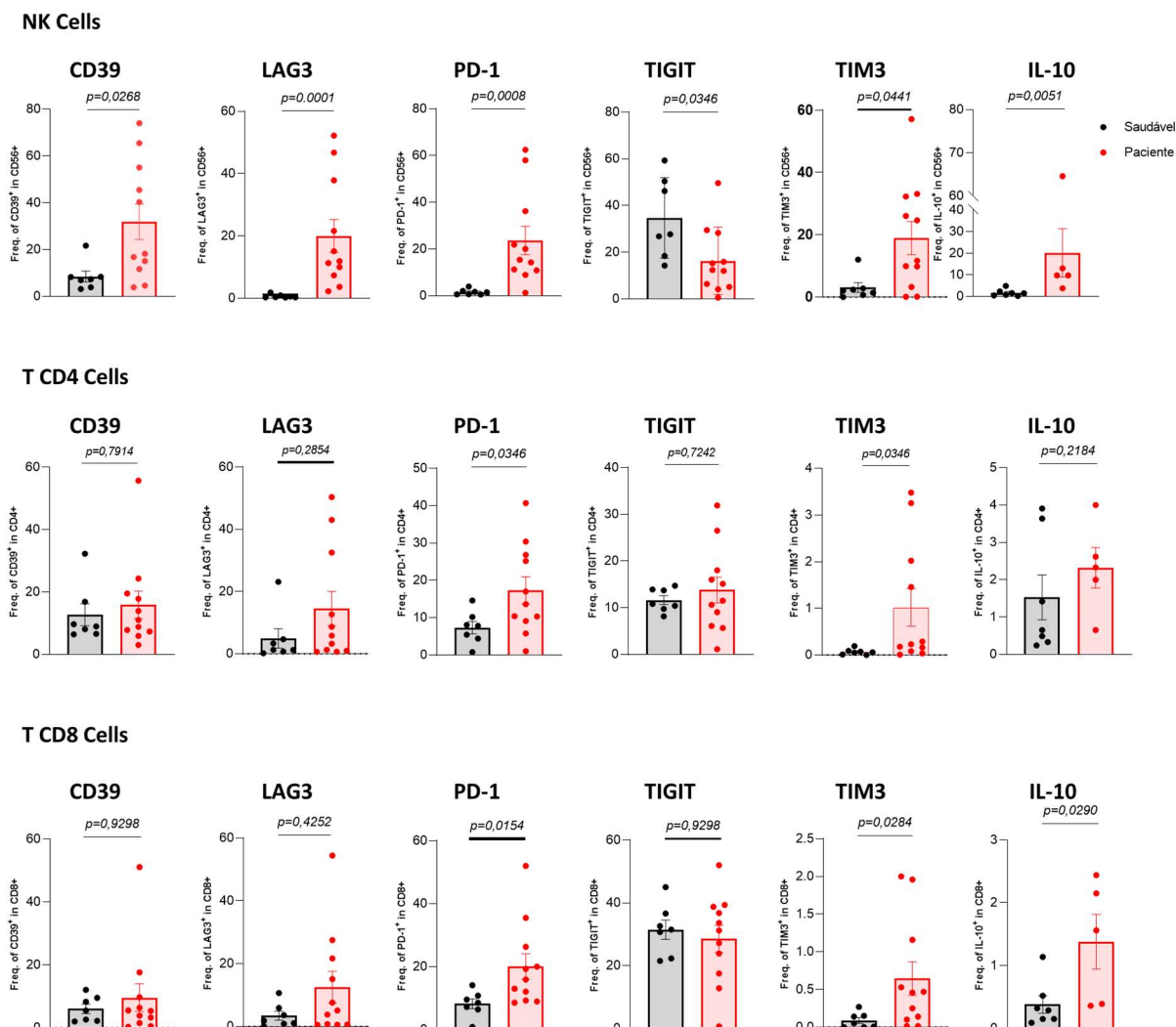


Figura 8. Expressão de marcadores de exaustão em linfócitos T e células NK de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis. Frequência de marcadores de exaustão expressos em células NK(A), linfócitos T CD4(B) e T CD8(C) de PBMCs de pacientes (n= 11) e doadores saudáveis (n= 7). Os gráficos de barra mostram a média com SEM.

5.5. Descoberta e caracterização de células NK com potencial supressor

Em seguida, notamos que as células NK poderiam, portanto, ser divididas em duas grandes populações: as células NK CD39⁻ e as células NK CD39⁺ (**Fig. 9A**). Em termos de tamanho e complexidade celulares, as células NK CD39⁺ compreendem células maiores (parâmetro FSC) e mais granulosas (parâmetro SSC) (**Fig. 9B**). Visto que o CD39 pode ser expresso em populações imunes classicamente supressoras e atuar como uma ectonucleotidase de membrana na produção de adenosina, um mediador anti-inflamatório gerado a partir da conversão do ATP, nós analisamos se outras células imunes poderiam expressar este marcador.

Curiosamente, a expressão do CD39 foi exclusivamente observada em células NK, quando comparada com a expressão vista em células T CD4 e T CD8 (**Fig. 9C**). Esses dados descartam uma eventual participação de células T reguladoras CD39⁺ na supressão da resposta imune sistêmica em pacientes com CCA. Contudo, a identificação de uma subpopulação de células NK expressando CD39 tem aberto diversas perguntas quanto as suas funções.

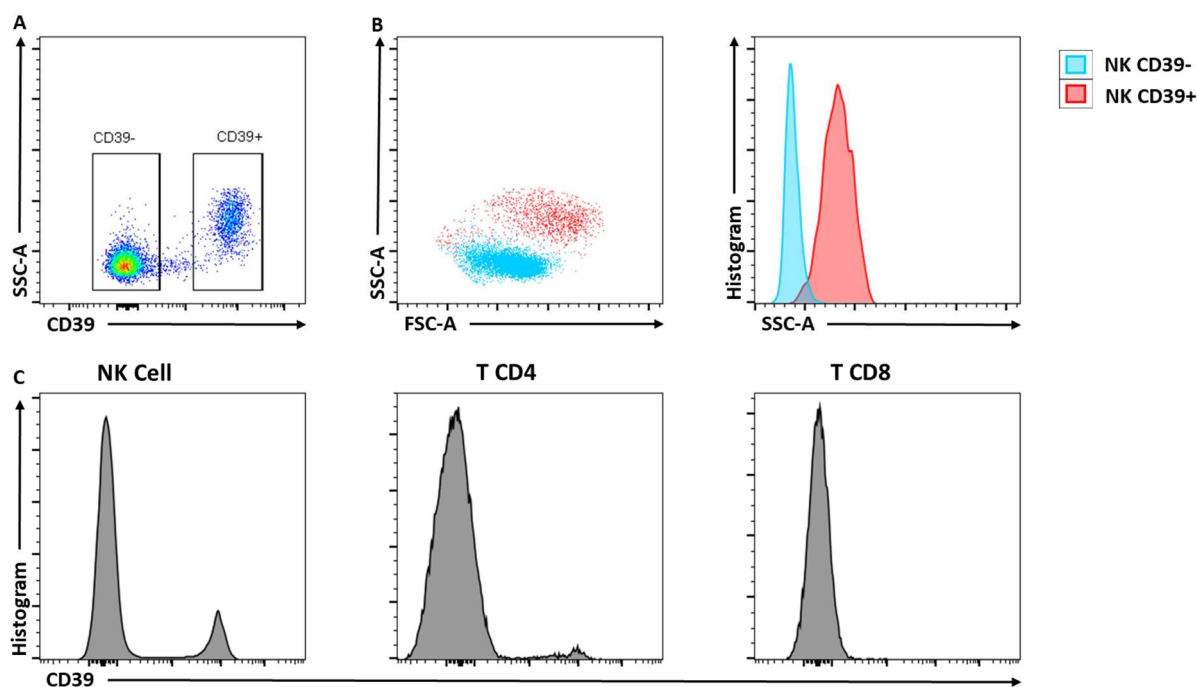


Figura 9. Caracterização de células NK clássicas e não clássicas no sangue periférico de pacientes com CCA. (A) Gate mostrando expressão de CD39 em células NK. (B) Análise dos parâmetros de tamanho e granulosidade de células NK CD39⁺ e de células NK CD39⁻ (esquerda); histograma SSC em células NK CD39⁺ e de células NK CD39⁻ (direita). (C) Histogramas representativos mostrando a expressão de CD39 em diferentes populações de células imunes.

Dada a característica supressora do CD39, avaliamos se as células NK poderiam ter caráter supressor. Analisamos, assim, se as células linfoides expressavam diferencialmente IL-10, uma citocina anti-inflamatória clássica. Verificamos que as células NK expressaram consistentemente IL-10 em frequências significativamente maiores do que as outras populações imunes analisadas (**Fig. 10A**). Quando comparamos as principais fontes celulares de IL-10 dentro das populações linfoides, as células NK foram de fato a principal população imune produtora de IL-10 na circulação dos pacientes com CCA (**Fig. 10B**). Analisamos, então, se as subpopulações de células NK CD39⁻ e NK CD39⁺ diferiam quanto à capacidade de expressão de IL-10. Encontramos que a expressão de IL-10 ocorre exclusivamente nas células NK CD39⁺ (**Fig. 10C-E**). A partir de então, passamos a classificá-las como subpopulações de células NK com fenótipos celulares bem definidos e provavelmente com funções diferentes. Definimos,

então, as i) células NK clássicas, que apresentam o fenótipo $CD3^{-}CD56^{+}CD39^{-}$, de menor tamanho e granulosidade e que não expressam IL-10; e ii) as células NK não clássicas, com fenótipo $CD3^{-}CD56^{+}CD39^{+}$, de maior tamanho e granulosidade e que expressam IL-10 (**Fig. 10C-E**). De fato, a intensidade de fluorescência média (MFI) de IL-10 nas células NK não clássicas $CD39^{+}$ é maior do que aquela observada em células NK clássicas $CD39^{-}$ (**Fig. 10F**) na circulação sanguínea dos pacientes com CCA, o que sugere uma eventual participação de subpopulações de células NK, uma com perfil inflamatório aparente e outra com perfil anti-inflamatório, no controle da resposta imune periférica de pacientes com CCA. Até onde alcança o nosso conhecimento, não há relatos de populações NK com propriedades inflamatórias duais nesses pacientes. Visto que a IL-10 é classicamente conhecida pelo seu potencial regulador, analisamos se as populações de células NK não clássicas possuem características supressoras similares a outras populações imunes anti-inflamatórias clássicas. Em uma análise de agrupamento não supervisionada utilizando-se o algoritmo UMAP, analisamos as populações linfóides dos pacientes com CCA de acordo com o seu perfil fenotípico. Nesta análise, a proximidade topológica entre as populações celulares indica uma maior similaridade fenotípica. Nesse sentido, identificamos que a população de células NK não clássicas de pacientes com CCA possuem distribuição topológica próxima a células T reguladoras (**Fig. 10G**), estas últimas sabidamente supressoras, o que sugere que as células NK não clássicas compartilham características fenotípicas que se assemelham a células T reguladoras. Em contraposição, as células NK clássicas estão topologicamente mais afastadas das populações supressoras. Em conjunto, os nossos dados sugerem a presença de pelo menos duas subpopulações de células NK na circulação dos pacientes com CCA, com características funcionais aparentemente bastante heterogêneas, a julgar, por exemplo, pela capacidade distinta de expressão de IL-10 que as distinguem.

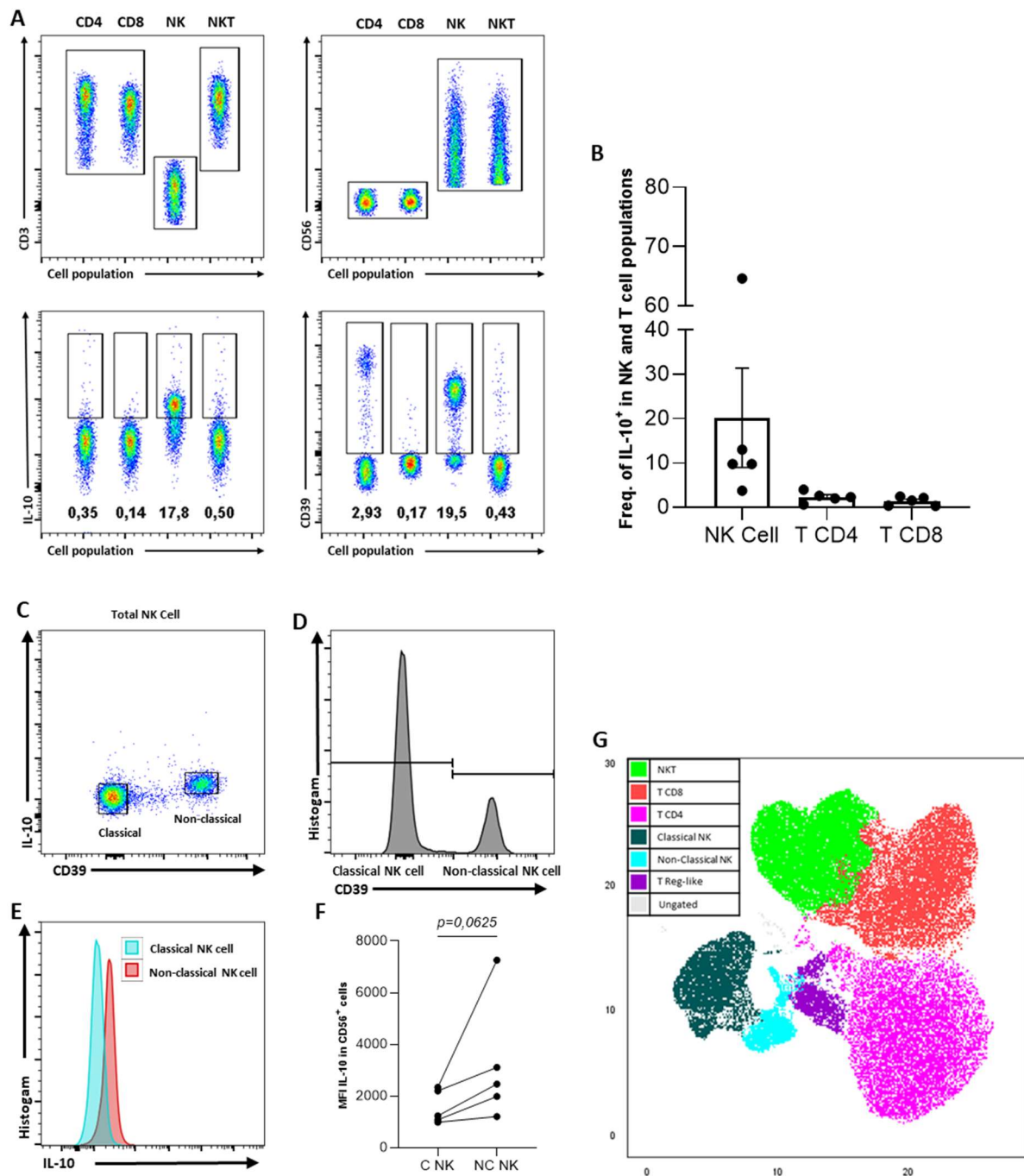


Figura 10. Caracterização de células NK clássicas e não clássicas na circulação de pacientes com CCA.

(A) Dot plot representativo mostrando a estratégia utilizada para identificar diferentes populações imunes produtoras de IL-10. (B) Frequência de células NK, T CD4 e T CD8 produtoras de IL-10. (C) Dot plot mostrando coexpressão de CD39 e IL-10, separando células NK em duas populações, clássica (esquerda) e não clássica (direita). (D) Histogramas representativos mostrando populações de células NK clássicas e não clássicas expressando ou não CD39. (E) Histogramas representativos mostrando populações de células NK clássicas e não clássicas definidas pela expressão de CD39 expressando ou não IL-10. (F) Análise da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) da expressão de IL-10 em células NK clássicas e não clássicas. (G) análise de agrupamento não supervisionada UMAP mostrando distribuição de células linfoides de PBMC de paciente com CCA.

Esses dados sugerem a potencial descoberta de uma subpopulação de células NK sistêmicas em pacientes com CCA com características supressoras e com um fenótipo celular bastante distinto das populações clássicas de células NK. Tal observação nos permitiu lançar a hipótese de que as populações de células NK não clássicas também poderiam ser encontradas no TME. Partindo deste princípio, nós analisamos se as células NK expressando CD39 estavam presentes no TME e no tecido peritumoral dos pacientes com CCA (**Fig. 11A**). De fato, nossas análises apontam para a presença desta população nas regiões peritumoral e intratumoral numa frequência bastante acentuada nos pacientes com CCA, como mostrado no *dot plot* representativo (**Fig. 11A**) e na quantificação entre os pacientes (**Fig. 11B**). Nos chama a atenção o fato de que a frequência de células NK expressando CD39 no TME seja similar à encontrada na periferia (**Fig. 11B**). De maneira análoga à observada nas células NK não clássicas da periferia, as células NK CD39⁺ do TME também expressam alta quantidade de *immune checkpoints*, como PD-1, LAG3, TIGIT e TIM3 (**Fig. 11C**). Embora não tenhamos visto a expressão de IL-10 por células NK não clássicas do TME na ausência de estímulo *in vitro* (dado não mostrado), acreditamos que, se ativadas corretamente, as células NK CD39⁺ encontradas no TME passem a expressar tal citocina anti-inflamatória. Portanto, os nossos dados sugerem que células NK com características de células NK não clássicas também possam se acumular ao longo do TME de pacientes com CCA.

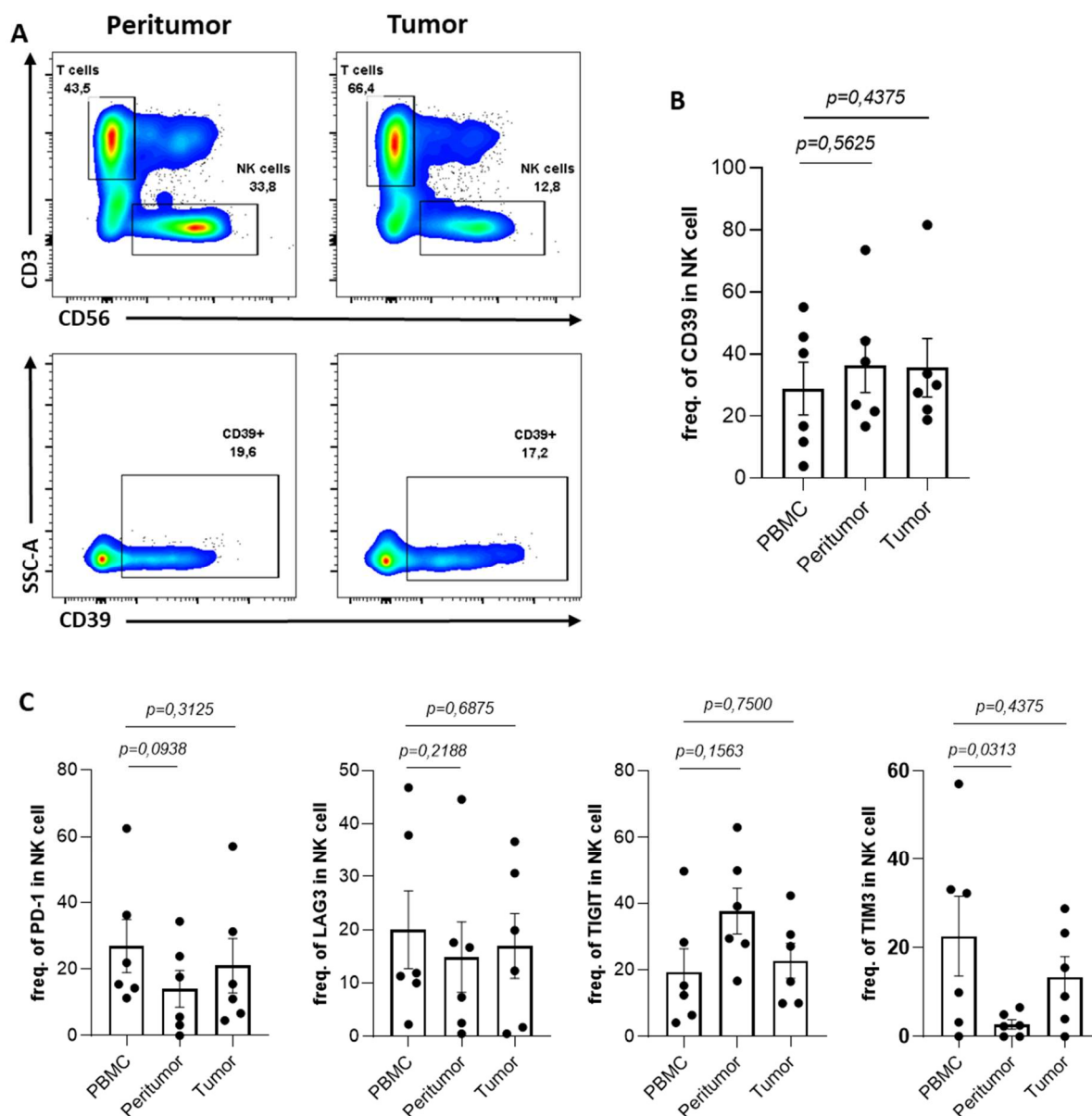


Figura 11. Caracterização de células NK no microambiente tumoral de pacientes com CCA. (A) Dot plot representativo mostrando o infiltrado de células T e NK evidenciado pela expressão de CD3 e de CD56 (Superior), além da expressão de CD39 em células NK (Inferior) presentes no microambiente peritumoral e tumoral de paciente com CCA (B). Frequência de células NK expressando CD39 no sangue, tecido peritumoral e tecido intratumoral de 6 pacientes com CCA. (C) Frequência de marcadores de exaustão expressos em células NK provenientes da circulação e de tecidos peritumoral e tumoral de 6 pacientes com CCA. Os gráficos de barra mostram a média com SEM.

Para a melhor caracterização da função das células NK CD39⁺, nós comparamos a capacidade proliferativa das duas subpopulações. Nesse sentido, nós realizamos ensaio de proliferação celular utilizando PBMC total de doadores saudáveis na fase de padronização do protocolo. As células foram marcadas com Celltrace Violet (CTV) para monitorar os níveis de proliferação celular, e, em seguida, as células foram estimuladas com as citocinas recombinantes IL-12 (10ng/mL) e IL-15 (100ng/mL) por 18 horas em uma fase de ativação.

Tal protocolo se baseou nos ensaios descritos por Terrén, *et al.* 2018 ⁽⁵⁴⁾. Em seguida, as células foram lavadas e estimuladas com IL-2 (1ng/mL) por até oito dias para a fase de expansão. Ao final dos dias 4, 6 e 8, as células foram marcadas com anticorpos contra marcadores de superfície para identificar a população de células NK (definidas como CD3⁺CD56⁺) expressando ou não CD39. As células NK CD39⁺ apresentaram maiores taxas de proliferação que as células NK CD39⁻ em todos os pontos temporais analisados, como demonstrado pela frequência de CTV Low (**Fig. 12A**). A expressão da proteína CD39 se correlacionou com o nível de proliferação das células NK, pois quanto maior a expressão de CD39 (CD39^{high}) maior a frequência de células CTV Low (**Fig. 12B**) e maior a quantidade de picos de divisão (**Fig. 12A**). Portanto, além de serem fontes exuberantes de IL-10, as células NK CD39⁺ possuem capacidade proliferativa acentuada em relação às células NK clássicas. Não tivemos tempo hábil para avaliarmos a capacidade das células NK não clássicas em expressar e produzir outras citocinas inflamatórias ou grânulos citotóxicos. Também permanece em aberto se a capacidade de eliminação tumoral é diferente entre as subpopulações clássica e não clássica.

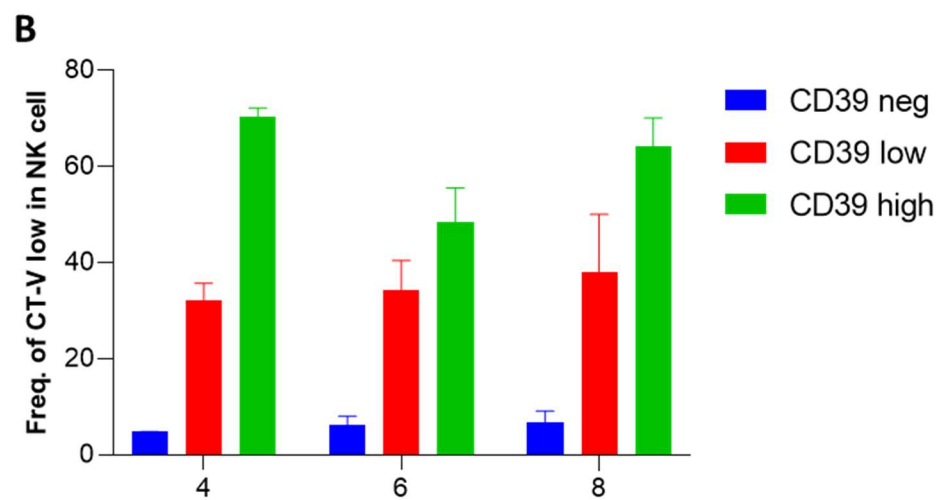
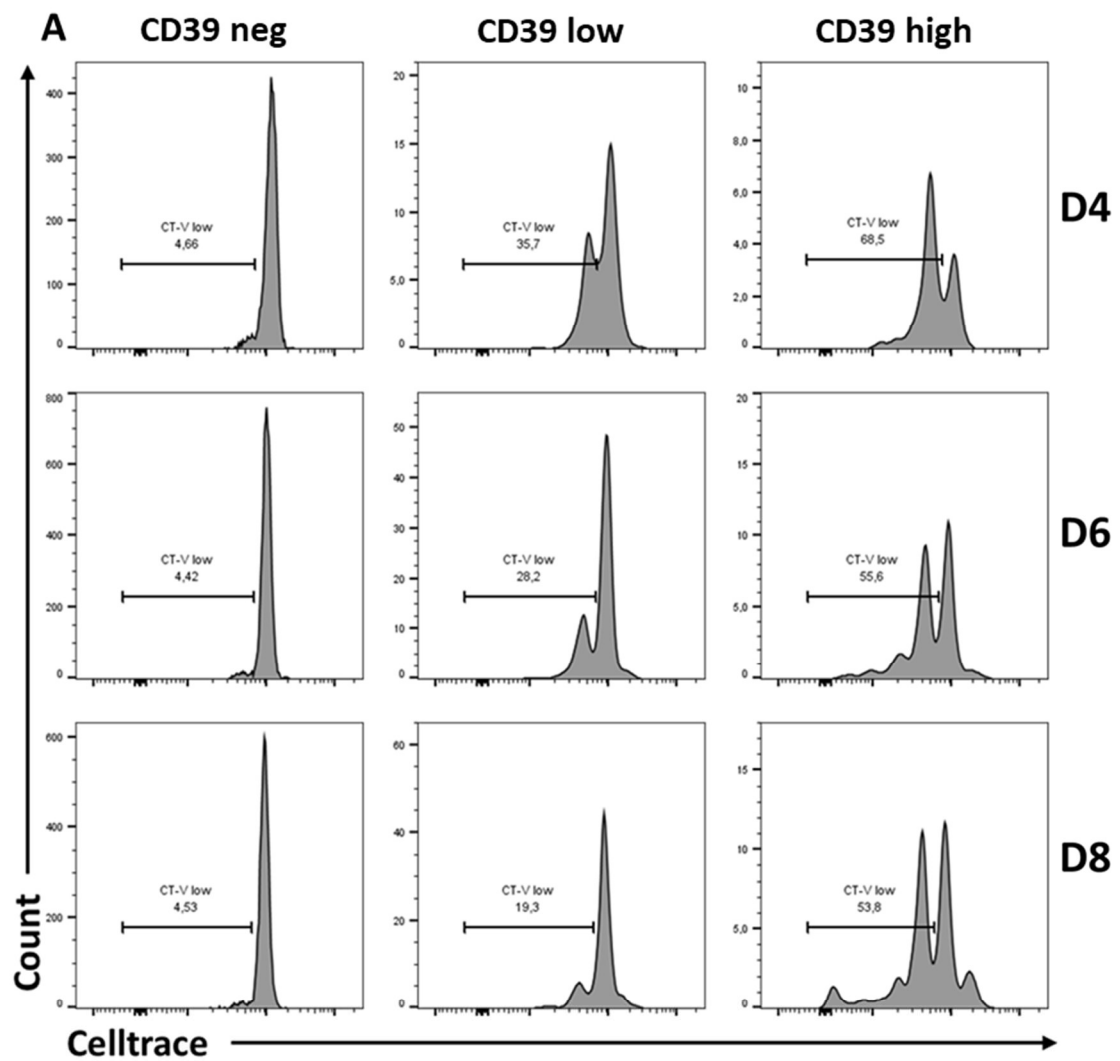


Figura 12. Proliferação induzida por IL-2 de células NK pré-ativadas por citocinas (A) Histogramas de um experimento representativo mostrando proliferação de células NK CD39^{neg}, CD39^{low} e CD39^{high} (B) Gráfico de barra mostrando frequência de células NK CD39^{neg}, CD39^{low} e CD39^{high}. (n=3). Os gráficos de barra mostram a média com SEM.

6. DISCUSSÃO

Opções terapêuticas personalizadas e eficazes para o tratamento de CCA ainda são uma necessidade não atendida pela comunidade científica. Atualmente, a ressecção cirúrgica ainda continua sendo a melhor opção terapêutica para pacientes com doença precoce. A diversidade fenotípica que caracteriza esse grupo de cânceres raros limita o avanço das pesquisas que tentam entender o comportamento da doença e propor melhores opções terapêuticas para combatê-la. Historicamente, a imunoterapia vem se mostrando eficaz para o tratamento de diversos tipos de tumores sólidos em diferentes graus de estadiamento da doença⁵⁵. Entretanto, para CCA, os estudos que avaliam a eficácia dos bloqueadores de *immune checkpoints* têm demonstrado resultados modestos e pouco promissores^{52, 53}. Por isso, entender a composição imune sistêmica e do TME de pacientes com CCA é fundamental para a compreensão da resistência aos tratamentos imunoterapêuticos e pode ser determinante na busca de alternativas terapêuticas efetoras ou de alvos terapêuticos para pacientes refratários.

Neste estudo, caracterizamos fenotipicamente populações imunes presentes na circulação sanguínea e no TME de pacientes com CCA. Embora bastante heterogêneo, o infiltrado imune presente no TME foi marcadamente dominado por linfócitos T. Como esperado, dada a exposição antigênica local, as células T expressaram majoritariamente um fenótipo ativado, denotado pelo acúmulo de CD69. Mesmo que em menor frequência e de maneira bastante heterogênea, as células B também apresentaram um perfil ativado condizente com células apresentadoras de antígeno.

O CD69 é um marcador de ativação precoce de linfócitos. Ele também é conhecido por ser expresso em células T de memória residentes de tecido. Estudos mostram que a sua expressão é necessária para o recrutamento e manutenção dessas células T em tecidos inflamados. No entanto, o seu valor prognóstico difere a depender do tipo tumoral^{56, 57}. Tais estudos demonstraram em câncer renal e colorretal que pacientes com alta expressão de CD69 em células T foi associado a uma pior sobrevida e recorrência do tumor. Contudo, utilizando modelo murino⁵⁸, foi demonstrado que o tratamento combinado de células dendríticas pulsadas com lisado de tumor renal de células Renca e anticorpo bloqueador de CD69 resultou em redução no volume tumoral e aumento na proliferação e atividade de células T. Também foi demonstrado em modelos murinos inoculados com linhagens celulares de câncer de mama, cólon e linfoma de células B que a inibição do CD69 foi suficiente para reduzir a exaustão de células T, induzir um aumento do número de linfócitos intratumorais, controlar o crescimento tumoral e aumentar a produção de citocinas como IFN- γ e TNF- α ⁵⁹.

O valor prognóstico da expressão de CD69 por linfócitos intratumorais ainda não foi avaliado. Entretanto, foi demonstrada a existência de uma população de células T CD8 co-expressando CD69 e CD103 semelhantes a células T residentes de tecido em tumores iCCA⁶⁰. Em relação as células T CD8 CD69⁻ e CD69⁺CD103⁻, as células T CD8 co-expressando CD69 e CD103 apresentavam níveis mais altos de marcadores de proliferação, ativação e especificidade celular, indicando que essa população de células T residentes de tecidos é promissora como alvo terapêutico potencial em pacientes com iCCA⁶⁰.

No CCA, os linfócitos T CD4 e T CD8 representam a maioria dos TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*). Células NK e linfócitos B são menos frequentes nesses tumores⁶¹. A maior parte dos estudos se debruça sobre a avaliação da distribuição peritumoral e intratumoral no CCA⁶²⁻⁶⁴, analisando principalmente as células T CD4 e T CD8. As células B são observadas apenas ocasionalmente nesses estudos. Em geral, a literatura mostra que as células B se infiltram mais nas áreas peritumoral do que intratumoral⁶⁵ e que a presença de células B em ambas as regiões está associada a um melhor prognóstico, com maior tempo de sobrevida.

As células B podem exercer diversas funções no microambiente tumoral. As células B podem capturar e apresentar antígenos tumorais de forma eficiente e atuar como APCs durante a apresentação antigênica para células T, conduzindo a expansão de células T e subsequente formação de memória⁶⁶. As células B podem modular a resposta imune através da produção de linfotoxinas⁶⁷, que podem facilitar a formação de estruturas linfoides terciárias⁶⁸. Por sua vez, as células B podem se diferenciar em plasmócitos, cuja principal função efetora é a de atuar através da produção de anticorpos IgG direcionados a antígenos tumorais⁶⁹. Os plasmócitos, como mostrados nos nossos dados, estão mais presentes no TME de CCA e estão frequentemente associados a respostas mais robustas de TILs em diferentes tipos de câncer, conferindo melhor prognóstico para esses pacientes.

No nosso estudo, nós descrevemos uma população de células NK com um fenótipo atípico, representado por células ligeiramente maiores e mais granulosas do que células NKs convencionais, semelhantes a monócitos circulantes quando avaliados apenas o tamanho e a granulosidade da célula. Entretanto, essas células possuem uma expressão consistente de CD56 e ausência de expressão de CD3. Vimos também que essas células possuem características de células reguladoras, como demonstrado pela expressão de CD39 e da citocina anti-inflamatória IL-10. É tentador especular que esta subpopulação de NK células, ainda não caracterizada na literatura, possa ter um impacto negativo no desfecho clínico do CCA. Denominadas neste estudo como células NK não clássicas, as células CD56⁺ co-expressando CD39 e IL-10 podem

eventualmente desempenhar função supressora sistêmica nestes pacientes, impedindo assim a indução de respostas imunes efetoras necessárias para o controle tumoral. A identificação dentro do microambiente tumoral de uma população fenotipicamente similar, caracterizada pela co-expressão de CD56 e CD39, dá sustentação a hipótese de que possa existir uma subpopulação de células NK supressoras tanto no TME quanto na periferia dos pacientes com CCA. Infelizmente, a dificuldade na obtenção de amostras e o tempo exíguo para a conclusão deste trabalho não nos permitiram realizar os ensaios funcionais necessários para a comprovação das funções supressoras de células NK CD39⁺ e nem associá-las ao desfecho clínico do CCA. Embora pouco provável, não descartamos a possibilidade de células mieloides adquirirem CD56 de maneira aberrante e passarem a expressar IL-10, já que o nosso painel de anticorpos não continha marcadores de populações mieloides – essa possibilidade será investigada à posteriori.

As células NK são classicamente caracterizadas pela expressão de CD56 e pela expressão negativa de CD3. A primeira descrição de diferentes subpopulações de células NK foi feita em 1989⁷⁰. À época, as células NK foram classificadas pela expressão diferencial de CD56 e CD16. Hoje sabemos que as células NK podem ser classificadas em diferentes subpopulações com base na expressão relativa dos marcadores de superfície CD16 e CD56. As duas principais subpopulações de células NK são as CD56^{high}CD16^{low/neg} e as CD56^{low}CD16⁺⁷¹. O subtipo de células NK CD56^{high}CD16^{low/neg} é caracterizado pela produção elevada de citocinas, como interferon- γ (IFN- γ), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), IL-10 e IL-13, além da sua alta capacidade proliferativa. Já o subtipo CD56^{low}CD16⁺ tem ação antitumoral direta e alta capacidade citotóxica, refletida pela alta produção de perforina-1 e granzimas. A maior expressão de CD16 (Fc γ RIII), um receptor que reconhece a porção Fc de anticorpos IgG, facilita a citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC)⁷². Embora proficientes na eliminação tumoral por mecanismos citotóxicos, as células NK CD56^{low}CD16⁺ possuem baixa capacidade proliferativa e estão em estágio de maturação mais avançado do que as NK produtoras de citocinas.

Embora pouco comuns e parcamente exploradas, as células NK podem produzir IL-10 em condições específicas⁷³. Em modelos murinos de infecções parasitaria e bacteriana sistêmicas, utilizando o protozoário *Toxoplasma gondii* e as bactérias gram-positiva *Listeria monocytogenes* e gram-negativa *Yersinia pestis*, a alta disponibilidade de IL-12, uma citocina pró-inflamatória fundamental para a condução de uma resposta imune polarizada para o perfil Th1, foi suficiente para induzir a expressão de IL-10 por células NK circulantes. Como

mecanismo compensatório, a própria IL-10 limitou a produção de IL-12. Adicionalmente, utilizando uma cepa atenuada da *Yersinia pestis* ou o vírus da influenza respiratória, cujas principais características são as não gerar infecções sistêmicas, mantendo a infecção apenas no sítio inflamatório, a IL-12 produzida foi insuficiente para induzir a produção de IL-10 por células NK, mas suficiente para montar uma resposta imune no local da infecção, sugerindo assim que os mecanismos que governam a indução das células NK produtoras de IL-10 sejam complexos e parcialmente dependentes de IL-12⁷⁴.

A capacidade da IL-12 de induzir a produção de IL-10 em um contexto de câncer também já foi sugerida. Em um estudo de fase I, a administração de IL-12 recombinante humana (rHuIL-12) em pacientes com câncer renal de células claras induziu um aumento rápido e transitório, de maneira dose dependente, dos níveis plasmáticos de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-8, bem como uma redução rápida, de maneira também dependente da dose, das contagens de linfócitos, monócitos e neutrófilos. Com repetidas administrações de rHuIL-12, houve um aumento persistente dos níveis plasmáticos de IL-10 e um declínio de IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-8, bem como de subpopulações de leucócitos. Portanto, a administração repetida de IL-12 diminuiu citocinas pro-inflamatórias e aumentou os níveis de IL-10 num estágio crônico do tratamento dos pacientes⁷⁵.

O papel da expressão de CD39 na função das células T em diversos tipos de tumores já é bem estabelecido, mas as informações a respeito de como o CD39 impacta na função das células NKs ainda são conflitantes. Alguns trabalhos sugerem que a expressão de CD39 nessas células indica um perfil disfuncional. Em um estudo com pacientes acometidos por carcinoma de células escamosas do esôfago (ESCC), foi demonstrado que células NK com alta expressão de CD39 têm expressão reduzida do marcador de proliferação Ki-67, além de produzirem menos IFN- γ e granzima B. A expressão do CD39 por células NK também foi associada com sobrevida livre de progressão e sobrevida global reduzidas nesses indivíduos⁷⁶. Ainda neste estudo, a IL-6 foi identificada como a principal citocina produzida por linhagens de ESCC e se encontrava elevada nos tecidos tumorais e no soro sanguíneo desses pacientes. Também foi verificado que a IL-6 induziu significativamente a expressão de CD39 em células NK humanas⁽⁷⁶⁾. Na leucemia mieloide aguda, foi verificado que células NK que expressam CD39, além de TIGIT e do receptor de adenosina A2A (A2AR), possuem atividade citotóxica reduzida e que esta atividade é restaurada quando as células são tratadas com inibidores de *immune checkpoints*⁷⁷. A expressão de marcadores de exaustão, incluindo o CD39, em células NK circulantes também foi relatada em pacientes com COVID-19⁷⁸. No caso da infecção por

SARS-CoV-2, também já foi relatado que os níveis de IL-6 circulantes aumentam com a gravidade da doença, o que poderia explicar a expressão de CD39 em células NK circulantes desses indivíduos⁷⁹.

Curiosamente, a IL-6 também contribui para a carcinogênese do CCA. A IL-6 é uma citocina pleotrópica que exerce efeitos indutores de crescimento, inibidores de crescimento e indutores de diferenciação de uma maneira específica para o tipo de célula⁸⁰. Colangiócitos saudáveis secretam constitutivamente a IL-6 e possuem capacidade de responder a esta citocina de forma autócrina, onde a IL-6 atua como um importante mitógeno para colangiócitos humanos⁸¹. A sinalização alterada de citocinas moduladoras como a IL-6 já foi implicada na regulação do crescimento do CCA⁸². A IL-6 pode regular a atividade das metiltransferases de DNA, causando hipermetilação aberrante no DNA e contribuir para a carcinogênese em CCA⁸³.

Além de ser expressa no microambiente tumoral do CCA, a IL-6 também é relatada como aumentada no soro desses pacientes⁸⁴. Dada a capacidade da IL-6 em induzir a expressão de CD39 em células NK de indivíduos com ESCC⁷⁶, é possível que esta citocina esteja envolvida com a indução da expressão de CD39 por células NK presentes na circulação e no TME de pacientes com CCA, como foi demonstrado nesse trabalho. Não conseguimos, porém, dosar a produção sistêmica e local de IL-6 ou estimular células NK com IL-6 recombinante, dada a escassez de material biológico e de pacientes com CCA. Também em virtude da dificuldade de coleta de amostras, não foi possível analisar a expressão diferencial do receptor de IL-6 nas células NK clássicas e não clássicas. Até o momento, não há evidências concretas do mecanismo pelo qual a sinalização do receptor de IL-6 possa causar o aumento da expressão do CD39 em células imunes. No entanto, nos últimos anos, estudos têm relatado funções adicionais das células NK que vão além da atuação como “matadoras naturais”, classificando-as, em alguns cenários, como “reguladoras naturais”. Esses trabalhos têm demonstrado que as células NK são altamente heterogêneas e possuem funções divergentes⁸⁵.

Um dos fatores centrais que medeiam a heterogeneidade das células NK e suas funções divergentes é localização anatômica que as células NK ocupam. As células NK podem residir em diferentes tecidos, tais como fígado, útero, pulmão, pele, glândulas salivares e linfonodo⁸⁶. As diferenças fenotípicas e relevância funcional das células NK residentes em diferentes tecidos ainda requerem investigações mais aprofundadas para que sejam reveladas. Algumas populações de células NK residentes desempenham papéis cruciais para a homeostase do órgão em que reside⁸⁷; as células NK uterinas são um bom exemplo disso. Em um trabalho que utilizou amostras frescas da decídua (porção da mucosa uterina) de mulheres que foram submetidas à

interrupção voluntária da gravidez ou a abortos espontâneos recorrentes inexplicados (URSA), foi demonstrado que a desregulação da via do catabolismo de ATP através da expressão das ectonucleotidases CD39 e CD73 possui implicações sobre a função citotóxica de células NK⁸⁸. Foi inicialmente observada redução da expressão de CD39 nas células NK e de CD73 no tecido viloso de mulheres submetidas a URSA em relação a gestantes normais. Adicionalmente, células NK decíduais isoladas de mulheres submetidas a URSA tiveram aumento na concentração de ATP e redução de adenosina *in vitro* quando comparadas com células NK da decídua de gestantes normais. A capacidade citotóxica das células NK residentes na decídua de mulheres submetidas a URSA também estava aumentada, indicando que esta desregulação na via de conversão de ATP para adenosina pode, potencialmente, contribuir para as ocorrências da URSA. Vale notar que mecanismos imunes supressores estão forte e constantemente ativados durante a gravidez, como forma de prevenir respostas inflamatórias efetoras contra o feto. Há ainda evidências de alterações na frequência e função de um subtipo de células NK uterinas durante o ciclo menstrual e durante a gravidez. Neste estudo, foi visto um aumento de frequência de um subtipo de células NK expressando CD39 durante a fase lútea do ciclo menstrual em relação a fase ovulária⁸⁹. De modo similar, foi avaliada a capacidade citotóxica de células NK circulantes na fase folicular e lútea do ciclo menstrual e foi observado que a capacidade citotóxica das células NK circulantes foi reduzida na fase lútea em relação a fase folicular⁹⁰. Apesar desses dois trabalhos não terem comparado as mesmas fases do ciclo menstrual, observar um aumento de células NK CD39⁺ residentes com menor atividade citotóxica pode indicar que células NK residentes podem exercer efeitos supressores em alguns contextos. É imperativo salientar novamente que mecanismos supressores da resposta imune também estão comumente ativados durante a o ciclo menstrual e gravidez como forma de preservar a reprodução humana.

As células NK residentes do fígado também parecem exercer funções importantes na regulação da homeostase tecidual, visto que essas células podem representar até 30% de todas as células linfóides presentes no tecido hepático⁹¹. O fígado é constantemente exposto a microrganismos, produtos microbianos e antígenos alimentares que são entregues através da veia porta do intestino. Essas especificidades requerem um aumento dos níveis de tolerância imunológica para evitar inflamação excessiva, dano tecidual e perda de função hepática⁹². Esse estado imunológico hiporresponsivo é mediado por uma interação de células hepáticas com células imunes, incluindo as células NK. Por exemplo, o fígado possui um subtipo de células NK hiporresponsivas caracterizadas pela alta expressão do receptor inibitório NKG2A e pela

expressão negativa do Ly49⁹³. Essas células podem exercer papéis anti-inflamatórios na resposta de células T por meio de mecanismos diretos ou indiretos. Células NK residentes do fígado podem secretar IL-10, que atua promovendo a inibição de células T e manutenção do fenótipo NKG2A⁺ e Ly49⁹⁴. Elas também podem modular a ativação de DCs para induzir a diferenciação de células T CD4 em células T reguladoras⁹⁵ e podem destruir diretamente células T CD4, T CD8 e células apresentadoras de antígeno⁹⁶. Também já foi demonstrado que essa população de células NK residente é expandida no fígado de pacientes com hepatite C com melhor função hepática, avaliada pela concentração de bilirrubina no sangue dos pacientes, enquanto frequências mais altas de macrófagos nos tecidos hepáticos se correlacionaram com um maior dano tecidual e maior concentração de bilirrubina no sangue⁹⁷. Em um estudo com camundongos infectados com o vírus da coriomeningite linfocitária (LCMV), foi demonstrado que células NK residentes do fígado têm capacidade de se proliferar no sítio infeccioso e controlar a atividade de células T locais, reduzindo a proliferação de células T, a eliminação viral e o dano hepático por meio do eixo PD-1-PD-L⁹⁸. Além disso, as células NK residentes expressaram o ligante PD-L1 juntamente com os marcadores de exaustão CD39, CD73 e LAG3⁹⁸. No nosso trabalho, nós demonstramos por meio de um ensaio de proliferação que células NK circulantes CD39⁺ tem uma maior capacidade proliferativa do que células NK CD39⁻. Os nossos dados abrem perspectivas clínicas interessantes, uma vez que células NK potencialmente supressoras podem facilmente se expandir quando estimuladas adequadamente. É razoável pensar que células NK não clássicas produtoras de IL-10 são facilmente encontradas na periferia de pacientes com CCA em decorrência da capacidade proliferativa elevada desta subpopulação. No entanto, ainda há questões que precisam ser investigadas, uma vez que o nosso ensaio de proliferação celular não foi suficiente para definir se de fato as células NK CD39⁺ possuem capacidade proliferativa acentuada ou se o estímulo com citocinas foi um gatilho para o aumento da expressão de CD39 somente nas células que sofreram expansão clonal.

Apesar do número crescente de evidências demonstrando o potencial das células NK reguladoras, o seu valor prognóstico, bem como um possível efeito supressor sistêmico desta população em um contexto de câncer, ainda não foi demonstrado. No entanto, já é sabido que o fígado pode exercer um efeito tolerogênico local e sistêmico⁹⁹. Num clássico estudo feito em porcos, foi demonstrado que aloenxertos hepáticos preveniam a rejeição de enxertos de pele e rim específicos do doador, indicando que o fígado do doador era capaz de gerar uma resposta imune tolerogênica sistêmica que impedia a rejeição da pele enxertada¹⁰⁰. Observando esse

cenário, parece provável que o fígado possa exercer seus efeitos tolerogênicos também no colangiocarcinoma. Entender os mecanismos que governam a tolerância imunológica do fígado e até onde ela pode influenciar na resposta sistêmica pode ser de grande relevância para propor melhores estratégias terapêuticas para pacientes com CCA, um cenário até então bastante desafiador.

7. CONCLUSÃO

A caracterização das células imunes intratumorais relevou um infiltrado imune bastante heterogêneo no microambiente tumoral de pacientes com CCA, composto principalmente de células B e T com perfil fenotipicamente ativado. Por outro lado, a caracterização das células imunes sistêmicas revelou a presença de uma subpopulação abundante de células NK não clássicas, caracterizada pela elevada expressão de CD39 e de outros *immune checkpoints*, com capacidade proliferativa acentuada e com atividade potencialmente supressora mediada pela produção de IL-10. A identificação de células NK intratumorais fenotipicamente similares às células NK não clássicas da periferia sugere uma eventual contribuição desta subpopulação para a indução de um TME supressivo. Ensaio funcionais são necessários para confirmar o potencial supressor e entender o impacto das células NK produtoras de IL-10 no desfecho do CCA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57–70.
2. Lanitis E, Irving M, Coukos G. Targeting the tumor vasculature to enhance T cell activity. *Curr Opin Immunol*. 2015;33:55–63.
3. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249–57.
4. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science*. 2005;307(5706):58–62.
5. Palazón A, Aragonés J, Morales-Kastresana A, Landázuri MO de, Melero I. Molecular Pathways: Hypoxia Response in Immune Cells Fighting or Promoting Cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1207–13.
6. Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell*. 2014;26(5):605–22.
7. Casazza A, Di Conza G, Wenes M, Finisguerra V, Deschoemaeker S, Mazzone M. Tumor stroma: a complexity dictated by the hypoxic tumor microenvironment. *Oncogene*. 2014;33(14):1743–54.
8. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol*. 2012;12(4):253–68.
9. Cui TX, Kryczek I, Zhao L, Zhao E, Kuick R, Roh MH, et al. Myeloid derived suppressor cells enhance stemness of cancer cells by inducing microRNA101 and suppressing the corepressor CtBP2. *Immunity*. 2013;39(3):10.1016
10. Alfaro C, Teixeira A, Oñate C, Pérez G, Sanmamed MF, Andueza MP, et al. Tumor-Produced Interleukin-8 Attracts Human Myeloid-Derived Suppressor Cells and Elicits Extrusion of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3924–36.
11. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang L-P, et al. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and Treg cells. *Nature*. 2011;475(7355):226–30.
12. Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H, et al. CCL17 and CCL22 chemokines within tumor microenvironment are related to accumulation of Foxp3+ regulatory T cells in gastric cancer. *International Journal of Cancer*. 2008;122(10):2286–93.
13. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*. 2014;513(7519):559–63.
14. Speiser DE, Ho P-C, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):599–611.
15. Abul K. Abbas; Andrew H. Lichtman; Shiv Pillai. *Imunologia Celular e Molecular*. 9ª Edição. Elsevier, 2019.
16. Philip M, Schietinger A. CD8+ T cell differentiation and dysfunction in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2022;22(4):209–23.
17. Speiser DE, Ho PC, Verdeil G. Regulatory circuits of T cell function in cancer. *Nat Rev Immunol*. 2016;16(10):599–611.
18. Thommen DS, Schumacher TN. T Cell Dysfunction in Cancer. *Cancer Cell*. 2018;33(4):547–62.
19. Simoni Y, Becht E, Fehlings M, Loh CY, Koo SL, Teng KWW, et al. Bystander CD8+ T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. *Nature*. 2018;557(7706):575–9.
20. Timperi E, Barnaba V. CD39 Regulation and Functions in T Cells. *IJMS*. 2021;22(15):8068.

21. Canale FP, Ramello MC, Núñez N, Furlan CLA, Bossio SN, Serrán MG, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8⁺ T Cells. *Cancer Research*. 2018;78(1):115–28.
22. Zhu W, Zhao Z, Feng B, Yu W, Li J, Guo H, et al. CD8⁺CD39⁺ T Cells Mediate Anti-Tumor Cytotoxicity in Bladder Cancer. *OTT*. 2021; 14:2149–61.
23. Duhén T, Duhén R, Montler R, Moses J, Moudgil T, de Miranda NF, et al. Co-expression of CD39 and CD103 identifies tumor-reactive CD8⁺ T cells in human solid tumors. *Nat Commun*. 2018;9(1):2724.
24. Canale FP, Ramello MC, Núñez N, Furlan CLA, Bossio SN, Serrán MG, et al. CD39 Expression Defines Cell Exhaustion in Tumor-Infiltrating CD8⁺ T Cells. *Cancer Research*. 2018;78(1):115–28.
25. Laumont CM, Wouters MCA, Smazynski J, Gierc NS, Chavez EA, Chong LC, et al. Single-cell Profiles and Prognostic Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Coexpressing CD39, CD103, and PD-1 in Ovarian Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2021;27(14):4089–100.
26. Qi Y, Xia Y, Lin Z, Qu Y, Qi Y, Chen Y, et al. Tumor-infiltrating CD39⁺CD8⁺ T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(8):1565–76.
27. Qi Y, Xia Y, Lin Z, Qu Y, Qi Y, Chen Y, et al. Tumor-infiltrating CD39⁺CD8⁺ T cells determine poor prognosis and immune evasion in clear cell renal cell carcinoma patients. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(8):1565–76.
28. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells — how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):75–87.
29. Lin AW, Gonzalez SA, Cunningham-Rundles S, Dorante G, Marshall S, Tignor A, et al. CD56⁺dim and CD56⁺bright cell activation and apoptosis in hepatitis C virus infection. *Clinical and Experimental Immunology*. 2004;137(2):408–16.
30. Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56⁺bright subset. *Blood*. 2001;97(10):3146–51.
31. Sun P, Williams M, Nagabhushana N, Jani V, Defang G, Morrison BJ. NK Cells Activated through Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity and Armed with Degranulation/IFN- γ Production Suppress Antibody-dependent Enhancement of Dengue Viral Infection. *Sci Rep*. 2019;9(1):1109.
32. Sivori S, Vacca P, Del Zotto G, Munari E, Mingari MC, Moretta L. Human NK cells: surface receptors, inhibitory checkpoints, and translational applications. *Cell Mol Immunol*. 2019;16(5):430–41.
33. Schirmmacher V, Schild HJ, Gückel B, Von Hoegen P. Tumour-Specific CTL response requiring interactions of four different cell types and recognition of MHC class I and class II restricted tumour antigens. *Immunology and Cell Biology*. 1993;71(4):311–26.
34. Cornel AM, Mimpén IL, Nierkens S. MHC Class I Downregulation in Cancer: Underlying Mechanisms and Potential Targets for Cancer Immunotherapy. *Cancers*. 2020;12(7):1760.
35. Sungur CM, Murphy WJ. Positive and Negative Regulation by NK Cells in Cancer. *Crit Rev Oncog*. 2014;19(1–2):57–66.
36. Oppenheim DE, Roberts SJ, Clarke SL, Filler R, Lewis JM, Tigelaar RE, et al. Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*. 2005;6(9):928–37.

37. Zhao X, Feng X, Liu P, Ye J, Tao R, Li R, et al. Abnormal expression of CD96 on natural killer cell in peripheral blood of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Clinical Respiratory J.* 2022;16(8):546–54.
38. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity.* 2016;44(5):989–1004.
39. Rizvi S, Eaton JE, Gores GJ. Primary Sclerosing Cholangitis as a Premalignant Biliary Tract Disease: Surveillance and Management. *Clinical Gastroenterology and Hepatology.* 2015;13(12):2152–65.
40. Valle JW, Kelley RK, Nervi B, Oh DY, Zhu AX. Biliary tract cancer. *The Lancet.* 2021;397(10272):428–44.
41. Tyson GL, El-Serag HB. Risk factors for cholangiocarcinoma. *Hepatology.* 2011;54(1):173–84.
42. Sripa B, Kaewkes S, Sithithaworn P, Mairiang E, Laha T, Smout M, et al. Liver Fluke Induces Cholangiocarcinoma. *PLoS Med.* 2007;4(7):e201.
43. Brindley PJ, Bachini M, Ilyas SI, Khan SA, Loukas A, Sirica AE, et al. Cholangiocarcinoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2021;7(1):65.
44. Razumilava N, Gores GJ. Cholangiocarcinoma. *The Lancet.* 2014;383(9935):2168–79.
45. Jong MC de, Marques H, Clary BM, Bauer TW, Marsh JW, Ribero D, et al. The impact of portal vein resection on outcomes for hilar cholangiocarcinoma. *Cancer.* 2012;118(19):4737–47.
46. Khan AS, Dageforde LA. Cholangiocarcinoma. *Surgical Clinics of North America.* 2019;99(2):315–35.
47. Goeppert B, Frauenschuh L, Zucknick M, Stenzinger A, Andrulis M, Klauschen F, et al. Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. *Br J Cancer.* 2013;109(10):2665–74.
48. Kitano Y, Okabe H, Yamashita Y, Nakagawa S, Saito Y, Umezaki N, et al. Tumour-infiltrating inflammatory and immune cells in patients with extrahepatic cholangiocarcinoma. *Br J Cancer.* 2018;118(2):171–80.
49. Jakubowski CD, Azad NS. Immune checkpoint inhibitor therapy in biliary tract cancer (cholangiocarcinoma). *Chinese Clinical Oncology.* 2020;9(1):2–2.
50. Suleiman Y, Coppola D, Zibadi S, Dalia S, Juan T, Lee JK, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and expression of PD-L1 in cholangiocarcinoma. *JCO.* 2015;33(3_suppl):294–294.
51. Gani F, Nagarajan N, Kim Y, Zhu Q, Luan L, Bhajjee F, et al. Program Death 1 Immune Checkpoint and Tumor Microenvironment: Implications for Patients With Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2016;23(8):2610–7.
52. Klein O, Kee D, Nagrial A, Markman B, Underhill C, Michael M, et al. Evaluation of Combination Nivolumab and Ipilimumab Immunotherapy in Patients With Advanced Biliary Tract Cancers. *JAMA Oncol.* 2020;e202814.
53. Gou M, Zhang Y, Si H, Dai G. Efficacy and safety of nivolumab for metastatic biliary tract cancer. *Onco Targets Ther.* 2019;12:861–7.
54. Terrén I, Mikelez I, Odriozola I, Gredilla A, González J, Orrantia A, et al. Implication of Interleukin-12/15/18 and Ruxolitinib in the Phenotype, Proliferation, and Polyfunctionality of Human Cytokine-Preactivated Natural Killer Cells. *Front Immunol.* 2018;9:737.
55. Pham T, Roth S, Kong J, Guerra G, Narasimhan V, Pereira L, et al. An Update on Immunotherapy for Solid Tumors: A Review. *Ann Surg Oncol.* 2018;25(11):3404–12.
56. Geissler K, Fornara P, Lautenschläger C, Holzhausen HJ, Seliger B, Riemann D. Immune signature of tumor infiltrating immune cells in renal cancer. *OncoImmunology.* 2015;4(1):e985082.

57. Taylor ES, McCall JL, Shen S, Girardin A, Munro FM, Black MA, et al. Prognostic roles for IL -2-producing and CD 69⁺ T cell subsets in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*. 2018;143(8):2008–16.
58. Wei SM, Pan HL, Wang L, Yin GL, Zhong K, Zhou Y, et al. Combination therapy with dendritic cell-based vaccine and anti-CD69 antibody enhances antitumor efficacy in renal cell carcinoma-bearing mice. *Turk J Med Sci*. 2017;47:658–67.
59. Mita Y, Kimura MY, Hayashizaki K, Koyama-Nasu R, Ito T, Motohashi S, et al. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *International Immunology*. 2018;30(12):559–67.
60. Kim H, Jeong S, Park S, Lee YJ, Ju YS, Kim D, et al. Implication of CD69 + CD103 + tissue-resident-like CD8⁺ T cells as a potential immunotherapeutic target for cholangiocarcinoma. *Liver Int*. 2021;41(4):764–76.
61. Liu D, Heij LR, Czigany Z, Dahl E, Lang SA, Ulmer TF, et al. The role of tumor-infiltrating lymphocytes in cholangiocarcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2022;41(1):127.
62. Asahi Y, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Kamiyama T, Orimo T, Shimada S, et al. Prognostic impact of CD8⁺ T cell distribution and its association with the HLA class I expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today*. 2020;50(8):931–40.
63. Zhou G, Sprengers D, Mancham S, Erkens R, Boor PPC, van Beek AA, et al. Reduction of immunosuppressive tumor microenvironment in cholangiocarcinoma by ex vivo targeting immune checkpoint molecules. *Journal of Hepatology*. 2019;71(4):753–62.
64. Kasper HU, Drebber U, Stippel DL, Dienes HP, Gillessen A. Liver tumor infiltrating lymphocytes: Comparison of hepatocellular and cholangiolar carcinoma. *WJG*. 2009;15(40):5053.
65. Kasper HU, Drebber U, Stippel DL, Dienes HP, Gillessen A. Liver tumor infiltrating lymphocytes: Comparison of hepatocellular and cholangiolar carcinoma. *WJG*. 2009;15(40):5053.
66. Rodríguez-Pinto D. B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology*. 2005;238(2):67–75.
67. Schrama D, thor Straten P, Fischer WH, McLellan AD, Bröcker EB, Reisfeld RA, et al. Targeting of Lymphotoxin- α to the Tumor Elicits an Efficient Immune Response Associated with Induction of Peripheral Lymphoid-like Tissue. *Immunity*. 2001;14(2):111–21.
68. Shen P, Fillatreau S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):441–51.
69. Yuen GJ, Demissie E, Pillai S. B Lymphocytes and Cancer: A Love–Hate Relationship. *Trends in Cancer*. 2016;2(12):747–57.
70. Nagler A, Lanier LL, Cwirla S, Phillips JH. Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *J Immunol*. 1989;143(10):3183–91.
71. Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F, Zimmer J. CD56 bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*. 2009;126(4):458–65.
72. Bhatnagar N, Ahmad F, Hong HS, Eberhard J, Lu IN, Ballmaier M, et al. Fc γ RIII (CD16)-mediated ADCC by NK cells is regulated by monocytes and Fc γ RII (CD32): Innate immunity. *Eur J Immunol*. 2014;44(11):3368–79.
73. Gu J, Ni X, Pan X, Lu H, Lu Y, Zhao J, et al. Human CD39hi regulatory T cells present stronger stability and function under inflammatory conditions. *Cell Mol Immunol*. 2017;14(6):521–8.

74. Perona-Wright G, Mohrs K, Szaba FM, Kummer LW, Madan R, Karp CL, et al. Systemic but Not Local Infections Elicit Immunosuppressive IL-10 Production by Natural Killer Cells. *Cell Host & Microbe*. 2009;6(6):503–12.
75. Portielje JEA, Lamers CHJ, Kruit WHJ, Sparreboom A, Bolhuis RLH, Stoter G, et al. Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses. *Clin Cancer Res*. 2003;9(1):76–83.
76. Zheng Y, Li Y, Tang B, Zhao Q, Wang D, Liu Y, et al. IL-6-induced CD39 expression on tumor-infiltrating NK cells predicts poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(11):2371–80.
77. Brauneck F, Seubert E, Wellbrock J, Schulze zur Wiesch J, Duan Y, Magnus T, et al. Combined Blockade of TIGIT and CD39 or A2AR Enhances NK-92 Cell-Mediated Cytotoxicity in AML. *IJMS*. 2021;22(23):12919.
78. Demaria O, Carvelli J, Batista L, Thibult ML, Morel A, André P, et al. Identification of druggable inhibitory immune checkpoints on Natural Killer cells in COVID-19. *Cell Mol Immunol*. 2020;17(9):995–7.
79. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636–43.
80. Yamagiwa Y, Patel T. Cytokine Regulation of Cholangiocyte Growth. In: *Madame Curie Bioscience Database* [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000-2013.
81. Matsumoto K, Fujii H, Michalopoulos G, Fung JJ, Demetris AJ. Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growth factors in vitro: interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermal growth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology*. 1994;20(2):376–82.
82. Sugawara H, Yasoshima M, Katayanagi K, Kono N, Watanabe Y, Harada K, et al. Relationship between interleukin-6 and proliferation and differentiation in cholangiocarcinoma. *Histopathology*. 1998;33(2):145–53.
83. Wehbe H, Henson R, Meng F, Mize-Berge J, Patel T. Interleukin-6 Contributes to Growth in Cholangiocarcinoma Cells by Aberrant Promoter Methylation and Gene Expression. *Cancer Research*. 2006;66(21):10517–24.
84. Cheon YK, Cho YD, Moon JH, Jang JY, Kim YS, Kim YS, et al. Diagnostic Utility of Interleukin-6 (IL-6) for Primary Bile Duct Cancer and Changes in Serum IL-6 Levels Following Photodynamic Therapy. *Am J Gastroenterology*. 2007;102(10):2164–70.
85. Schuster IS, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. “Natural Regulators”: NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol*. 2016;7.
86. Hashemi E, Malarkannan S. Tissue-Resident NK Cells: Development, Maturation, and Clinical Relevance. *Cancers*. 2020;12(6):1553.
87. Mikulak J, Bruni E, Oriolo F, Di Vito C, Mavilio D. Hepatic Natural Killer Cells: Organ-Specific Sentinels of Liver Immune Homeostasis and Physiopathology. *Front Immunol*. 2019;10:946.
88. Zhu J, Song G, Zhou X, Han TL, Yu X, Chen H, et al. CD39/CD73 Dysregulation of Adenosine Metabolism Increases Decidual Natural Killer Cell Cytotoxicity: Implications in Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion. *Front Immunol*. 2022;13:813218.
89. Whettlock EM, Woon EV, Cuff AO, Browne B, Johnson MR, Male V. Dynamic Changes in Uterine NK Cell Subset Frequency and Function Over the Menstrual Cycle and Pregnancy. *Front Immunol*. 2022;13:880438.

90. Souza SS, Castro FA, Mendonça HC, Palma PVB, Morais FR, Ferriani RA, et al. Influence of menstrual cycle on NK activity. *Journal of Reproductive Immunology*. 2001;50(2):151–9.
91. Li F, Tian Z. The liver works as a school to educate regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(4):292–302.
92. Highton AJ, Schuster IS, Degli-Esposti MA, Altfeld M. The role of natural killer cells in liver inflammation. *Semin Immunopathol*. 2021;43(4):519–33.
93. Lassen MG, Lukens JR, Dolina JS, Brown MG, Hahn YS. Intrahepatic IL-10 Maintains NKG2A⁺ Ly49[−] Liver NK Cells in a Functionally Hyporesponsive State. *J. Immunol*. 2010;184(5):2693–701.
94. Lassen MG, Lukens JR, Dolina JS, Brown MG, Hahn YS. Intrahepatic IL-10 Maintains NKG2A⁺ Ly49[−] Liver NK Cells in a Functionally Hyporesponsive State. *J. Immunol*. 2010;184(5):2693–701.
95. Jinushi M, Takehara T, Tatsumi T, Yamaguchi S, Sakamori R, Hiramatsu N, et al. Natural killer cell and hepatic cell interaction via NKG2A leads to dendritic cell-mediated induction of CD4⁺ CD25⁺ T cells with PD-1-dependent regulatory activities: NK receptor in DC induction of Treg cells. *Immunology*. 2007;120(1):73–82.
96. Zwirner NW, Domaica CI, Fuertes MB. Regulatory functions of NK cells during infections and cancer. *J Leukoc Biol*. 2021;109(1):185–94.
97. Doyle EH, Aloman C, El-Shamy A, Eng F, Rahman A, Klepper AL, et al. A subset of liver resident natural killer cells is expanded in hepatitis C-infected patients with better liver function. *Sci Rep*. 2021;11(1):1551.
98. Zhou J, Peng H, Li K, Qu K, Wang B, Wu Y, et al. Liver-Resident NK Cells Control Antiviral Activity of Hepatic T Cells via the PD-1-PD-L1 Axis. *Immunity*. 2019;50(2):403–417.e4.
99. Li F, Tian Z. The liver works as a school to educate regulatory immune cells. *Cell Mol Immunol*. 2013;10(4):292–302.
100. Calne RY, Sells RA, Pena JR, Davis DR, Millard PR, Herbertson BM, et al. Induction of Immunological Tolerance by Porcine Liver Allografts. *Nature*. 1969;223(5205):472–6.