

Tesis de Posgrado

Células dendríticas en la inmunoterapia del cáncer : desarrollo de una vacuna anti- melanoma en un modelo experimental

Goldszmid, Silvana Romina

2003 12

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Goldszmid, Silvana Romina. (2003 12). Células dendríticas en la inmunoterapia del cáncer : desarrollo de una vacuna anti-melanoma en un modelo experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3699_Goldszmid.pdf

Cita tipo Chicago:

Goldszmid, Silvana Romina. "Células dendríticas en la inmunoterapia del cáncer : desarrollo de una vacuna anti-melanoma en un modelo experimental". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003 12.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3699_Goldszmid.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

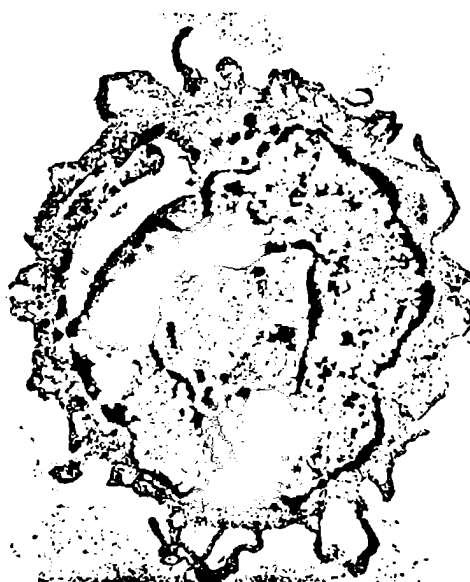


UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**“Células dendríticas en la inmunoterapia del cáncer.
Desarrollo de una vacuna anti-melanoma en un
modelo experimental”**



Autor: Bioq. Silvana Romina. Goldszmid

**Directores: Dra. Rosa Wainstok
Dr. José Mordoh**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR
DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Dpto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
y
Fundación Instituto Leloir**

Diciembre de 2003

19/12/03
23699

RESUMEN

La incidencia del melanoma aumenta a mayor velocidad que la de otros cánceres y la sobrevida de pacientes con metástasis distantes es generalmente < 1 año. Con el avance en la comprensión de los requerimientos para inducir inmunidad las CD se han convertido en atractivos vectores para la inmunoterapia del cáncer. Consideradas las más potentes células presentadoras de Ag (APC), las células dendríticas (CD) actúan como centinelas del sistema inmune, patrullando a través de la sangre, tejidos periféricos, linfa y órganos linfoides secundarios alertando al sistema inmune y controlando sus decisiones más tempranas. En la periferia las CD inmaduras capturan antígenos (Ag) y migran hacia los órganos linfoides secundarios donde presentan dichos Ag a linfocitos T naïve induciendo la activación de la respuesta inmune.

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue estudiar desarrollar una vacuna anti-melanoma utilizando CD cargadas con células tumorales apoptóticas y estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta inducida contra el tumor. Para ello, se utilizó el modelo de melanoma murino B16. El melanoma B16 es un tumor de origen espontáneo, débilmente inmunogénico y por lo tanto provee un marco adecuado para el estudio de la modulación de la respuesta inmune anti-tumoral.

Las CD aisladas a partir de precursores de médula ósea fueron cultivadas en presencia de sobrenadante de cultivo de la línea productora de GM-CSF establecida mostraron un fenotipo inmaduro con baja expresión de moléculas MHC I y II y coestimuladoras y alta capacidad de captación antigénica tanto por fagocitosis de Ag particulados como endocitosis de macromoléculas. Luego de inducir la maduración con LPS se observó un marcado aumento en la expresión de moléculas MHC I y II y coestimuladoras y un aumento en la capacidad estimuladora en cultivos mixtos alogeneicos. Ensayos de migración *in vitro* mostraron la alta capacidad migratoria de las CD inmaduras en respuesta a estímulos inflamatorios y de CD maduras en respuesta a quimioquinas constitutivamente secretadas en los ganglios linfáticos. Se

comprobó también, mediante la realización de ensayos de migración *in vivo*, que las CD inyectadas subcutáneamente eran capaces de migrar hacia los ganglios linfáticos de drenaje. Estos resultados reflejaron el potencial de las CD obtenidas para su utilización en el diseño de una vacuna anti-tumoral.

La apoptosis de las células B16 fue inducida por radiación γ y evidenciada por tinción con Anexina V / IP. 48 hs después de la irradiación se observaron 70 – 80 % de células apoptóticas caracterizadas por la tinción Anexina⁺ / IP⁻ comparadas con 10 – 12 % en las células sin tratar. Las células B16 apoptóticas fueron eficientemente fagocitadas por CD inmaduras. Luego de 24 hs de cocultivo gran proporción (> 50 %) de CD había incorporado material apoptótico según se evidencio por FACS, microscopia confocal y microscopia electrónica.

El cocultivo con células tumorales apoptóticas indujo la maduración de las CD, evidenciada por un aumento en la expresión de MHC II y CD86 respecto a CD inmaduras cultivadas en ausencia de células apoptóticas. Dicho aumento se observó principalmente en la población de CD que había incorporado material apoptótico. Otra evidencia de la maduración de las CD, fue la marcada disminución de la capacidad endocítica con respecto a CD inmaduras (intensidad de fluorescencia media 35,8 vs. 192,5). Luego de ser inyectadas subcutáneamente, CD cocultivadas con células apoptóticas o CD solas migraron hacia los ganglios linfáticos en forma comparable. Las CD encontradas en los ganglios correspondían a ~0.5% del inóculo original y en ambos casos se observó una expresión uniforme de MHC II y CD86 equivalente a la observada en CD maduras.

La vacunación con CD cargadas con células tumorales apoptóticas (CD-Apo) indujo un alto nivel de protección contra el desarrollo del melanoma B16: 80 % de los animales permanecieron libres de tumor 12 semanas después del desafío. Dicha protección fue específica para el melanoma B16, ya que todos los animales vacunados desarrollaron tumor cuando fueron desafiados con un tumor singéneo no relacionado.

80 % de los animales vacunados con CD-Apo y desafiados 10 semanas después de la inmunización permanecieron libres de tumor, consistente con la inducción de memoria inmunológica.

Estudios de depleción *in vivo* de subpoblaciones linfocitarias demostraron que tanto linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ son necesarios para la efectiva vacunación con CD-Apo. Se

evidenció que ambas poblaciones linfocitarias son activadas para la producción de IFN γ cuando son estimuladas con CD-Apo y CD-TRP-2. Además, los linfocitos CD8⁺ son capaces de reconocer células B16 intactas *in vitro* y de lisar células pulsadas con TRP-2 *in vivo*.

El estudio de la inmunidad humoral demostró la presencia de anticuerpos específicos dirigidos contra las células B16. Por último, en el análisis del sitio de inyección del tumor se observó un importante infiltrado de neutrófilos a tiempos muy tempranos, siendo máximo seis días después de la inyección del tumor. La presencia de linfocitos en el sitio de inyección se observó más tardíamente. Esto podría indicar que los neutrófilos también juegan un rol importante en el rechazo tumoral.

En el presente trabajo de Tesis se ha demostrado por primera vez, que la vacunación con CD cargadas con células tumorales apoptóticas (CD-Apo) induce inmunidad a largo plazo dependiente de la acción combinada de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contra el melanoma B16 débilmente inmunogénico. Este modelo preclínico provee el marco necesario para la realización de estudios clínicos comparables utilizando CD-Apo como adyuvante para la inmunización activa contra el cáncer.

Palabras claves: células dendríticas; melanoma; inmunoterapia; cáncer; vacunas; apoptosis

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

“Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma”

Romina S. Goldszmid, Juliana Idoyaga , Alicia I. Bravo, Ralph Steinman, José Mordoh, and Rosa Wainstok. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 5940-5947

TITLE: “Dendritic cells in cancer immunotherapy. Development of an anti-melanoma vaccine in an experimental model.”

AUTHOR: Bioq. Silvana R. Goldszmid

DIRECTORS: Dr. Rosa Wainstok

Dr. José Mordoh

INSTITUTION: Biological Chemistry Department, Faculty of Sciences, University of Buenos Aires and Fundacion Instituto Leloir

ABSTRACT

Melanoma is the cancer with the fastest increasing incidence, and survival of patients with distant metastases is generally < 1 year. With increased understanding of the requirements for initiating immunity, dendritic cells (DCs) have become attractive vectors for immunotherapy of this and other cancers. Considered the most potent antigen presenting cells (APC), DC act as sentinels of the immune system, they patrol through the blood, periphery, lymph and lymphoid organs, alerting the immune system and controlling its early decisions. At the periphery immature DC capture antigens (Ag) and migrate to the secondary lymphoid organs where they present those Ag to naïve T cells and therefore inducing the immune response.

The aim of this Thesis work was to develop an anti-melanoma vaccine using DC loaded with apoptotic tumor cells and to study the mechanisms underlying the induced anti-tumor response. In order to do that, we used the B16 melanoma. The B16 melanoma is a poorly immunogenic tumor of spontaneous origin, thus providing the adequate background to explore maneuvers to increase host defenses against it.

The DC obtained from bone marrow precursors were cultured in the presence of GM-CSF containing supernatant from the previously established GM-CSF producing cell line, showed an immature phenotype with low expression of MHC II and I and co-stimulatory molecules and high Ag capture capacity. After LPS induced maturation DC showed an up-regulated expression of

MHC I and II and co- stimulatory molecules and high T cell activation capacity in the mixed leukocyte reaction. DC also showed a high migratory activity as evidenced by *in vitro* migration assays. Furthermore, it has also been shown that after s.c. injection DC migrated to the draining lymph nodes. These observations pointed out the potential of DC for the design of anti- tumor vaccines.

To induce apoptosis, B16 cells were irradiated (70 Gy) and cultured for 48 h. Apoptosis was documented by AnnexinV / PI staining. After 48 h, cultured unirradiated cells contained 10-12% early apoptotic cells characterized by AnnexinV + / PI – staining. In contrast, 70-80% of irradiated cultured tumor cells had undergone early apoptotic death. 12-19% of the cells displayed AnnexinV + / PI + staining, indicating secondary necrosis in both unirradiated and irradiated cultures. Then DCs were cultured apoptotic tumor cells for 24h. At 37°C, over 50% of immature DCs phagocytosed apoptotic material, as confirmed by FACS, confocal fluorescence microscopy and electron microscopy.

After coculture a large fraction of the tumor-exposed DCs upregulated CD86 as well as MHC II. Another evidence of the induced maturation was the down-regulated capacity to endocytose FITC-Dextran as compared with immature DC(mean fluorescence 35,8 vs 192, 5). Following injection, DCs migrated to the draining lymph nodes comparably to control DCs at a level corresponding to ~0.5% of the injected inoculum and uniformly expressed high levels of CD86 and MHC II molecules comparable to fully mature and immunogenic DC.

Mice vaccinated with tumor-loaded DCs (DC-Apo) showed a strong protection against an intracutaneous challenge with B16: 80% of the mice remaining tumor-free 12 weeks after challenge. This protection was not observed when vaccinated mice were challenged with a non-related syngeneic tumor.

80 % of mice receiving a tumor challenge 10 weeks after vaccination were also protected, consistent with the induction of tumor-specific memory.

When either CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted *in vivo* at the time of challenge, the protection was completely abrogated, indicating that both CD4⁺ and CD8⁺ T cells are necessary for the effective anti-tumor response induced DC-Apo vaccination.

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were efficiently primed in vaccinated animals, as evidenced by interferon- γ secretion after *in vitro* stimulation with DC-Apo or DCs pulsed with TRP-2. In addition, B16 melanoma cells were recognized by immune CD8⁺ T cells *in vitro*, and cytolytic activity against TRP-2₍₁₈₀₋₁₈₈₎ pulsed target cells was observed *in vivo*.

The study of the humoral response showed the presence of anti-B16 specific antibodies. Finally, when the tumor injection site was analyzed a large amount of neutrophils were observed at very early time points and being maximum six days following tumor challenge. The presence of lymphocytes at the injection site was observed only at later time points. This could indicate that neutrophils also play an important role in the tumor rejection.

In the present Thesis work it has been shown for the first time, that DCs phagocytosing apoptotic tumor cells (DC-Apo) elicit long-lived combined CD4⁺ and CD8⁺ immunity against the poorly immunogenic B16 melanoma. This preclinical model sets the stage for comparable studies in humans with DC-Apo as adjuvants for active immunization against cancer.

Key words: dendritic cells; melanoma; immunotherapy; cancer; vaccines; apoptosis

The results showed in this Thesis work have been partially published in:

“Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma”

Romina S. Goldszmid, Juliana Idoyaga , Alicia I. Bravo, Ralph Steinman, José Mordoh, and Rosa Wainstok. *The Journal of Immunology*, 2003, 171: 5940-5947

INDICE

Introducción	1
1 Cáncer	1
1.1 Definición.	1
1.2 Progresión tumoral.	2
2 Melanoma	3
2.1 Clasificación.	3
2.2 Incidencia.	4
2.3 Detección temprana, tratamiento y sobrevida.	4
3 Respuesta inmune.	5
3.1 Conceptos básicos.	5
3.2 Componentes del sistema inmune.	6
3.3 Principios de la respuesta inmune innata y adaptativa.	8
3.3.i <i>Respuesta inmune innata</i>	8
3.3.ii <i>Respuesta inmune adaptativa.</i>	9
3.3.iii <i>Producción de células T efectoras.</i>	12
3.4 Células dendríticas.	12
3.4.i <i>Origen y diferenciación.</i>	13
3.4.ii <i>Captación antigénica.</i>	16
3.4.iii <i>Inducción de la maduración.</i>	17
3.4.iv <i>Migración.</i>	18
3.4.v <i>Presentación antigénica.</i>	18
3.4.vi <i>CD e Inmunoterapia.</i>	20
Objetivos	21
Materiales y Métodos	22
1 Animales	22
2 Células	22
2.1 Líneas celulares	22
2.2 Hibridomas:	23
2.3 Células dendríticas (CD)	24
3 Detección de micoplasma	24
4 Obtención de células productoras de mGM-CSF	25
4.1 Evaluación de la expresión de mGM-CSF en las células CHO transfectadas (CHO-GM-CSF)	26
5 Anticuerpos	28
6 Caracterización de las CD	28
6.1 Determinación de marcadores de superficie	28
6.2 Capacidad estimulatoria. Cultivo mixto linfocitario alogeneico:	29
6.3 Capacidad migratoria	29
6.3.i <i>Ensayo de migración in vitro</i>	29
6.3.ii <i>Ensayo de migración in vivo</i>	30
6.4 Captación antigénica.	31
6.4.i <i>Capacidad fagocítica. Fagocitosis de levaduras.</i>	31
6.4.ii <i>Capacidad endocítica. Endocitosis de Dextran</i>	32
6.5 Microscopía electrónica	32

7 Inducción y detección de apoptosis y necrosis de células B16	32
8 Cocultivo de CD con células B16 apoptóticas	33
9 Caracterización de las CD cocultivadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo)	34
10 Inmunización de ratones C57BL/6	34
11 Detección de memoria inmunológica	35
12 Caracterización de la respuesta anti-tumoral	35
12.1 Mecanismos celulares	36
12.1.i Depleción leucocitaria <i>in vivo</i>	36
12.1.ii Detección de linfocitos T CD4 ⁺ y CD8 ⁺ productores de IFN γ	36
12.1.iii Ensayo de citotoxicidad <i>in vivo</i>	36
12.2 Mecanismos humorales. Detección de anticuerpos.	37
12.2.i Técnica de ELISA	37
12.2.ii Inmunofluorescencia indirecta:	37
12.2.iii. Western Blot	38
13 Análisis histológico del sitio de inoculación del tumor:	38
14 Análisis estadístico	39
 Capítulo I: Aislamiento y caracterización de células dendríticas murinas.	40
1.1 Obtención de células productoras de GM-CSF	41
1.2 Aislamiento de CD murinas a partir de precursores de médula ósea	42
1.3 Expresión de marcadores de superficie	44
1.4 Evaluación de la captación antigénica de las CD	44
1.4.i Capacidad fagocítica	44
1.4.ii Capacidad endocítica	46
1.5 Evaluación de la capacidad migratoria de las CD	47
1.5.i Ensayos <i>in vitro</i>	47
1.5.ii Ensayos <i>in vivo</i>	48
1.6 Evaluación de la capacidad estimulatoria	49
Discusión	51
 Capítulo II: Desarrollo de una vacuna anti-melanoma utilizando CD	54
cargadas con células tumorales apoptóticas.	
2.1 Inducción y detección de apoptosis de células B16	55
2.2 Las CD inmaduras fagocitan eficientemente células B16 apoptóticas	57
2.3 Caracterización de las CD luego del cocultivo con células B16 apoptóticas	59
2.4 La vacunación con CD cargadas con células B16 apoptóticas induce protección	61
contra el desarrollo de tumores B16	
2.5 La vacunación con CD cargadas con células B16 apoptóticas induce memoria	64
inmunológica	
2.6. Tanto células CD4 ⁺ como CD8 ⁺ son necesarias para la respuesta anti-tumoral	65
Discusión	66
 Capítulo III: Estudio de la respuesta anti-tumoral inducida por la	71
vacunación con CD-Apo	
3.1 CD cargadas con células B16 apoptóticas activan eficientemente linfocitos T CD4 ⁺	71
y CD8 ⁺ <i>in vivo</i>	
3.2 Estudio de la actividad citotóxica efectora <i>in vivo</i> inducida luego de la vacunación	72
con CD-Apo	
3.3 Estudio de la respuesta humoral inducida luego de la vacunación con CD-Apo	74

3.4 Análisis histológico del sitio de inyección

Discusión

76
79

Conclusiones

Bibliografía

Abreviaturas

Introducción

INTRODUCCIÓN

1 Cáncer

1.1 Definición.

Cáncer es un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células anormales, que se produce como consecuencia de cambios genéticos específicos y estables, acumulados en una determinada población celular. La capacidad de proliferación y diferenciación de las células normales es variable y está estrechamente relacionada con el órgano o tejido al que pertenecen, manteniendo el equilibrio entre la pérdida de células maduras diferenciadas y la aparición de nuevas células con capacidad proliferativa. Si el estímulo de proliferación celular excede el requerimiento para el reemplazo celular, como ocurre en algunas condiciones patológicas, se produce una expansión policlonal que lleva a la hipertrofia del órgano. No obstante, cuando se retira la estimulación excesiva disminuye la tasa de proliferación y se revierte la hipertrofia. En contraste con la proliferación policlonal regulada, en la transformación neoplásica una célula individual sufre un cambio genético que le otorga un potencial de proliferación independiente de factores externos. Esto lleva a un crecimiento autónomo de células de origen monoclonal que se denomina *tumor o neoplasia*.

Los cambios genéticos iniciales que llevan a la transformación neoplásica raramente son heredados a través de las gametas (~ 5 – 10 %). En la mayoría de los casos, son alteraciones del ADN que se producen en las células somáticas y que dependen tanto de factores externos (tabaco, alcohol, productos químicos, radiación, agentes infecciosos) como de factores internos (hormonas, condición inmunológica, alteraciones metabólicas). Si bien se han caracterizado numerosos tipos tumorales y las modificaciones en el ADN son muy variadas, en la actualidad se sabe que en todos los casos los productos de los genes alterados participan en la regulación de la proliferación, diferenciación y supervivencia celular. Las mutaciones que llevan a las células neoplásicas al comportamiento anárquico se relacionan con dos mecanismos moleculares: la activación de oncogenes y la pérdida de función de genes supresores de tumor. La primera, corresponde a la alteración estructural de un gen normal (protooncogen) que se activa para transformarse en un oncogen, cuyo producto proteico

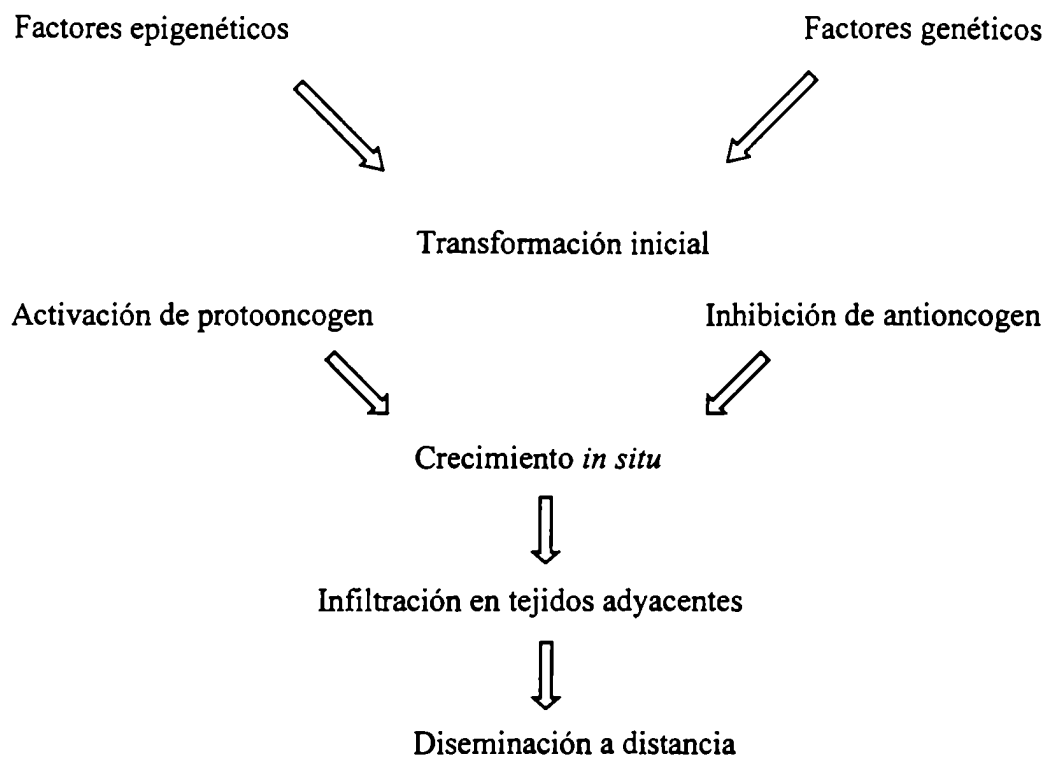
estimula la proliferación celular. La segunda, representa la inactivación de un gen normal (antioncogen) cuyo producto proteico interviene en la inhibición de la proliferación celular, el control de la muerte celular y la diferenciación.

El crecimiento desmedido de la población neoplásica es el rasgo fenotípico más característico. Sin embargo, la capacidad de invadir los tejidos circundantes y abandonar el sitio primario para colonizar otros órganos es un atributo biológico relevante que permite clasificar a los tumores en “**benignos**” o “**malignos**”. El tumor es considerado benigno cuando las células tumorales permanecen agrupadas en su lugar de origen, sin invadir los tejidos adyacentes. En general estos tumores son de crecimiento lento, tienen un alto grado de diferenciación correspondiente al tejido del cual provienen y suele obtenerse cura completa por remoción quirúrgica. En el caso de los **tumores malignos o cáncer**, las células son menos diferenciadas y crecen en forma ilimitada invadiendo los tejidos circundantes. Poseen la capacidad de entrar en los canales vasculares o linfáticos y migrar hacia órganos distantes donde pueden establecerse formando un *tumor secundario o metástasis*. Aunque tienen un origen monoclonal, las células pueden ser genética y fenotípicamente heterogéneas a raíz de los cambios genéticos que ocurren a medida que el tumor se desarrolla durante el proceso llamado *progresión tumoral*.

1.2 Progresión tumoral.

La progresión tumoral es un proceso que se desarrolla en múltiples etapas e involucra la acumulación de cambios secuenciales (1). Mientras se expande la población derivada de la primera célula portadora del daño genético irreparable, se van produciendo y acumulando nuevas alteraciones que confieren ventajas adaptativas para proliferar descontroladamente y finalmente invadir los tejidos vecinos.

Para metastatizar, las células tumorales deben llevar a cabo un proceso multifactorial que puede dividirse en dos etapas: la *invasión primaria* en la cual las células deben disociarse del tumor primario y penetrar en los vasos sanguíneos o linfáticos (*intravasación*). En la *invasión secundaria*, las células deben escapar a la vigilancia inmunológica, atravesar nuevamente el endotelio (*extravasación*) y migrar a través del parénquima y el estroma del órgano blanco para implantarse y formar el nódulo metastático. En el siguiente esquema se resumen los pasos de la progresión tumoral.



2 Melanoma

2.1 Clasificación.

El melanoma resulta de la transformación maligna de las células de la piel que sintetizan pigmento -los melanocitos- y como en casi todos los tipos de cánceres, tanto los factores genéticos como los ambientales contribuyen al desarrollo. Durante el desarrollo embrionario los melanocitos migran hacia la piel y normalmente están confinados en la capa basal de la epidermis, en contacto con queratinocitos de capas basales y superficiales de la piel (2). El pigmento producido por los melanocitos -la melanina- se distribuye entre los queratinocitos y protege la piel del daño ocasionado por la radiación solar. Es sabido que la proliferación y contenido de melanina en los melanocitos está sujeto a regulación proveniente de los queratinocitos vecinos, otorgándole relevancia biológica a la configuración anatómica de las células de la piel (3).

El melanoma puede clasificarse histológicamente según su localización y grado de progresión en 4 estadios definidos: melanoma *in situ*, melanoma en fase de crecimiento radial, melanoma en fase de crecimiento vertical y melanoma metastático. Tanto el nevo benigno como el displásico, el último presumiblemente lesión precursora del melanoma, se caracterizan por un aumento en el número de melanocitos en relación a los queratinocitos. Estas lesiones progresan a melanoma *in situ*, el cual crece radialmente y permanece confinado a la epidermis. En contraste, el melanoma de fase de crecimiento vertical invade la capa superior de la epidermis y penetra en la dermis y tejido subcutáneo, formando nódulos expansivos de células malignas. La transición de crecimiento radial a crecimiento vertical es el paso crucial en la progresión del melanoma y la adquisición de potencial metastático, ya que durante la fase de crecimiento radial las células aún dependen de factores de crecimiento exógenos, no son capaces de crecer independientemente del anclaje y no poseen capacidad metastática. Por su parte, durante el crecimiento vertical las células escapan completamente al control provisto por los queratinocitos, adquieren capacidad de crecimiento independiente de factores exógenos y de anclaje y son altamente metastáticas (3).

2.2 Incidencia.

Según datos de la Sociedad Americana del Cáncer (www.cancer.org) anualmente ocurren más de un millón de casos altamente curables de carcinoma basocelular o carcinoma espinocelular. La forma más grave del cáncer de piel es el melanoma, el cual se estima será diagnosticado en 54.200 personas (en USA) durante el año 2003 (Skin Cancer Facts-2003, Sociedad Americana del Cáncer).

El melanoma es considerado principalmente una enfermedad de la población blanca, siendo su incidencia 10 veces mayor que en la población Afro-Americana. El grado de pigmentación de la piel, así como parámetros geográficos pueden influir en la incidencia, indicando que la radiación ultravioleta ejerce un rol causal en el desarrollo del melanoma (4).

2.3 Detección temprana, tratamiento y sobrevida.

Una de las características distintivas del melanoma metastático es su resistencia a las terapias convencionales. En la actualidad la prevención y detección temprana son las medidas más efectivas contra el melanoma. El melanoma comienza habitualmente como un pequeño

crecimiento de una lesión pigmentada, que aumenta en tamaño y cambia de color. Las señales de aviso de melanoma se denominan ABCD: A por asimetría, B por bordes irregulares, C por color (la pigmentación no es uniforme, en un rango de marrón a negro) y D por diámetro (superior a 6 mm).

En el caso del carcinoma basocelular o espinocelular, en el 90 % de los casos el tratamiento es quirúrgico utilizando técnicas de excisión quirúrgica. Cuando se trata de melanoma, la lesión primaria debe ser extirpada adecuadamente y puede ser también necesario remover los ganglios regionales. Para los estadios más avanzados el tratamiento se realiza con quimioterapia e inmunoterapia. El melanoma puede diseminarse rápidamente a otras partes del cuerpo, sin embargo si es detectado en sus estadios más tempranos y tratado apropiadamente, es altamente curable. La tasa de sobrevida a cinco años en los pacientes con melanoma localizado es del 96 %, pero en los pacientes con metástasis regionales baja a 60 % y cuando las metástasis son distantes la tasa de sobrevida es de sólo 14 %.

3 Respuesta inmune. (Revisiones en: (5-7))

3.1 Conceptos básicos.

La respuesta inmune específica, como lo es la producción de **anticuerpos (Ac)** contra un patógeno en particular, se conoce como **respuesta inmune adaptativa**, porque ocurre como una adaptación del sistema inmune a la infección con dicho patógeno. En muchos casos, la respuesta inmune adaptativa confiere inmunidad protectora de por vida contra el mismo patógeno. Esta se distingue de la **respuesta inmune innata** la cual se caracteriza por la presencia, además de anticuerpos IgM, de células fagocíticas capaces de internalizar y digerir un amplio espectro de patógenos. Las mismas se encuentran inmediatamente disponibles para el combate sin requerir exposición previa con el patógeno y constituyen un componente clave de la respuesta innata. Contrariamente, los Ac IgG son producidos solamente luego de la exposición al patógeno y son altamente específicos y afines para el mismo, de ahí que los Ac presentes en el suero de un individuo son un reflejo directo de las infecciones a la cuales estuvo expuesto.

En realidad, los Ac pueden ser inducidos contra una vasta variedad de sustancias. Esas sustancias se las denomina **antígenos (Ag)**, denominación que surgió porque pueden

estimular la *generación* de *anticuerpos*. Aunque no siempre la respuesta inmune adaptativa implica la generación de Ac, el término Ag es utilizado en un amplio sentido para describir sustancias que pueden ser reconocidas por el sistema adaptativo.

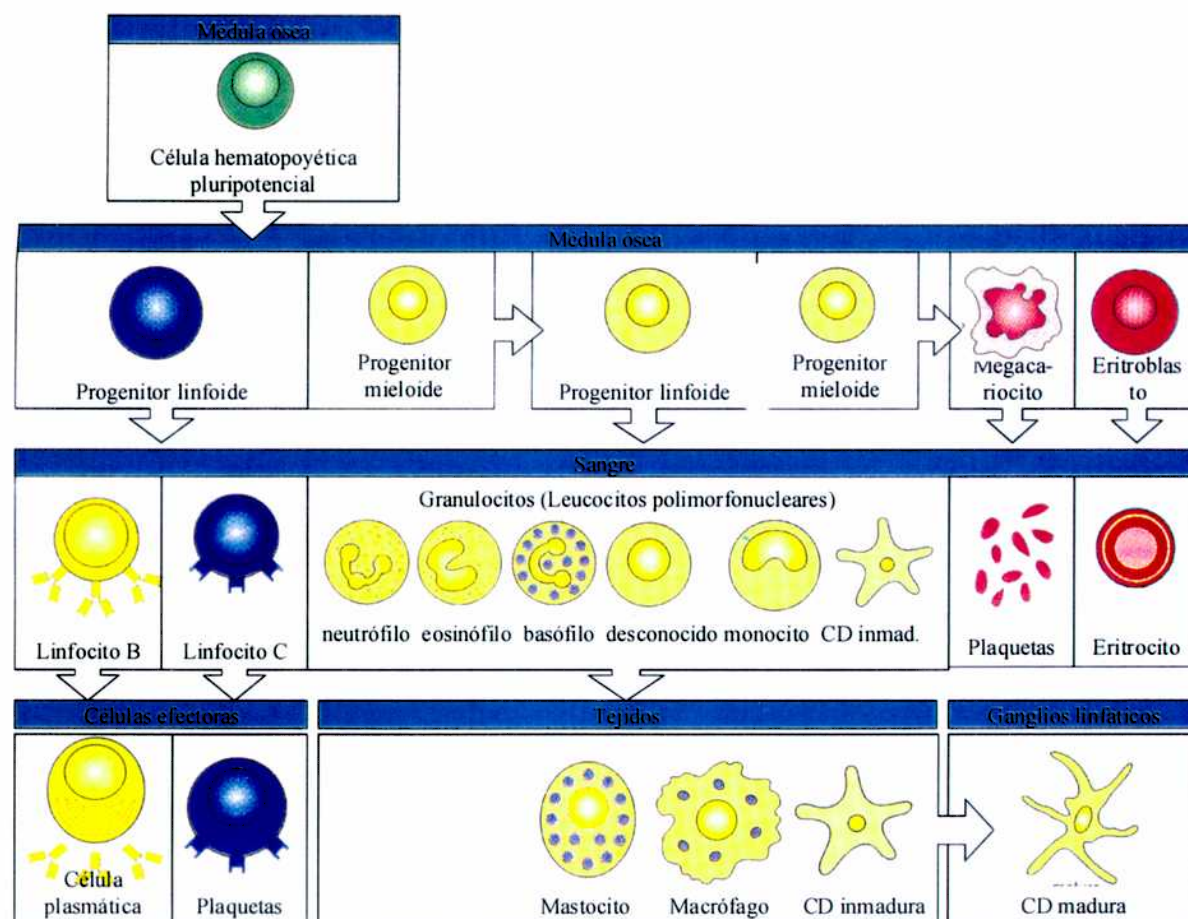
Tanto la respuesta innata como la adaptativa dependen de la actividad de los glóbulos blancos o **leucocitos**. El sistema innato involucra fundamentalmente granulocitos y macrófagos. Los granulocitos, también llamados leucocitos polimorfonucleares (PMNs), incluyen a los neutrófilos que poseen, al igual que los macrófagos, capacidad fagocítica. La respuesta adaptativa es dependiente de los **linfocitos**, que son los responsables de la inmunidad de por vida o *memoria inmunológica* que puede sobrevenir a la infección o vacunación. Ambos sistemas, innato y adaptativo, están íntimamente relacionados y constituyen un remarcable sistema de defensa.

3.2 Componentes del sistema inmune.

Las células del sistema inmune se originan en la médula ósea y de allí migran hacia los tejidos periféricos a través de los vasos sanguíneos y de un sistema especializado de vasos llamado **sistema linfático**. Todos los elementos celulares de la sangre, incluyendo los glóbulos rojos, derivan del mismo progenitor o células precursoras, las ***células stem hematopoyéticas*** o ***células pluripotentes***. Estas células pluripotentes inicialmente dan origen a células stem de potencial más limitado que incluyen a los precursores inmediatos de los glóbulos rojos, plaquetas y las dos categorías de glóbulos blancos: mieloides y linfoides (Esquema 1).

El **progenitor mieloide** es el precursor de los granulocitos, macrófagos, células dendríticas y mastocitos. Los **macrófagos** son uno de los tres tipos de células fagocíticas del sistema inmune y están ampliamente distribuidos en todo el organismo jugando un rol fundamental en la respuesta innata. Constituyen la forma madura de los **monocitos**, que están en circulación diferenciándose continuamente en macrófagos cuando migran a los tejidos. Las **células dendríticas (CD)** son células especializadas en la captación y presentación antigénica. Las CD inmaduras migran a través de la sangre para residir en los tejidos periféricos. Luego del encuentro con un patógeno inician un proceso de maduración y migran hacia los órganos linfoides secundarios. La biología de las CD será analizada con más detalle en la sección 4. Los **mastocitos** se diferencian en los tejidos y residen principalmente en la

cercanía de pequeños vasos sanguíneos donde luego de ser activados liberan sustancias que afectan la permeabilidad vascular.



Esquema 1 Todos los elementos celulares de la sangre, incluyendo los linfocitos del sistema inmune adaptativo, provienen de células hematopoyéticas de la médula ósea (Adaptado de Immunobiology 5th edn, Janeway C.)

Los **granulocitos**, reciben su nombre por el denso contenido de gránulos en su citoplasma. Por la forma irregular de su núcleo, también son llamados leucocitos **polimorfonucleares** (PMNs). Existen tres tipos de granulocitos que poseen un tiempo de vida media corto y aumentan en gran cantidad durante la respuesta inmune, cuando dejan la sangre para migrar al sitio de infección o inflamación. Los **neutrófilos**, que constituyen el tercer tipo de células fagocíticas, son el componente celular más numeroso e importante de la respuesta inmune innata; los **eosinófilos** participan en la inmunidad contra parásitos y en procesos alérgicos, y finalmente los **basófilos**, cuya función no está del todo caracterizada, pero se cree es similar y complementaria a la de los eosinófilos y mastocitos.

El **progenitor linfocítico común** da origen fundamentalmente a los linfocitos, pero pueden dar origen también a determinadas subpoblaciones de CD. Hay dos tipos mayoritarios de linfocitos: los **linfocitos B** (LB), que se diferencian en la médula ósea y una vez activados

se diferencian en plasmocitos secretores de Ac; y los **linfocitos T** (LT), los cuales se diferencian en el timo y pueden a su vez subdividirse en dos subpoblaciones principales. Una de ellas se diferencia a **células T citotóxicas CD8⁺** (CTL) y la otra se diferencia a **células T colaboradoras CD4⁺** (LT_H). Los LT_H se dividen en dos clases funcionalmente distintas, los T_H1 cuya función es principalmente activadora de la respuesta citotóxica y los T_H2 que estimulan a los LB para la producción de Ac. Un tercer linaje de células linfocíticas son las **células natural killer** (NK), que derivan del mismo progenitor pero carecen del rasgo distintivo de la respuesta inmune adaptativa: la especificidad antigénica. Por el contrario, poseen importantes funciones dentro de la respuesta inmune innata ya que son capaces de reconocer y matar células anormales como por ejemplo células tumorales o infectadas con patógenos intracelulares. La respuesta mediada por Ac recibe el nombre de **respuesta humoral**, mientras que la mediada por LT es habitualmente llamada **respuesta celular**.

3.3 Principios de la respuesta inmune innata y adaptativa.

3.3.i *Respuesta inmune innata.* (Revisiones en: (6, 8, 9))

Los macrófagos y los neutrófilos del sistema innato proveen una primera línea de defensa contra muchos microorganismos y son esenciales para el control de numerosas infecciones bacterianas comunes. Sin embargo, no siempre pueden eliminar al organismo causante de la infección y hay patógenos a los que no pueden reconocer. Es por ello que los linfocitos del sistema adaptativo han evolucionado para proveer una forma de defensa más versátil, que además aporta una protección aumentada contra reinfecciones con el mismo patógeno. No obstante, las células de la respuesta innata juegan un rol crucial en la iniciación y subsiguiente dirección de la respuesta adaptativa, además de participar en la remoción de patógenos que fueron blanco del sistema adaptativo, por ejemplo mediante el mecanismo de citotoxicidad mediado por Ac. Más aún, teniendo en cuenta que se demora de 4 – 7 días en montarse la respuesta inmune adaptativa, la respuesta innata posee una función crítica en el control de las infecciones durante ese período.

Cuando los microorganismos como las bacterias, atraviesan las barreras físicas -piel, mucosas- y penetran por primera vez en el organismo, son inmediatamente encontrados por las células y moléculas que montan la respuesta inmune innata. Los macrófagos llevan adelante la defensa contra bacterias a través de receptores que poseen en su superficie, que

son capaces de reconocer componentes moleculares bacterianos comunes a muchas bacterias. Tal reconocimiento lleva a la activación del macrófago e induce la fagocitosis y la secreción de moléculas biológicamente activas, las **citoquinas** y **quimioquinas**, que actúan sobre otras células que poseen los receptores correspondientes. Estas citoquinas y quimioquinas secretadas inician el **proceso inflamatorio** activando y reclutando células como los neutrófilos, monocitos y linfocitos, y además producen un aumento en la permeabilidad capilar favoreciendo la extravasación de moléculas al foco inflamatorio. La inflamación local puede inducirse también como resultado de la activación del **sistema de complemento** sobre la superficie bacteriana. El sistema de complemento está constituido por proteínas séricas que son activadas por una cascada proteolítica que se inicia por la unión de determinadas moléculas a la superficie bacteriana pero no a la de células del huésped; otra vía de activación es a través de la unión a Ac que se encuentran unidos a la superficie de células blanco. Algunos productos liberados durante esta cascada proteolítica contribuyen a la reacción de inflamación.

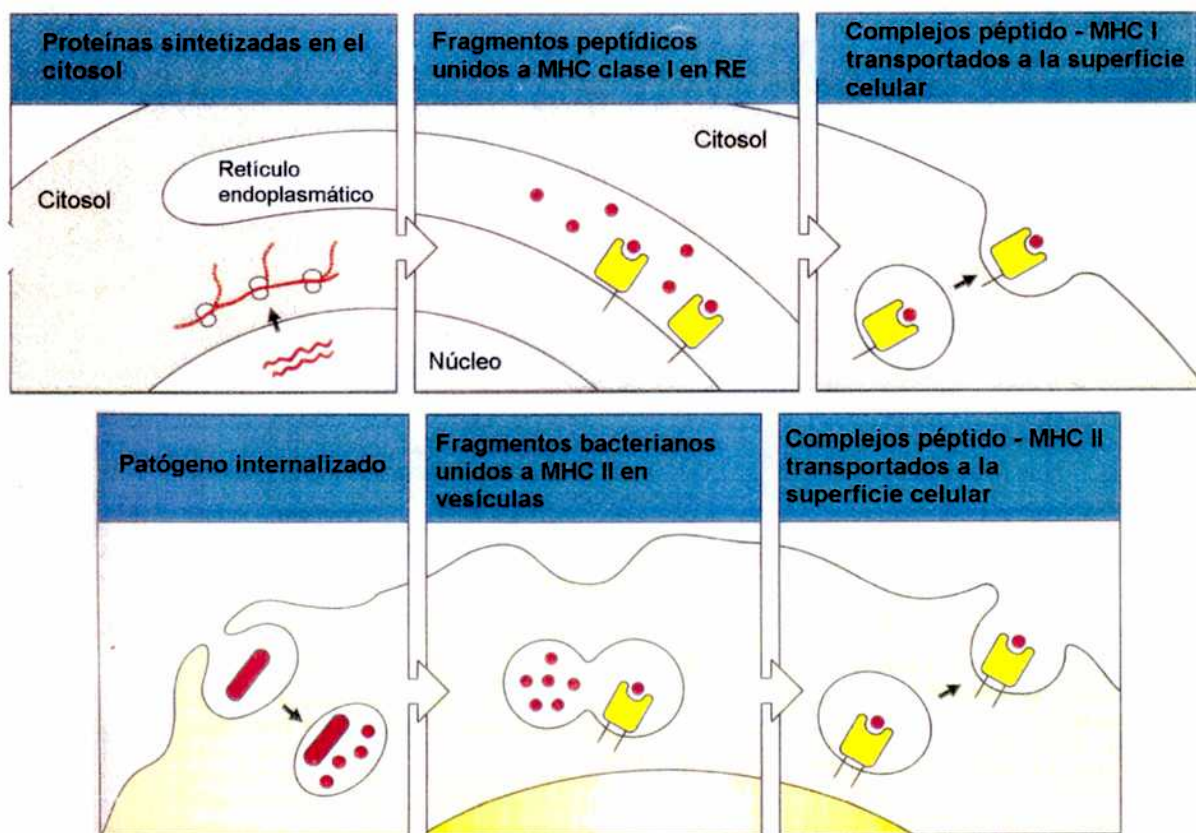
La respuesta innata contribuye en gran medida a la activación de la respuesta adaptativa. La reacción inflamatoria aumenta el flujo de linfa conteniendo Ag así como de células que incorporan Ag hacia los ganglios linfáticos, permitiendo el reconocimiento de dichos Ag por los linfocitos. Además, las citoquinas y quimioquinas liberadas en el foco inflamatorio favorecen la llegada de los linfocitos.

3.3.ii Respuesta inmune adaptativa.

Generalmente los linfocitos son pequeñas células inactivas, y hasta los años '60 no era sorprendente encontrar que en los libros de texto los describiesen como células sin función aparente. En realidad, los linfocitos no poseen actividad funcional hasta el momento en que encuentran el Ag, evento necesario para desencadenar su proliferación y la diferenciación de sus características funcionales.

Los linfocitos se caracterizan por su capacidad de montar una respuesta inmune específica contra un Ag particular. Esto es posible porque los linfocitos se diferencian llevando cada uno una única variante de receptor antigénico. Por lo tanto la población total de linfocitos B y T posee un gran repertorio de receptores con alta diversidad de sitios de unión a los Ag. Los LB reconocen los Ag extracelulares en forma directa a través del receptor (BCR), una inmunoglobulina (Ig) de unión a membrana, con la misma especificidad que los Ac que

producirá luego de su activación y diferenciación a plasmocito. Por su parte el receptor de los LT (TCR) es una proteína relacionada a las Ig, pero el reconocimiento antigénico no se produce en forma directa. Los LT reconocen Ag que provienen tanto de patógenos que han infectado la célula blanco, como de patógenos que fueron capturados por células fagocíticas. Tanto los CTL como los LT_H, reconocen fragmentos peptídicos que derivan de proteínas ajenas al organismo, cuando dichos péptidos están unidos a moléculas propias del huésped y son expuestos en la membrana celular. Dichas moléculas que despliegan los péptidos antigénicos a los LT, son glicoproteínas de membrana codificadas por un grupo de genes de gran polimorfismo que llevan el nombre **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)**. Las moléculas MHC son las responsables del rechazo de transplantes alogeneicos, de allí el nombre de genes de histocompatibilidad. Hay dos tipos de moléculas MHC : MHC clase I y MHC clase II. La diferencia más importante entre estas dos moléculas se debe tanto a su estructura como al origen de los péptidos a los cuales ensamblan y llevan hacia la superficie celular (Esquema 2). Las moléculas MCH I se ensamblan con péptidos derivados de proteínas



Esquema 2 Origen de los péptidos presentados en MHC I y MHC II (Adaptado de Immunobiology 5th edn, Janeway C.)

sintetizadas en el citoplasma, por ejemplo a partir de proteínas de origen viral, y son reconocidos por los LT citotóxicos a través del TCR y del co-receptor CD8. En cambio, las

moléculas MHC II se unen a péptidos derivados de vesículas intracelulares, ya sea provenientes de patógenos de vida intracelular o internalizados vía fagocitosis y son reconocidos por LT_H a través del TCR y del co-receptor CD4.

La degradación de las proteínas en el citosol se lleva a cabo por un complejo multicatalítico de proteasas llamado **proteasoma**. Para ser degradadas, las proteínas son introducidas en el proteasoma y allí son clivadas en péptidos que son luego transportados al retículo endoplásmico (RE) donde son ensamblados con las moléculas MHC I. En el transporte hacia el RE participan dos proteínas llamadas **Transportadores Asociados al Procesamiento Antigénico-1 y 2** (TAP-1 y TAP-2). Estos transportadores pueden participar en la translocación de proteínas sintetizadas *de novo* desde el RE hacia el citosol, donde son degradadas en péptidos que son transportados nuevamente al RE para ser ensamblados con moléculas MHC I, explicando de esa manera la presentación en MHC I de péptidos derivados de proteínas extrañas de origen viral. El ensamble del complejo MHC I – péptido depende de la asociación inicial de la cadena α con β_2 -microglobulina y luego con el péptido, proceso que involucra proteínas accesorias. Sólo luego de haberse ensamblado con el péptido, las moléculas MHC I abandonan el RE para llegar a la superficie celular.

Numerosos patógenos se replican dentro de vesículas intracelulares, y como estas vesículas están rodeadas de membrana, las proteínas derivadas de los patógenos no pueden llegar al citosol para ser degradadas. La degradación ocurre entonces dentro de la vesícula, lo mismo que ocurre con proteínas que son internalizadas por fagocitosis o endocitosis. La degradación es llevada a cabo por proteasas presentes en los fagosomas y endosomas, que son activadas a pH ácido. Las moléculas MHC II que son recientemente sintetizadas y transportadas al RE deben llegar a unirse con los péptidos generados dentro de las vesículas, por ello debe prevenirse la unión prematura de las mismas con péptidos que se encuentran en el RE. Este ensamble prematuro es prevenido por la unión de MHC II con una proteína llamada **cadena invariante asociada a MHC II (Ii)**. La Ii se une a la molécula MHC II bloqueando el sitio de unión del péptido, además tiene como función dirigir las moléculas MHC II hacia las vesículas de bajo pH donde deben ensamblarse con los péptidos. Una vez en el compartimiento ácido, se produce el clivaje de la Ii, dejando un pequeño fragmento de la misma llamado **péptido de cadena invariante asociado a MHC II** o **CLIP** el cual debe ser desplazado para permitir la unión del péptido derivado de la proteólisis y el transporte del complejo MHC II – péptido hacia la superficie celular.

3.3.iii Producción de células T efectoras.

Los linfocitos T naïve para ser activados deben reconocer un péptido extraño unido a una molécula MHC propia. Pero para que se produzca dicha activación son necesarias señales coestimulatorias que deben ser transmitidas simultáneamente. Las **células presentadoras de Ag (APC)**, - CD, macrófagos y linfocitos B - son las únicas células que expresan ambas moléculas MHC (I y II) y moléculas coestimulatorias y por lo tanto son capaces de inducir la expansión clonal de los linfocitos T. Las CD son las APC más potentes y probablemente las únicas responsables de la activación de linfocitos T naïve *in vivo*.

3.4 Células dendríticas.

Han pasado sólo 30 años desde que R. M. Steinman y Z. A. Cohn describieron las CD por primera vez (10). Desde entonces, el campo de la biología de CD ha crecido en forma sorprendente con la aparición de nuevas metodologías para el estudio del rol de las CD *in vivo*, y el descubrimiento de las numerosas funciones que desempeñan en el control de la respuesta inmune. Aún así, no son pocos los misterios y desafíos que estas células representan.

Las CD constituyen una población celular heterogénea, ampliamente distribuida en el organismo, residiendo particularmente en tejidos que constituyen la interfase con el entorno y por ende sitios de potencial entrada de patógenos (piel, mucosas), donde representan ~ 1 – 2 % del las células totales (11, 12). Las CD actúan como centinelas del sistema inmune, patrullando el organismo a través de la sangre, tejidos periféricos, linfa y órganos linfoides secundarios, alertando al sistema inmune y controlando sus decisiones más tempranas. En la periferia las **CD inmaduras** internalizan Ag que son procesados en péptidos proteolíticos y ensamblados con moléculas MHC I y II. Al recibir una señal de peligro (productos provenientes de patógenos, inflamación, trauma, etc) las CD comienzan un proceso de diferenciación llamado **maduración**, a través del cual pierden su habilidad de internalizar Ag, pero se transforman en eficientes presentadoras de Ag aumentando la expresión de moléculas coestimulatorias (CD40, CD80, CD86) y MHC I y II convirtiéndose en extraordinarias activadoras de linfocitos T (11, 12).

3.4.i Origen y diferenciación.

Aún no se ha definido un modelo definitivo de diferenciación de CD. Inicialmente, se identificó un progenitor de médula ósea común a los macrófagos y granulocitos, reconociendo al **factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)** como una citoquina clave en la diferenciación de CD. Las CD fueron consideradas como un linaje diferente debido a que sus propiedades eran marcadamente diferentes a las de los fagocitos, especialmente su habilidad para estimular linfocitos T naïve e iniciar la respuesta inmune. Esta visión del desarrollo de CD como un camino paralelo al desarrollo de macrófagos y granulocitos es una versión sumamente simplificada del intrincado desarrollo de CD que se conoce en la actualidad.

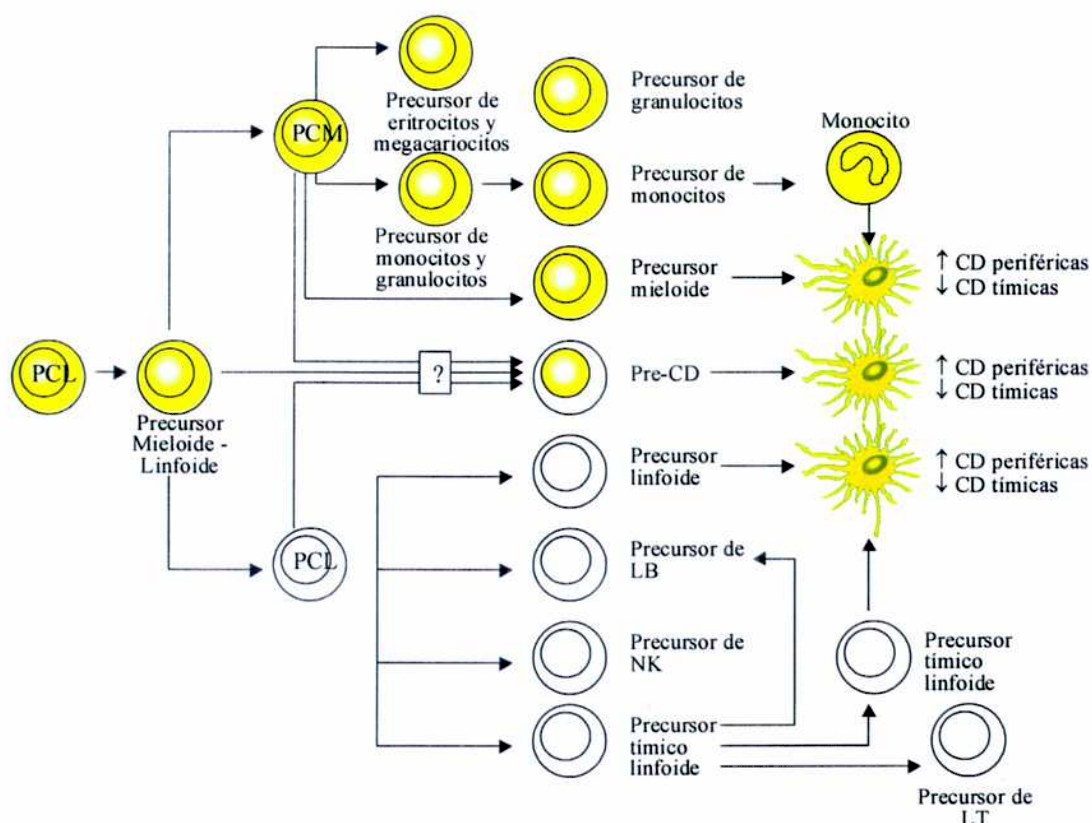
Estudios recientes utilizando ratones genéticamente modificados contribuyeron substancialmente a la caracterización de los precursores de CD. Basándose en criterios fenotípicos y funcionales, en el ratón se han identificado seis subpoblaciones de CD distribuidas en diferentes tejidos (13, 14):

Subpoblación	Timo	Bazo	Ganglios linfáticos	Placas de Peyer	Piel	Hígado
De CD						
CD8 ⁻	+	+	+	+		+
CD8 ⁺	+	+	+	+		+
CD8 ^{int}			+			
Células de Langerhans					+	
CD de la dermis					+	
B220 ⁺	+	+	+	+	-	N.D

Las CD CD8⁻ pueden subdividirse en CD8⁻CD4⁻ y CD8⁻CD4⁺ (15, 16) aunque la relevancia funcional de la expresión de CD4 aún no se ha definido. Las CD que expresan un nivel intermedio de CD8 (CD8^{int}) constituyen una subpoblación específica de los ganglios linfáticos. Las CD que expresan la molécula B220, son la contraparte de las CD

plasmocitoides humanas, están presentes en todos los órganos linfoides y se caracterizan por la producción de grandes cantidades de IFN tipo I en respuesta a infecciones virales (17). Las CD plasmocitoides B220⁺ también participan en la inducción de tolerancia por inducir la diferenciación de células T regulatorias (18), las que mediante la liberación de IL-10 bloquean la activación de linfocitos T naïve. En el ratón, también se describieron CD específicas de tejidos no linfoides como pulmón, corazón y riñón que hasta el momento no pudieron integrarse en ninguna de las subpoblaciones arriba mencionadas (19-21).

El origen de las CD a partir de un progenitor mieloide fue probado en forma contundente por Sallusto y Lanzavecchia cuando demostraron que las CD humanas podían diferenciarse *in vitro* a partir de monocitos (22) y por Randolph y col en un modelo *in vivo* en un modelo murino (23). En la actualidad es sabido que las CD pueden originarse tanto a partir de un **precursor común mieloide** como de un **precursor común linfoide** (24), pero aún es difícil diferenciar el desarrollo de la progenie linfoide y mieloide. En el Esquema 3 se resume el modelo teórico actual del origen y diferenciación de las CD.



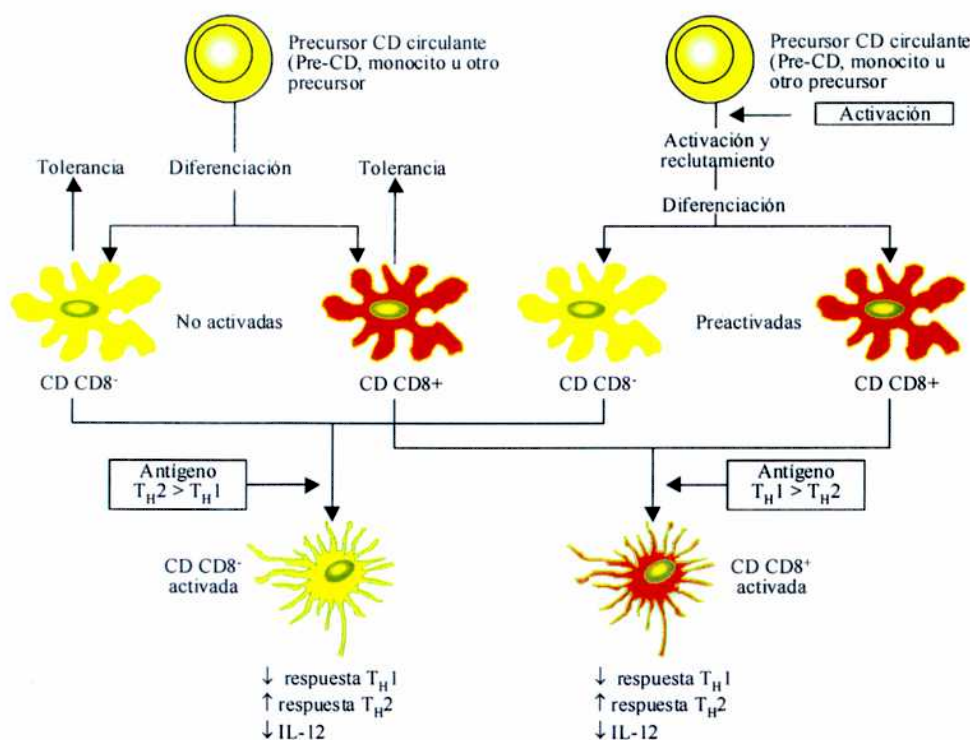
Esquema 3 Origen y diferenciación de las células dendríticas (Adaptado de Ardavin, C. 2003. *Nat Rev Immunol* 3:582)

En general, las CD CD8⁺ y CD⁻ son consideradas dos subpoblaciones funcionalmente diferentes (14). Por ejemplo, las CD8⁻ pero no las CD8⁺ tienen la capacidad de inducir la

activación de células B y la diferenciación a células plasmáticas (25). Aunque ambas subpoblaciones contienen estadios inmaduros o semi maduros con alta capacidad fagocítica / endocítica, datos recientes indican que las CD $CD8^+$ son las únicas capaces de fagocitar de células apoptóticas (26). En la inducción de células T *in vivo*, las CD $CD8^-$ activan principalmente linfocitos T_H2 , mientras que las $CD8^+$ activan respuestas T_H1 debido a la mayor secreción de IL-12 (27, 28).

Es importante mencionar que estas diferencias funcionales pueden alterarse por factores que modulan la función de las CD, en particular la secreción de IL-12. Estos factores moduladores incluyen: el estado de activación de las CD (29), la naturaleza del Ag (30), la concentración de Ag (30) (29), el tipo de receptor involucrado en la captación del Ag y citoquinas como IL-10 e IFN γ (28, 31).

Las CD también están involucradas en la inducción de **tolerancia central y periférica** (32-36). El modelo teórico de activación y función de las CD $CD8^+$ y $CD8^-$ se resume en el esquema 4.



Esquema 4 Modelo teórico de activación y función de las células dendríticas $CD8^+$ y $CD8^-$ (Adaptado de Ardavin, C. 2003. *Nat Rev Immunol* 3:582)

Las CD son un nexo entre la respuesta inmune innata y la adaptativa, ya que no sólo modulan la activación y expansión de linfocitos T y B, también contribuyen en la regulación de los linfocitos NK y NKT (37-40)

3.4.ii Captación antigénica.

La eficiente captación antigénica es una propiedad exclusiva de CD inmaduras. Las CD inmaduras capturan Ag mediante distintos mecanismos, entre ellos la macropinocitosis, endocitosis y fagocitosis mediadas por receptor. La endocitosis mediada por receptor permite la incorporación de macromoléculas a través de regiones especializadas de la membrana plasmática (41). Las CD poseen numerosos receptores involucrados en la endocitosis: FcR (FcRI / CD64, FcRII / CD32 y FcRIII / CD16) (42, 43) receptores para complemento (CR3 y CR4) (44), receptores para proteínas *heat-shock* (hsps). Recientemente, se ha identificado en CD murinas al receptor CD91 como receptor para las hsps gp96 y Hsc70 derivadas de células infectadas o tumorales (45). Otra clase de receptores involucrados en la endocitosis son los receptores llamados *scavenger* (SRs). Los SRs son glicoproteínas de membrana que unen lipoproteínas de baja densidad y están implicados en la internalización de bacterias (46). Entre los SR expresados en CD, se encuentra el CD36 (SR clase B) que participa en la internalización de células apoptóticas (47, 48).

Otros receptores presentes en la superficie de CD son los de la familia de la lectinas tipo C, el receptor de macrofágico de manosa (MMR) (49) y el DEC-205 (50). El MMR media la internalización de monosacáridos y Ag derivados de patógenos incluyendo levaduras (51), y el transporte a endosomas y lisosomas tempranos (49). El DEC-205 se describió originalmente en CD murinas maduras y células de Langerhans (50). A diferencia del MMR que recicla entre la membrana citoplasmática y endosomas tempranos, el DEC-205 recicla vía compartimientos endocíticos tardíos que contienen moléculas MHC II y por ende favorece la presentación antigénica (52). Por último, los receptores DC-SIGN y Langerina son lectinas que unen específicamente manosa y se expresan en forma exclusiva en CD intersticiales y células de Langerhans respectivamente (53, 54). El receptor Langerina induce la formación de compartimientos endocíticos únicos de las células de Langerhans conocidos como gránulos de Birbeck (53).

Los Ag particulados y los solubles son eficientemente internalizados por CD mediante fagocitosis y macropinocitosis respectivamente. La fagocitosis es generalmente mediada por receptor y en su mayoría son los mismos receptores involucrados en la endocitosis. Las CD fagocitan numerosos tipos de patógenos: bacterias, levaduras, parásitos (55-59).

Además de patógenos, las CD fagocitan eficientemente células apoptóticas y necróticas (60-66). Hay numerosas moléculas involucradas en la captación de células muertas incluyendo integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ que actúan en cooperación con CD36 (67, 68) y los receptores más recientemente descritos MER y receptor de fosfatidil serina (PSR) (69, 70).

3.4.iii Inducción de la maduración.

Los patógenos poseen en su superficie moléculas altamente conservadas – llamadas **patrón molecular asociado a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)**– a través de las cuales son reconocidos por las células del sistema inmune mediante una familia de receptores específicos, los **receptores de reconocimiento de patrones (*pattern-recognition receptors*)** (71).

Las CD juegan un rol crucial como censores de infección para la activación de la respuesta inmune adaptativa. Existen dos tipos de señales a las que pueden responder: i- reconocimiento directo de patógenos a través de los *pattern-recognition receptors* y ii- reconocimiento indirecto a través de citoquinas inflamatorias o componentes celulares. Se han reportado 5 tipos de receptores presentes en la superficie de CD que median la activación de las mismas: (i) ***Toll-like receptors (TLR)***; constituyen una familia de receptores a través de los cuales numerosos componentes derivados de patógenos (ARN doble cadena, secuencias CpG, lipopolisacáridos bacterianos (LPS)) inducen la activación de CD (71), (ii) ***receptores de citoquinas***; a través de los cuales los mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 β , PGE-2, etc., actúan sobre CD (12, 72), (iii) ***moléculas de la familia del receptor de TNF***; dichas moléculas median la interacción de CD con linfocitos T. Por ejemplo, el CD40L en la presente superficie linfocitos CD4⁺ induce la maduración de CD mediante la unión al CD40 en la superficie de CD, se sabe también que la interacción de FasL, en la superficie linfocitaria, con Fas puede inducir la maduración de CD (73, 74), (iv) ***FcR***; la unión de inmunocomplejos a estos receptores induce la maduración de CD (75-77); (v) ***censores de muerte celular***; la naturaleza de los componentes responsables de la maduración de CD por medio de dichos censores no está aún del todo definida. Se han identificado diferentes moléculas involucradas en el reconocimiento de células apoptóticas (67, 68) (69, 70), y en el reconocimiento de hsp (liberadas por células necróticas (45)). Existen numerosas controversias con respecto a la habilidad de células apoptóticas o necróticas para inducir la maduración de CD, este tema será discutido con más detalle en el Capítulo II.

3.4.iv Migración.

Una de las características distintivas de las CD es su **capacidad migratoria**. La migración está regulada por diferentes receptores de quimioquinas presentes en la superficie de CD durante los distintos estadios de maduración. Los precursores circulantes (ej. monocitos) o los derivados de médula ósea, migran hacia la periferia donde se diferencian a CD inmaduras. Esta migración responde a la acción de quimioquinas como MIP-3 α / CCL20, MIP-1 α / CCL3, MIP-1 β / CCL4, RANTES / CCL5, secretadas en los tejidos periféricos que actúan sobre los principales receptores expresados por **CD inmaduras: CCR1, CCR5 y CCR6** sólo en CD derivadas de precursores de médula ósea (78, 79). Luego de la exposición a patógenos o señales inflamatorias – *señal de peligro* – (80) comienza el proceso de maduración y la migración hacia los órganos linfoides secundarios. Durante la maduración se produce un cambio en el patrón de expresión de receptores de quimioquinas que involucra una disminución de CCR1 y CCR5 y un aumento en la expresión de **CCR7 en CD maduras**, permitiendo a las CD abandonar los tejidos periféricos y migrar hacia los ganglios en respuesta a MIP-3 β / CCL19 (78, 79) (81-83). Sin embargo, las CD no sólo migran hacia los ganglios linfáticos en respuesta a señales de peligro. Existe una migración constitutiva de CD inmaduras hacia los ganglios, que les permite censar en forma permanente la presencia de Ag propios con el propósito de inducir tolerancia (84, 85). Otros mediadores como los leucotrienos, lipotoxinas y prostaglandinas, pueden influir en la migración de CD mediante la modulación de la expresión de los receptores de quimioquinas (86-88).

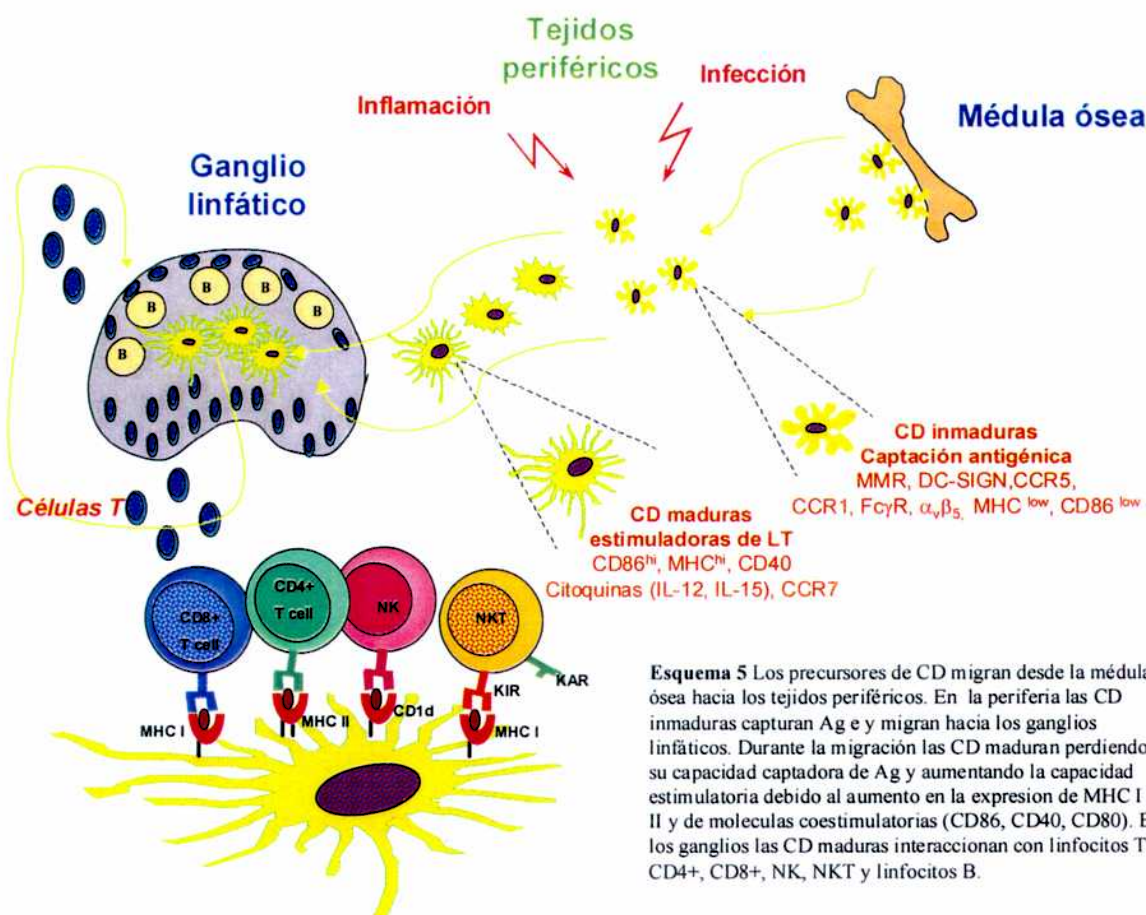
3.4.v Presentación antigénica.

Generalmente, los péptidos presentados en el contexto de MHC I provienen de la degradación de proteínas que son sintetizadas endógenamente. Sin embargo, las CD son capaces de presentar Ag exógenos, capturados por endocitosis o fagocitosis, no sólo en el contexto de **MHC II** sino también **MHC I**. Dicho mecanismo se denomina ***cross-presentación*** (89-91). Se ha demostrado que las CD cross-presentan eficientemente Ag derivados de células apoptóticas (60-63), péptidos unidos a hsps (92, 93), Ag asociados a productos bacterianos (94, 95) y Ag internalizados vía FcR (75, 96-98).

Además del aumento en la síntesis de moléculas MHC I y II durante la maduración, también se ha descrito que en CD maduras continua la síntesis de moléculas MHC I y su transporte hacia la superficie celular (89). Respecto a las moléculas MHC II, durante la maduración su síntesis aumenta en mayor proporción que las de MHC I (99) y los complejos MHC II – péptido son estabilizados en la superficie de CD maduras (89, 100). Si bien la síntesis de nuevas moléculas MHC II es inhibida en CD maduras, se pueden formar nuevos complejos MHC II – péptido utilizando las moléculas MHC II que son recicladas desde la superficie y limitando el espectro de péptidos a los derivados de Ag capturados antes y durante la maduración (101).

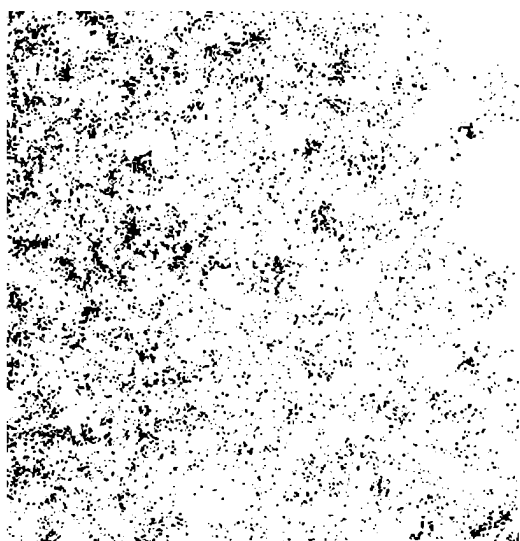
Además de la presentación en el contexto de MHC I y II, las CD expresan una tercer clase de MHC llamadas **CD1** que está relacionada con la presentación de lípidos y glicolípidos a células NKT (102).

En el Esquema 5 se resumen las características distintivas de la biología de las CD.



3.4.vi CD e Inmunoterapia.

Considerando el rol protagónico que juegan en el control de la respuesta inmune, las CD se han convertido en atractivos vectores para inmunoterapia. Estudios recientes han demostrado que las CD participan en la inducción de inflamación en enfermedades alérgicas como el asma o la dermatitis atópica (103). Se ha descrito también el aumento en el número y activación de CD en enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, en pacientes con Lupus eritematoso se ha observado activación exacerbada de CD como consecuencia del exceso de IFN- α característico de dicha enfermedad (104). Dentro del contexto de autoinmunidad y alergias, la perspectiva terapéutica de las CD se basa en su habilidad de inducir tolerancia. Por el contrario, su remarcable capacidad para activar linfocitos T naïve e inducir la respuesta inmune adaptativa está siendo explotada en el diseño de vacunas contra agentes infecciosos (105) y cáncer. Se han iniciado numerosos ensayos clínicos de Fase I y II basados en la utilización de CD en pacientes con melanoma, linfoma, mieloma, cáncer de próstata y renal(106-112). Sin embargo, aún quedan muchos interrogantes por resolver para asegurar el óptimo resultado de la inmunoterapia basada en la utilización de CD.



OBJETIVOS

Basado en el rol de las CD en el control de la inmunidad el principal objetivo del presente trabajo de Tesis fue **desarrollar una vacuna anti – melanoma mediante la utilización de CD cargadas con células tumorales apoptóticas (CD-Apo) y estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta inducida contra el tumor.**

Para lograr dicho objetivo se eligió como modelo experimental el melanoma murino B16 que por ser un tumor débilmente inmunogénico resulta de gran interés para explorar estrategias de modulación de la respuesta inmune.

En primera instancia se establecieron las condiciones óptimas para la obtención de CD murinas y se determinó su potencial para la activación de linfocitos T. Dentro de ese contexto, en el **Capítulo I** se describe la obtención de una línea celular productora de GM-CSF murino y la caracterización de las CD obtenidas a partir de precursores de médula ósea según: i) expresión de marcadores de superficie, ii) captación antigénica, iii) capacidad migratoria y iv) capacidad estimuladora.

En segunda instancia se diseñó una estrategia de vacunación utilizando CD cocultivadas con células tumorales apoptóticas. Para ello, en el **Capítulo II** i) se establecieron las condiciones para la inducción de apoptosis de células B16, ii) se evaluó la capacidad de las CD de fagocitar células B16 apoptóticas, iii) se analizó el estadio de maduración y la capacidad migratoria *in vivo* de las CD luego del cocultivo con células apoptóticas, iv) se evaluó la eficacia de la vacunación CD-Apo respecto al nivel de protección frente al desafío con células B16, la inducción de memoria inmunológica y la especificidad de la respuesta y v) se estudió el rol de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en la respuesta inducida luego de la vacunación con CD-Apo.

Finalmente, en el **Capítulo III** se estudiaron los mecanismos involucrados en la protección contra el melanoma B16 inducida por la vacunación con CD-Apo. En este marco i) se evaluaron los mecanismos celulares mediante tanto *in vitro* como *in vivo*, ii) se estudió la respuesta humoral generada contra las células B16 y iii) se analizaron los primeros pasos del rechazo tumoral a través del análisis histológico del sitio de inyección.

Materiales y Métodos

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Animales

Durante el desarrollo de este trabajo de Tesis se han utilizado ratones machos **C57BL/6** (B6; H-2^b) provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y de Taconic Farms (NY, USA); ratones **B6.SJL-Ptprc CD45.1⁺** (H-2^b) obtenidos de Taconic Farms; ratones **Balb/c** (H-2^d) provenientes de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la U.B.A. y ratones atímicos **nu / nu NIH** provenientes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en ambientes con temperatura controlada y ciclos de luz / oscuridad regulados y fueron utilizados cuando alcanzaron 6 – 8 semanas de edad. Todos los experimentos con animales fueron realizados acorde a normas éticas locales.

2 Células

2.1 Líneas celulares

Las siguientes líneas celulares fueron mantenidas en cultivo continuo en atmósfera con humedad y temperatura controladas (5 % CO₂; 37°C). Todas las células fueron mantenidas libres de micoplasma y la ausencia del mismo fue periódicamente analizada utilizando la coloración de Hoechst como se describe en III.

El melanoma murino **B16** (H-2^b) (113) es un tumor no inmunogénico de origen espontáneo. Expresa niveles bajos o no detectables de moléculas de MHC clase I, no expresa moléculas de MHC clase II y es altamente tumorigénico. La línea B16-F1 (cedida gentilmente por Dr. Annunziata Vecchi, Instituto Mario Negri, Milán) de crecimiento en forma de monocapa adherente, fue mantenida en cultivo en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies, MD o Natocor, Argentina), 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina y 100 µg / ml estreptomycin (Gibco BRL). Para el desarrollo de tumor en animales, las células fueron

cosecadas luego de una incubación con una solución de EDTA 0,5 mM a 37° C durante 5 min y lavadas sucesivamente con buffer fosfato (PBS). $1,3 \times 10^4$ o 1×10^5 células fueron resuspendidas en 0,1 ml de PBS e inyectadas en ratones C57BL/6 en forma subcutánea (s.c.) en el flanco y el tamaño tumoral fue medido con un calibre día por medio. Teniendo en cuenta que la cinética del crecimiento tumoral fue similar con ambas cantidades de células, se eligió la menor para ser utilizada en los experimentos de inmunización.

El linfoma murino **EL-4** (H-2^b) obtenido por inducción química (114), fue utilizado como tumor control. La línea EL-4 (cedida gentilmente por el Dr Ralph Steinman, The Rockefeller University, New York) de crecimiento en suspensión, fue mantenida en cultivo en medio RPMI 1640 (Sigma) suplementado con 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina y 100 µg / ml estreptomicina. Para el desarrollo de tumores, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas para su inyección como se describió previamente.

La línea **CHO**, establecida a partir de una biopsia de ovario de hamster chino (115) fue obtenida de la ATCC (CCL61) y mantenida en cultivo en medio Ham's F12 (Sigma) suplementado con 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina y 100 µg / ml estreptomicina. Las células CHO fueron utilizadas para la obtención de células productoras de factor de estimulación de colonias de macrófagos y granulocitos murino (mGM-CSF) como se detalla en IV.

2.2 Híbridosomas:

Los híbridomas **GK 1.5** (116) productor de IgG de rata con actividad anti-CD4 murino y **53-6.72** (117) productor de IgG de rata con actividad anti-CD8 murino (cedidos gentilmente por Dr. A. Vecchi) fueron mantenidos en cultivo en medio RPMI suplementado con 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina y 100 µg / ml estreptomicina. Para la obtención de anticuerpos monoclonales, $1 - 1,2 \times 10^7$ células fueron inyectadas intraperitonealmente (i.p) en ratones atímicos que fueron previamente tratados con 0,5 ml de Pristane (Sigma). La ascitis fue obtenida 15 días más tarde por punción peritoneal y la concentración de IgG de rata fue medida por inmunodifusión radial utilizando el kit BIND A RID (The Binding Site Ltd., Birmingham, U.K.)

2.3 Células dendríticas (CD)

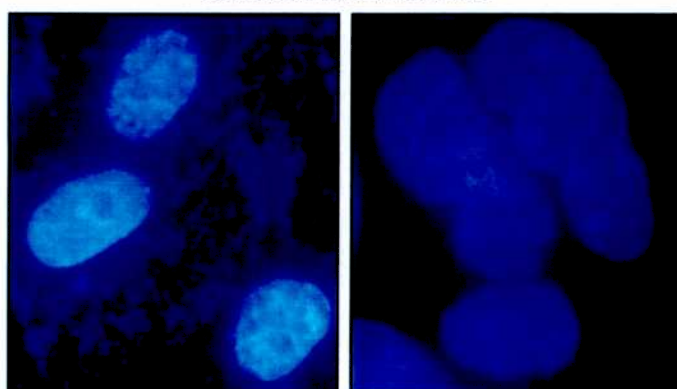
Las CD fueron obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 utilizando el método descrito por Lutz et al (118) levemente modificado. Se extirparon cuidadosamente los fémures y tibias y los restos de tejido muscular fueron removidos con una gasa estéril. Los huesos intactos fueron sumergidos en EtOH 70 % por 2 – 4 min. y luego lavados con RPMI a 4°C. A continuación se cortaron las epífisis de ambos extremos y se extrajo la médula ósea por inyecciones sucesivas de RPMI utilizando una jeringa de 1 ml con aguja de 25G 5/8. Por otra parte, se desmenuzaron las epífisis sobre una malla de nylon y se colocó la suspensión celular junto a la anterior en un tubo cónico de 50 ml. Las células se lavaron 2 veces llevando a 50 ml con RPMI y se contaron (excluyendo los glóbulos rojos) obteniéndose $4 - 5 \times 10^7$ leucocitos por ratón. Para la obtención de CD los leucocitos de médula ósea fueron cultivados en presencia de mGM-CSF. El día 0 se sembraron $2 - 4 \times 10^6$ leucocitos por placa de Petri de bacteriología de 100 mm de diámetro en 10 ml de RPMI suplementado con 10 % FBS, 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina, 100 µg / ml estreptomicina, 20 µg / ml gentamicina, (Gibco BRL) y 50 µM 2-mercaptoetanol (Sigma) y 10 % de sobrenadante de cultivo de células productoras de mGM-CSF o 200 U /ml rmGM-CSF (Sigma). El día 3 se agregaron 8 ml del mismo medio a las placas. Las CD inmaduras fueron cosechadas el día 5 y utilizadas para los distintos experimentos in vitro e in vivo. Para obtener CD maduras, el día 6 la mitad del sobrenadante de cultivo fue centrifugado y el pellet celular fue resuspendido en igual volumen de medio fresco. El día 7 se agregaron 0,1 µg / ml de lipopolisacárido bacteriano de *Ps. Aeruginosa* (LPS) (Sigma) a cada placa y luego de 24 – 48 hs las CD maduras fueron cosechadas y utilizadas para los diversos experimentos.

3 Detección de micoplasma

La detección de micoplasma se realizó utilizando la coloración de Hoechst (119). Brevemente, las células fueron sembradas sobre un cubreobjetos previamente flameado en alcohol, en una placa de Petri de 35 mm de diámetro en 2 ml del medio correspondiente y se incubaron durante 24 – 48 hs. Sin descartar el medio se agregó un volumen de fijador Carnoy (metanol:ácido acético 3:1) durante 2 min. a temperatura ambiente. Luego, se descartó el medio y se agregó 1 ml de Carnoy fresco durante 5 min. Se descartó el fijador y se repitió el

último paso. El vidrio con las células adheridas se dejó secar al aire y una vez seco se agregó el colorante de Hoechst (0,5 µg / ml) (Sigma). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 min protegido de la luz y luego se lavó 2 veces con H₂O destilada. Nuevamente se dejó secar el vidrio al aire y se montó sobre un portaobjetos con la cara conteniendo las células adheridas hacia abajo. El resultado fue observado al microscopio de fluorescencia utilizando filtros Dapi donde la contaminación con micoplasma se evidenció por la presencia de un puntilleado fluorescente intra y / o inter citoplasmático.

Coloración de Hoechst



Positiva

Negativa

4 Obtención de células productoras de mGM-CSF

Para obtener una línea de células productoras de mGM-CSF, células CHO fueron transfectadas con el fragmento cDNA de 426 pb correspondiente a la región codificante del mGM-CSF clonado en el vector de expresión pcDNA3 en los sitios Hind III / Xho I (pcDNA-mGM-CSF; cedido gentilmente por el Dr. Oscar Burrone, ICGEB, Trieste, Italia). Con dicho fin, se amplificó el ADN plasmídico transformando bacterias *Escherichia coli* DH5 (ATCC 53868) por electroporación utilizando las siguientes condiciones: capacitancia: 25 µFD, resistencia: 200 Ω y voltaje: 2,5 KV. Luego de la electroporación las bacterias se sembraron en agar / LB / en presencia de ampicilina para seleccionar aquellas bacterias que incorporaron el plásmido y se incubaron durante toda la noche a 37°C. Luego se picó una colonia y se sembró en 100 ml de medio LB / ampicilina e incubó a 37°C durante 12 – 16 hs en agitación hasta que los cultivos alcanzaron una D.O = 0,6. A partir de este cultivo se extrajo el ADN plasmídico utilizando el kit QUIAGEN Midi siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido fue analizado cuantitativamente por espectrofotometría UV y cualitativamente

en un gel de agarosa 0,7 % revelado con bromuro de etidio. Para una estimación del peso molecular, el ADN purificado fue obtenido en forma lineal luego de una digestión enzimática utilizando la enzima Hind III (PROMEGA) de sitio único acorde al mapa de restricción del vector pcDNA3. Por otra parte, se realizó la digestión enzimática con las enzimas Hind III y Xho I para verificar la presencia del fragmento de PM correspondiente a la región codificante del mGM-CSF.

Una vez purificado y cuantificado el ADN plasmídico, se transfectaron células CHO en forma estable por el método de co-precipitación con fosfato cálcico / ADN (120). La transfección se realizó cuando las células alcanzaron el 50 – 60 % de confluencia en una placa de Petri de 100 mm de diámetro agregando en forma lenta 1 ml de la solución de fosfato cálcico conteniendo 10 µg del ADN plasmídico. Las células fueron incubadas en presencia de esta solución durante 24 hs, luego se lavaron e incubaron nuevamente por 24 hs. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia se realizaron distintas diluciones y se incubaron en medio selectivo (Ham's F12 / G418 0,5 mg / ml). El medio selectivo fue renovado cada 3 días descartándose las células muertas y al cabo de 21 días se cosecharon los clones resistentes que fueron expandidos en forma independiente para evaluar posteriormente la producción de mGM-CSF.

4.1 Evaluación de la expresión de mGM-CSF en las células CHO transfectadas (CHO-GM-CSF)

La expresión del mGM-CSF fue evaluada en los clones de células CHO seleccionados luego de la transfección según los siguientes criterios:

- i) Expresión del ARNm
- ii) Expresión de la proteína
- iii) Actividad biológica de la proteína

i) La expresión del ARNm del mGM-CSF fue evaluada por Dot-blot. A partir de un pellet de 2×10^6 células de cada uno de los clones seleccionados se extrajo el ARN total utilizando TRIZOL Reagent y siguiendo las instrucciones del fabricante (Life Technologies, Gibco BRL). Una vez purificado y cuantificado el ARN, se sembraron 5 µg de ARN de cada uno de los clones en una membrana de nylon previamente hidratada, se aplicó vacío y luego

se realizó el crosslinking (Stratalinker 2400, Stratagene). Para la hibridación se preparó una sonda a partir del pcDNA-mGM-CSF. Para ello se obtuvo el inserto correspondiente al mGM-CSF sometiendo al plásmido a digestión enzimática con las enzimas XhoI y Hind III (Promega). El producto de dicha digestión se corrió en un gel de agarosa 0,8% revelado con bromuro de etidio a partir del cual se extrajo la banda de peso molecular correspondiente al mGM-CSF. El ADN fue luego purificado con el kit Wizard PCRPreps DNA Purification System acorde a las instrucciones del fabricante (Promega). La sonda obtenida se marcó con ^{32}P utilizando el kit Prime-a-Gene Labeling System siguiendo el protocolo del fabricante (Promega). Una vez obtenida la sonda con la marca radioactiva se realizó la hibridación de la membrana de Dot-blot y se reveló por autoradiografía siguiendo las instrucciones del fabricante (Hybond-N+, Amersham).

ii) La expresión de la proteína mGM-CSF fue evidenciada mediante un ensayo de ELISA. A tal efecto se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo de los clones previamente seleccionados según su expresión de RNAm. Los sobrenadantes fueron obtenidos a partir de 1×10^6 células cultivadas en medio Ham's F12 libre de suero durante 24 hs. En una placa de 96 pocillos (MaxisorpTM) se sembraron 30 μl / pocillo de cada sobrenadante o mGM-CSF purificado estándar (Sigma) y se incubó durante toda la noche a 37°C. Luego de 3 lavados con PBS se bloqueó con seroalbúmina bovina 1 % (BSA) durante 1 h a temperatura ambiente (Ta), se lavó nuevamente y se incubó con anticuerpo de conejo anti-mGM-CSF (PeproTech Inc) durante 1 h a 37°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados con buffer de lavado (PBS / 0,1 % BSA / 0,05 % Tween) y se incubó con anticuerpo anti-Igs de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) (Sigma) durante 45 min a Ta. Luego de sucesivos lavados con buffer de lavado, la unión del anticuerpo fue revelada agregando el sustrato o-fenilendiamina (OPD) 1 mg/ml en buffer citrato 0,1 M pH 4,5 / 0,012 % H_2O_2 a Ta protegido de la luz. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 8 N y el desarrollo de color se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad 3550) a 415 nm.

iii) La actividad biológica de la proteína mGM-CSF fue evaluada en el cultivo de CD obtenidas a partir de precursores de médula ósea como se describió arriba. Las CD fueron cultivadas en presencia de 10 % sobrenadante de cultivo de los clones seleccionados y caracterizadas como se detalla en VI.

5 Anticuerpos

Durante la realización de este trabajo de Tesis se utilizaron los siguientes anticuerpos purificados, conjugados a fluorocromos o enzimas e inmunoglobulinas estándar:

Anti-MHC-I (H2-K^b), -MHC-II (I-A^b), -CD80, -CD86, -CD40, -Gr-1 y anti-CD16/32 murino purificados; anti-MHC-II (I-A^b), -CD86, -CD11c, -CD4 y anti-CD8 murino conjugados con FITC; anti-CD11c murino conjugado con PE; anti-CD45.2 murino conjugado con biotina; anti-IgM de hamster conjugado con FITC; IgG de rata estándar conjugada con FITC; IgG de ratón estándar conjugada con FITC y estreptoavidina conjugada con allophycocianin (APC); todos ellos obtenidos de PharMingen, BD Biosciences. Los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas NLDC-145 (anti-DEC-205 murino) y N-418 (anti-CD11c murino) fueron cedidos gentilmente por Dr. A. Vecchi. IgG de rata e IgG de ratón purificadas, anti-IgG1, -IgG2a, -IgG2b e -IgG3 de ratón, anti-Igs de rata y anti-Igs de ratón conjugados con FITC fueron obtenidos de Sigma, anti-IgG de hamster conjugado con FITC, anti-IgG de rata conjugado con Cy3 y anti-Igs de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (PA), de Jackson ImmunoResearch Laboratorios y anti-Igs de ratón conjugado con HRP de Zymed.

6 Caracterización de las CD

6.1 Determinación de marcadores de superficie

Las moléculas CD11c, MHC clase I y clase II, CD80, CD86, CD40 y DEC-205 son utilizadas como marcadores de superficie de CD. La expresión de las mismas fue evidenciada por inmunofluorescencia y analizada por citometría de flujo utilizando un FACS Vantage SE (Becton Dickinson). Para ello, 1×10^6 células se incubaron 15 min a 4°C con el anticuerpo anti-CD16/32 previamente a la incubación con el anticuerpo correspondiente con el fin de bloquear los receptores Fc y evitar la unión inespecífica de los anticuerpos utilizados a continuación. Sin lavar, las células fueron incubadas con las diluciones correspondientes de los anticuerpos, realizadas en PBS / 0,1% FBS, e incubadas a 4°C durante 1 h. En el caso de inmunofluorescencia directa, donde los anticuerpos estaban conjugados a distintos fluorocromos, las células fueron lavadas exhaustivamente con el mismo diluyente y fijadas

con formol 4% durante 10 min. Finalmente las células fueron lavadas y resuspendidas en PBS para su análisis por citometría. Los resultados fueron evaluados tanto para porcentaje de células positivas como para intensidad de fluorescencia media utilizando el software adecuado (FlowJo Tree Star Software; CellQuest o WinMDI). Para la realización de inmunofluorescencia indirecta, luego de la incubación con el primer anticuerpo las células se lavaron con PBS / 0,1% FBS y se incubaron con la dilución del conjugado correspondiente durante 45 min a 4°C. Posteriormente se continuó como se describió previamente. En todos los casos se incluyeron las Igs estándar correspondientes como control de unión inespecífica.

6.2 Capacidad estimulatoria. Cultivo mixto linfocitario alogeneico:

Para evaluar la capacidad estimulatoria, CD obtenidas de ratones C57BL/6 fueron cocultivadas con esplenocitos obtenidos de ratones Balb/c. Para ello se extrajo el bazo de ratones Balb-c y los esplenocitos fueron obtenidos por disgregación mecánica con fórceps. La suspensión celular obtenida fue filtrada por una malla de nylon para retener los restos de tejido y los glóbulos rojos fueron lisados con una solución de cloruro de amonio 1,66 %. Las células se lavaron con PBS y contaron. 1×10^5 esplenocitos fueron sembrados por triplicado en placas de 96 pocillos de fondo en U (Costar) y cultivados en presencia de distintas concentraciones de CD que fueron previamente tratadas con Mitomicina C (Sigma) 50 μ g/ml durante 20 min a 37°C. Luego de 3 días de cultivo se realizó un pulso con 1 μ Ci / pocillo de (121)-metil-timidina (NEN) por 16 hs y los cultivos fueron cosechados sobre filtros de fibra de vidrio (Whatman). Por último se midió la radioactividad utilizando un contador de centelleo líquido (Wallac).

6.3 Capacidad migratoria

6.3.i Ensayo de migración in vitro

La capacidad migratoria de las CD fue evaluada utilizando un ensayo de quimotaxis. Dicho ensayo consistió en la utilización de una cámara de quimotaxis de 48 pocillos (Neuroprobe Inc.) donde en el compartimiento inferior se colocó un volumen de medio RPMI conteniendo el quemoattractante a ensayar (fMLP 10^{-8} M, Sigma; MIP3 β 100 ng / ml y MIP 1 α 100 ng / ml, ambos cedidos por Dr. A. Vecchi) formando un menisco positivo. Luego se

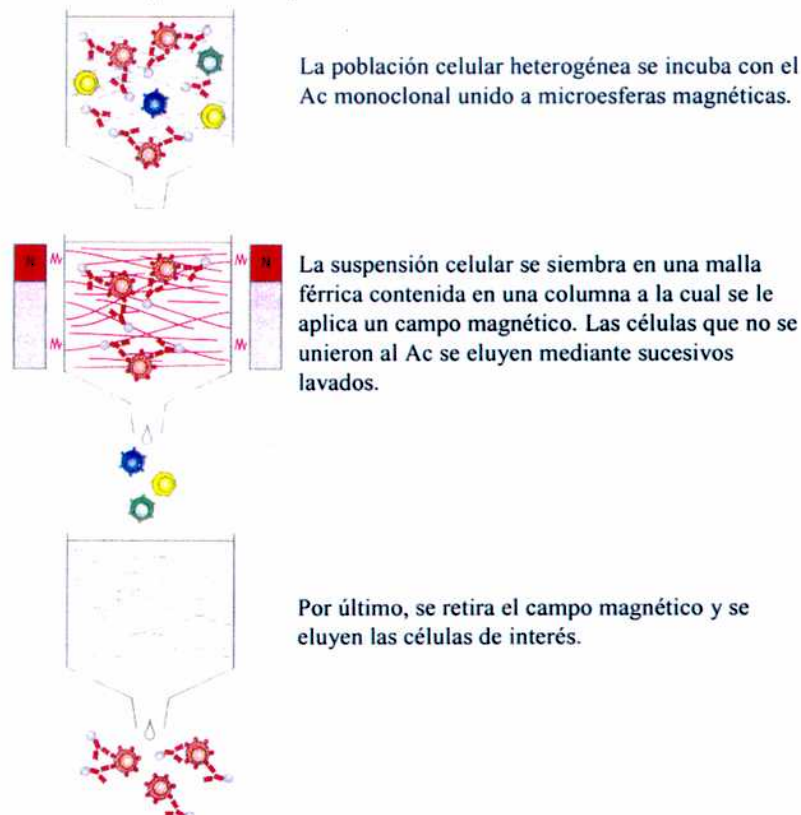
colocó el filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 5 μm (NeuroProbe Inc.), el sello de silicona y la placa superior de la cámara. En el compartimiento superior se sembraron 75000 células por pocillo evitando que quede aire atrapado de manera que las células estén en contacto con el filtro de policarbonato, y fueron incubadas durante 90 min a 37 °C. Luego de la incubación el filtro fue coloreado para su observación al microscopio. Para ello se invirtió la cámara colocando la cara del filtro con las células migradas hacia arriba y utilizando un clamp se levantó el filtro rápidamente desde un extremo. Luego se colocó otro clamp en el extremo opuesto y se apoyó el filtro sobre PBS cuidando de no lavar la superficie con las células migradas. Las células no migradas fueron barridas inmediatamente desplazando el filtro desde un extremo a otro sobre una hoja de barrido (NeuroProbe Inc.). El filtro fue sumergido en metanol durante 3 – 5 min para fijar las células migradas y luego coloreado con Giemsa (1 gota / ml H_2O neutra) durante 20 – 30 min y lavado con agua corriente. Finalmente, se montó el filtro húmedo sobre un portaobjetos y una vez seco se observó al microscopio y se contaron las células migradas. El resultado fue expresado como el promedio de células migradas en 5 campos con aumento 1000x y los experimentos fueron realizados por triplicado.

6.3.ii Ensayo de migración *in vivo*

Con el propósito de evaluar la capacidad migratoria *in vivo* las CD fueron marcadas utilizando el fluorocromo carboxifluorescein-diacetato-succinimidil-ester (CFSE; Molecular Probes). Para ello las células fueron lavadas con una solución de PBS / 0,1 % BSA y resuspendidas en una concentración de 1×10^7 cel. / ml. Las células se marcaron agregando 1 μl de una solución stock 5 mM de CFSE para obtener una concentración final de 5 μM y fueron incubadas durante 10 min a 37°C. Inmediatamente después se detuvo la reacción agregando igual volumen de FBS y se realizó un lavado con PBS / 0,1 % BSA y luego otro con PBS. Las CD marcadas fueron resuspendidas en PBS y se inyectaron 5×10^5 cel. / 0,1 ml en forma s.c. en la almohadilla plantal. Luego de 24 hs se extrajeron los ganglios linfáticos regionales y se purificaron las células CD (CD11c^+) por selección positiva utilizando microesferas magnéticas cubiertas con anticuerpos monoclonales (Miltenyi Biotec, Alemania). Los ganglios fueron disgregados mecánicamente e incubados con una solución de colagenasa 400 U / ml (Roche) durante 25 min a 37°C, luego se agregó una solución de EDTA 10 mM concentración final y se incubó nuevamente a 37°C durante 5 min. La

suspensión celular obtenida se trasvasó a un tubo cónico de 15 ml con medio RPMI / 5 % FBS frío y se centrifugó 5 min a 1200 rpm. A continuación se realizó un lavado con PBS frío y otro con PBS / 0,5 % BSA / 2 mM EDTA (MACS buffer) y se resuspendieron las células en MACS buffer en una concentración de 1×10^7 cel. / 80 μ l. Luego se agregaron 20 μ l / 1×10^7 cel. de microesferas magnéticas cubiertas con anti-CD11c y se incubó la suspensión celular durante 30 min a 4°C. Las células fueron lavadas con MACS buffer y resuspendidas en 0,5 ml del mismo buffer. Las células CD11c positivas fueron obtenidas por aplicación de un campo magnético utilizando las columnas miniMACS (Miltyeni Biotec) según las instrucciones del fabricante. Finalmente, se realizó la tinción con anti-CD11c-PE y la citometría de flujo como se describió previamente y se calculó el porcentaje de células migradas como el porcentaje de células CFSE+ / PE+.

Purificación de células por selección positiva



6.4 Captación antigénica.

6.4.i Capacidad fagocítica. Fagocitosis de levaduras.

Para evaluar la capacidad fagocítica, CD inmaduras de 5 días de cultivo fueron incubadas en presencia de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* autoclavadas en relación CD : levadura 1:10. Luego de 2 hs a 37°C, 5% CO₂, los cultivos fueron lavados con PBS eliminando las levaduras que no estuvieran unidas a las CD y coloreados o incubados nuevamente durante toda la noche. Los cultivos fueron coloreados con May Grunwald-Giemsa y observados al microscopio óptico. La capacidad fagocítica fue expresada como el porcentaje de CD que fagocitaron 1 – 5, 6 – 10 y >10 levaduras / CD contadas con un aumento de 400x en un total de 50 campos.

6.4.ii Capacidad endocítica. Endocitosis de Dextran

La capacidad endocítica de CD inmaduras y CD maduras fue evidenciada utilizando Dextran fluoresceinado (Dx-FITC). CD de 5 días de cultivo o CD maduras con LPS fueron incubadas en presencia de 1 mg / ml de Dx-FITC en medio RPMI / 10 % FBS durante 30 min a 37°C. Luego de la incubación se realizaron sucesivos lavados con PBS y las células fueron fijadas con formol 4 % durante 10 min y lavadas nuevamente. Luego se realizó el análisis por citometría de flujo y la capacidad endocítica fue expresada como el porcentaje de células positivas. Alternativamente las células fueron observadas por microscopía confocal utilizando un equipo Zeiss LSM 510.

6.5 Microscopía electrónica

Para su observación al microscopio electrónico las células fueron fijadas con glutaraldehído 3 % y post fijadas con tetróxido de osmio. Luego de ser deshidratadas fueron embebidas en resina Suprr para ser cortadas en ultramicrotomo y coloreadas con citrato de plomo para su observación en el microscopio TEM JEOL 1200EXII perteneciente al Servicio de Microscopía Electrónica, CICV, INTA-Castelar.

7 Inducción y detección de apoptosis y necrosis de células B16

La apoptosis de las células B16 fue inducida por radiación ionizante. Cuando las células alcanzaron 70 – 80 % de confluencia fueron cosechadas utilizando una solución de EDTA 0,5

M y lavadas con PBS. Las células fueron resuspendidas en DMEM sin suero en botellas de cultivo de 25 cm² completando el volumen total de la botella para evitar que quede aire en su interior y fueron irradiadas con dosis de 50 Gy, 70 Gy y 100 Gy en un Siemens Lineal Accelerator (Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina). Para determinar la apoptosis las células fueron cosechadas por pipeteo luego de 0 h, 24 hs, 48 hs y 72 hs de cultivo en DMEM / 5 % FBS y se realizó la tinción con Anexina V y ioduro de propidio (IP) como colorante vital, utilizando el Annexin V-FITC Detection kit (PharMingen) acorde a las instrucciones del fabricante. El porcentaje de apoptosis fue determinado por citometría de flujo como Anexina V+ / IP- para la apoptosis temprana y Anexina V+ / IP+ para la necrosis secundaria. La necrosis de las células B16 fue inducida por cuatro ciclos rápidos de congelación / descongelación. Para ello las células fueron resuspendidas en DMEM y congeladas en N₂ líquido, cuando las células alcanzaron el punto de congelación fueron rápidamente descongeladas a 37°C y una vez descongeladas fueron nuevamente sumergidas en N₂ líquido. Luego de cuatro ciclos la necrosis fue determinada como células Anexina V+ / IP+ utilizando el mismo kit.

8 Cocultivo de CD con células B16 apoptóticas

CD inmaduras de 5 días de cultivo fueron marcadas utilizando el colorante fluorescente verde PKH-67 según el protocolo del fabricante (Sigma) y cocultivadas con células B16 apoptóticas que fueron previamente marcadas con el colorante fluorescente rojo PKH-26 (Sigma) en una relación 1 : 1. Las células fueron cocultivadas a 37°C, 5 % CO₂ durante 0 h, 2 hs, 4 hs y 24 hs en el medio de cultivo condicionado de las CD en tubo cónico de 15 ml (1 x 10⁶ cel. / ml), luego se lavaron y analizaron por citometría de flujo. La fagocitosis fue determinada como el porcentaje de células doble positivas y alternativamente por microscopía confocal (Zeiss LSM 510). Para descartar la unión inespecífica CD – célula apoptótica los cocultivos fueron realizados a 4°C. La fagocitosis de las células B16 necróticas fue determinada siguiendo el mismo protocolo. Para los ensayos de inmunización de animales los cocultivos fueron realizados en las mismas condiciones pero las células se utilizaron sin marcar.

9 Caracterización de las CD cocultivadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo)

Las CD fueron caracterizadas luego del cocultivo con células B16 apoptóticas en función de su expresión de marcadores de superficie, su capacidad endocítica y su capacidad migratoria *in vivo*. La expresión de las moléculas CD11c, MHC II y CD86 así como la endocitosis de Dx-FITC fue analizada por citometría de flujo como se explicó en las secciones VI-1 y VI-4.ii respectivamente. Para evaluar la capacidad migratoria *in vivo* de las CD-Apo, CD obtenidas de ratones C57BL/6 (CD45.2⁺) fueron cocultivadas con células B16 irradiadas como se detalló arriba e inyectadas en forma s.c. en la almohadilla plantal de ratones B6.SJL-Ptprc (CD45.1⁺). Luego de 24 hs los ganglios regionales fueron extraídos y disgregados para obtener una suspensión unicelular como se detalló en VI-3.ii. En la suspensión celular obtenida se evaluó la presencia de las CD CD45.2⁺ y su expresión de las moléculas CD11c, MHC II y CD86. Para ello se realizó una inmunofluorescencia triple incubando las células con anti-CD45.2-APC, anti-CD11c-PE y anti-MCH II-FITC o anti-CD86-FITC y se analizó por citometría de flujo. La expresión de MHC II y CD86 de las CD migradas fue evaluada únicamente en la región seleccionada de células CD45.2⁺/CD11c⁺. Los resultados obtenidos con las CD-Apo fueron comparados con los obtenidos con CD sin cocultivo previo.

10 Inmunización de ratones C57BL/6

La inmunización de ratones machos de 6 – 8 semanas de edad fue realizada semanalmente durante cuatro semanas. Los animales fueron inyectados en forma s.c. alternando el flanco izquierdo y derecho con las siguientes preparaciones celulares:

CD-Apo: CD cocultivadas con células B16 apoptóticas

CD: CD solamente

Apo: células apoptóticas solamente

CD + Apo: CD más células B16 apoptóticas sin cocultivo previo

CD-Nec: CD cocultivadas con células B16 necróticas

Nec: células B16 necróticas solamente

CD-Espl: CD cocultivadas con esplenocitos singeneicos irradiados

Vehículo: PBS

Todos los grupos recibieron en cada inyección 2×10^5 células en 0,1 ml de PBS y una semana después de la última inyección los animales fueron desafiados con $1,3 \times 10^4$ células B16 viables inyectadas s.c. Los animales fueron examinados día por medio y considerados positivos cuando el tumor fue palpable. El tamaño tumoral fue medido utilizando un calibre de vernier y el volumen fue calculado según la fórmula $d^2 \times D/2$, donde d corresponde al diámetro menor y D al diámetro mayor medidos. Los animales con tumor fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 25 cm^3 o cuando se encontraban severamente ulcerados. En el caso de los animales libres de tumor, los experimentos fueron terminados 12 semanas luego del desafío tumoral y se realizó la autopsia para descartar la presencia de células tumorales. Para el control de especificidad un grupo de animales inmunizado con CD-Apo fue desafiado con de la misma forma con células EL-4. Todos los experimentos incluyeron entre 10 y 13 animales por grupo.

11 Detección de memoria inmunológica

La inducción de memoria inmunológica fue evaluada de dos formas. En primer lugar, los animales inmunizados con CD-Apo y desafiados con B16 que permanecieron libres de tumor hasta la semana 12, recibieron un segundo desafío con células B16 en la semana 13 y fueron nuevamente observados día por medio durante 12 semanas. Por otra parte, grupos de 10 ratones fueron inyectados con CD-Apo o con PBS como se describió previamente y desafiados con células B16 viables 10 semanas después de la inmunización. Nuevamente los animales fueron observados día por medio para evaluar el desarrollo tumoral durante 12 semanas.

12 Caracterización de la respuesta anti-tumoral

12.1 Mecanismos celulares

12.1.i Depleción leucocitaria in vivo

Para la depleción de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺, grupos de 10 animales previamente inmunizados con CD-Apo recibieron 1 mg de anticuerpo monoclonal anti-CD4 (clon GK1.5) o anti-CD8 (clon 53-6.72). Los anticuerpos fueron obtenidos como se describió en II-2. La cantidad total de anticuerpo fue repartida en tres inyecciones consecutivas, i.v. el día -1 seguida de dos inyecciones i.p. en los días 0 y 1. El desafío tumoral fue realizado el día 0 con $1,3 \times 10^4$ células B16 en forma s.c. y los animales fueron observados día por medio durante 12 semanas. La depleción de los linfocitos fue evaluada por inmunofluorescencia en el bazo de los animales inyectados con los correspondientes anticuerpos. Alternativamente, un grupo de animales inmunizados con CD-Apo recibió la misma cantidad de IgG de rata estándar (Sigma) como control.

12.1.ii Detección de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ productores de IFN γ

Los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ fueron purificados por selección positiva a partir del bazo de ratones inmunizados previamente con CD-Apo o ratones control. La purificación de los linfocitos fue realizada utilizando microesferas magnéticas cubiertas con anti-CD4 o anti-CD8 como se describió en VI-3ii. Los linfocitos purificados fueron reestimulados *in vitro* en microplacas de 96 pocillos (3×10^5 cel. / pocillo) con células B16, CD-Apo, CD o CD que fueron previamente cargadas (1h 37°C, 1 μ M) con el péptido específico de melanoma TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (SVYDFFVWL, cedido gentilmente por el Dr. A. Kalergis, The Rockefeller University) o con un péptido control de ovoalbúmina (OVA) (SIINFEKL, Genemed Synthesis, Inc., USA). Luego de 48 hs de cultivo en medio Click's (Gibco) suplementado con 0,75 % de suero murino, la concentración de IFN γ presente en el sobrenadante fue medida por ELISA (OptEIA™ Kit, BD PharMingen) según protocolo del fabricante.

12.1.iii Ensayo de citotoxicidad in vivo

Este ensayo permitió evidenciar *in vivo* la presencia de células citotóxicas específicas contra Ag del tumor. Esplenocitos singeneicos fueron divididos en dos poblaciones, una de

ellas fue marcada con alta concentración de CFSE como se explicó en VI-3ii (5 μM) y se la llamó CFSE^{hi} y la otra fue marcada con una baja concentración (0,5 μM) y se la llamó CFSE^{low}. La población CFSE^{hi} fue cargada con el péptido TRP-2₁₈₀₋₁₈₈ (1 μM) y la población CFSE^{low} permaneció sin cargar. Las células CFSE^{low} fueron mezcladas con igual cantidad de células CFSE^{hi}. 1×10^7 o 5×10^6 células de dicha suspensión celular fueron inyectadas i.v. en animales que previamente fueron inmunizados con CD-Apo o CD. 10 hs después de la inoculación de las células marcadas se extrajeron bazo y ganglios, se disgregaron mecánicamente y se realizó el análisis por citometría de flujo en las suspensiones celulares obtenidas. El porcentaje de lisis específico se calculó utilizando la siguiente fórmula: $\{1 - (\text{relación sin cargar/relación cargadas}) \times 100\}$, donde relación sin cargar corresponde al % CFSE^{lo} / CFSE^{hi} presentes en los animales control inyectados con CD y relación cargadas corresponde al % CFSE^{lo} / CFSE^{hi} presentes en los animales vacunados con CD-Apo.

12.2 Mecanismos humorales. Detección de anticuerpos.

12.2.i Técnica de ELISA

Para obtener el suero de los animales vacunados o controles se extrajo sangre por punción cardíaca y se la dejó reposar 30 min a 37°C, luego se centrifugó 10 min a 2500 rpm y el suero obtenido fue conservado en pequeñas alícuotas a -70°C hasta su uso. La presencia de Acs anti células B16 en dichos sueros fue analizada por ELISA. Brevemente, en una placa de 96 pocillos se sembraron 1×10^4 células B16 por pocillo, a las 24 hs las células se fijaron con formol 4% durante 10 min a Ta y se lavaron con PBS. Luego se bloqueó con PBS / 1 % BSA 1 h, Ta y se incubó con distintas diluciones de suero durante toda la noche a 4 °C. Se realizaron cuatro lavados y se incubó con un anticuerpo anti-Igs de ratón conjugado con HRP durante 45 min, Ta. Luego de cuatro lavados se reveló con OPD 1 mg/ml en buffer citrato 0,1 M pH 4,5 / 0,012 % H₂O₂ a Ta protegido de la luz. La reacción se detuvo con ácido sulfúrico 8 N y el desarrollo de color se leyó en un lector de ELISA (Bio-Rad 3550) a 415 nm. Las diluciones de los sueros y los lavados se hicieron con PBS / 0,1 % BSA.

12.2.ii Inmunofluorescencia indirecta:

Alternativamente, los sueros fueron analizados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) tanto sobre células B16 viables como fijadas y permeabilizadas. Las células fueron cosechadas con una solución de EDTA 0,5 M y lavadas 2 veces con PBS. Para la IFI sobre células viables, luego de los lavados las mismas se incubaron con suero de cabra 10 % 30 min, Ta y luego con una dilución 1 / 100 del suero a ensayar durante 1h. A continuación se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó con suero de cabra anti-Igs de ratón conjugado con FITC durante 45 min. Luego de sucesivos lavados con PBS las células se fijaron con formol 4 % durante 10 min y se analizaron por citometría de flujo. En el caso de la IFI sobre células permeabilizadas, antes de realizar el bloqueo con suero de cabra las células se fijaron con formol 4 % 10 min y luego se incubaron con saponina 0,01% 15 min. Luego se continuó como se describió para las células viables realizando las incubaciones con los antisueros en presencia de saponina 0,01 %.

12.2.iii. Western Blot

El Western Blot (WB) se realizó sobre extractos de membrana de células B16 o de piel normal, obtenidos por tratamiento durante 20 - 30 min a 4°C con buffer de lisis (Tris-ClH 50 mM pH 8,0, NP40 1 %, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM y PMSF 1 mM) y centrifugación 20 min a 10000 rpm en frío. Para el extracto de piel, el tejido fue pulverizado bajo nitrógeno líquido y homogeneizado utilizando un homogenizador Politrón en presencia de buffer de lisis. La concentración proteica fue medida por el método de Lowry (Lowry OH, 1951) y se sembraron 25 µg por calle en un gel de poliacrilamida 10 %. La corrida electroforética fue realizada a 60 volts durante los primeros 15 min y luego se aumentó a 100 volts. La transferencia a una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm, Sigma) se efectuó a 90 volts durante 60 min en frío. La membrana fue bloqueada con leche en polvo descremada al 5 % en PBS durante 1 h a Ta y luego incubada con el suero diluido 1 / 25 en PBS / 2 % leche durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, luego de 3 lavados con PBS / 0,05 % Tween 20 en agitación 10 min, las membranas fueron incubadas con anti-Igs de ratón-PA 1 / 10000 1 h a Ta. Se repitieron los lavados y se reveló utilizando como sustrato de la enzima el reactivo BCIP-NBT (Gibco, BRL) en buffer Tris 0,1 M pH 9,5, ClNa 0,1 M, Cl₂Mg 50 mM.

13 Análisis histológico del sitio de inoculación del tumor:

El análisis histológico del sitio de inoculación del tumor fue realizado en animales vacunados con CD-Apo o controles que fueron sacrificados a distintos tiempos después del desafío tumoral. El sitio de inyección fue extirpado, fijado en formol 4 % y deshidratado para luego ser embebido en parafina. Secciones de 5 – 6 μm fueron desparafinadas y rehidratadas para ser teñidas con Hematoxilina-Eosina o alternativamente utilizadas para inmunohistoquímica. Brevemente, la actividad de la peroxidasa endógena fue inhibida usando 3 % H_2O_2 en metanol durante 15 min, los cortes fueron bloqueados con suero de conejo 10 %, 15 min a Ta, e incubados durante toda la noche con el anticuerpo específico a 4°C en cámara húmeda. Luego de la incubación con el anticuerpo primario se realizaron 3 lavados con PBS e incubaron los cortes con IgG puente (anti-IgG de rata, Sigma) diluida 1 / 100 por 30 min a Ta y se repitieron los lavados. Posteriormente los cortes fueron incubados con una dilución 1 / 300 del complejo PAP (peroxidasa-IgG de rata anti- peroxidasa, Accurate Chemicals) durante 1 ½ hs a Ta, se lavaron nuevamente con PBS y la reacción fue revelada utilizando como sustrato enzimático DAB 10 mg / 15 ml PBS / 12 μl H_2O_2 30 volúmenes. Los preparados fueron teñidos con Hematoxilina como colorante de contraste, deshidratados y montados con Bálsamo de Canadá.

14 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico fue utilizado el Test de Student. La sobrevida libre de tumor de los animales fue graficada según Kaplan-Meier y los datos fueron analizados con el Wilcoxon rank test. En todos los casos las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

Capítulo I

CAPITULO I

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MURINAS.

Las células dendríticas (CD) comprenden una familia de células presentadoras de Ag (APC) que actúan como centinelas del sistema inmune, patrullando a través de la sangre, tejidos periféricos, linfa y órganos linfoides secundarios (122). En la periferia las CD capturan Ag mediante distintos mecanismos, entre ellos la macropinocitosis, la fagocitosis y la endocitosis (49, 57) y los procesan en péptidos proteolíticos que son luego ensamblados con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) tanto de clase I como de clase II. El encuentro con una señal de peligro (productos bacterianos, virales, inflamación, trauma, etc) induce la maduración de las CD (66, 80).

Durante la maduración las CDs sufren una serie de cambios que involucran un aumento en la expresión de moléculas MHC I y II, coestimuladoras, receptores involucrados en la captación antigénica, receptores de quimioquinas, etc. Al mismo tiempo, las CDs comienzan a migrar a los órganos linfoides secundarios para activar a los linfocitos T, siendo las únicas APC capaces de iniciar la respuesta inmune adaptativa primaria (11, 12, 123). Distintos estadios de maduración son responsables de las distintas funciones de las CDs: mientras las inmaduras son altamente eficientes captadoras de Ag, las maduras son potentes estimuladoras de linfocitos T.

Las CD se encuentran distribuidas en todo el organismo y es por ello que pueden ser aisladas a partir de distintos tejidos aunque el rendimiento obtenido es en general bajo. Por ejemplo, en el ratón solamente pueden ser aisladas alrededor de 6×10^4 células de Langerhans a partir de la epidermis de una oreja (124), entre $1 - 10 \times 10^5$ CD a partir del bazo (125, 126) y aproximadamente 1×10^6 CD pueden ser generadas a partir de precursores en sangre periférica (127). Según el método descrito por Inaba y col (128) $5 - 10 \times 10^6$ CD pueden ser obtenidas a partir de precursores de médula ósea luego de 6 – 8 días de cultivo. Sin embargo, con las modificaciones introducidas por Lutz y col (118) el número de CD obtenidas a partir de precursores de médula ósea puede ser extendido hasta 1×10^8 células.

La proliferación y diferenciación de células de origen hematopoyético está influenciada por un grupo de glicoproteínas reguladoras conocidas como factores estimuladores de

colonias (CSF) (129). El factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) es un requisito fundamental para la diferenciación de CD mieloides a partir de los precursores presentes en la médula ósea(128).

En base a lo expuesto los objetivos en esta primera parte del trabajo fueron:

- 1) Obtener una línea celular productora de GM-CSF murino.
- 2) Aislar CD murinas a partir de precursores de médula ósea y caracterizarlas
 - a) fenotípicamente
 - b) funcionalmente

1.1 Obtención de células productoras de GM-CSF

Con el fin de obtener una línea celular productora de GM-CSF murino (mGM-CSF), células CHO fueron transfectadas en forma estable con el cDNA correspondiente a la región codificante del mGM-CSF clonado en el vector de expresión en eucariotas pcDNA3 (pcDNA3-mGM-CSF). Para obtener cantidad suficiente de ADN plasmídico para realizar la transfección, el mismo fue amplificado transformando bacterias *Escherichia coli* y purificado a partir de los cultivos bacterianos. Una vez obtenido suficiente ADN plasmídico las células CHO fueron transfectadas por el método de fosfato cálcico y cultivadas en medio selectivo. Luego de 21 días se seleccionaron 48 clones de células CHO en los cuales se evaluó la presencia del ARNm del mGM-CSF por Dot blot. De los 48 clones seleccionados inicialmente se eligieron los clones 14, 31, 36, 41 y 48 por su mayor expresión de ARNm (**Figura 1 A**). Cuando la expresión del mGM-CSF en el sobrenadante de cultivo de 1×10^6 células / 24 hs fue evaluada en forma cualitativa por ELISA no se observaron diferencias significativas entre los 5 clones elegidos (**Figura 1 B**). Teniendo en cuenta que en el clon 48 se observó una mayor expresión de mGM-CSF tanto por Dot blot como por ELISA, el mismo fue elegido como fuente de mGM-CSF para el cultivo de CD a lo largo de todo el presente trabajo.

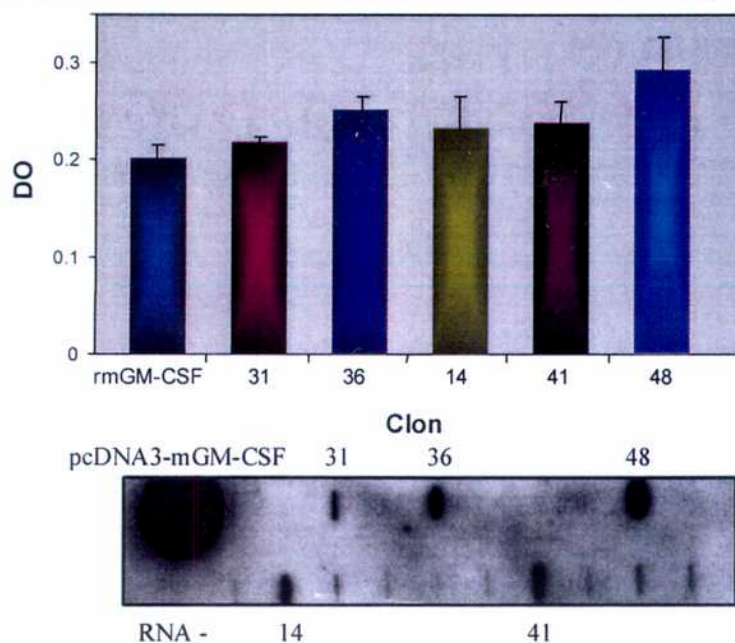
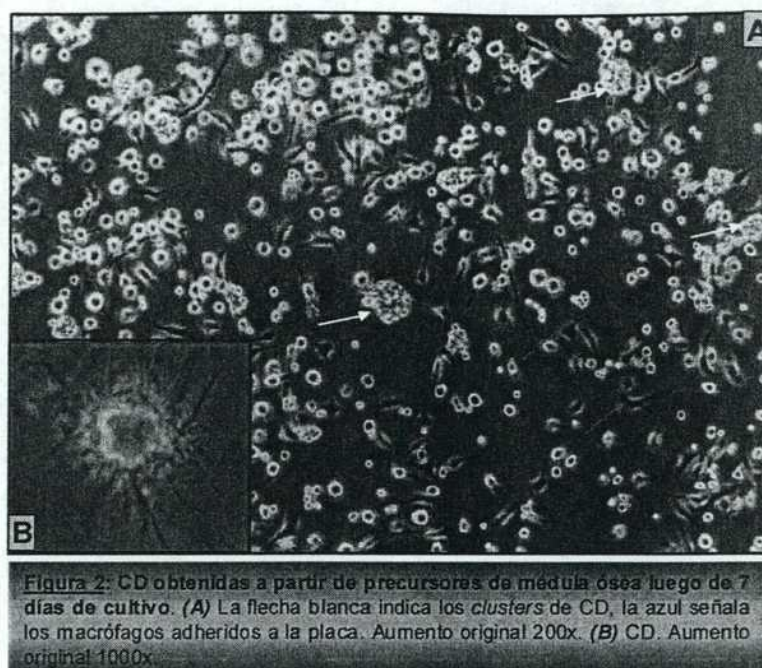


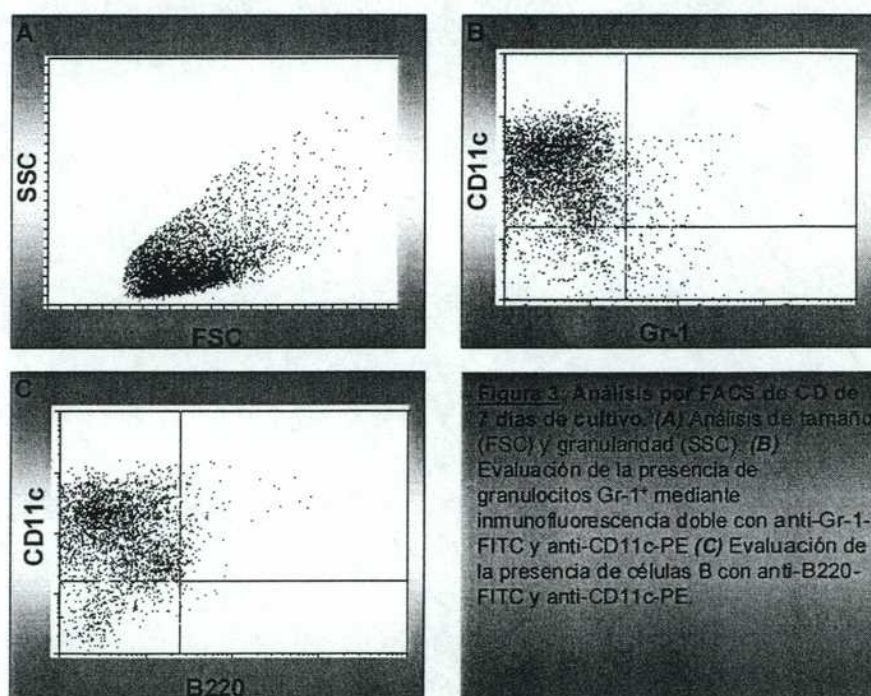
Figura 1: Expresión de GM-CSF en las células CHO transfectadas. (A) La expresión de GM-CSF fue analizada por Dot-blot. En una membrana de nylon se sembraron 5 μ g de RNA obtenido a partir de un pellet de 2×10^6 células y la hibridación se realizó utilizando una sonda correspondiente al mGM-CSF marcada con 32 P. El plásmido pcDNA3-GM-CSF se utilizó como positivo. (B) La presencia de GM-CSF fue evaluada por ELISA en el sobrenadante de cultivo de 24 hs de 1×10^6 células. Como control positivo se sembraron 20 ng de rmGM-CSF purificado (Sigma).

1.2 Aislamiento de CD murinas a partir de precursores de médula ósea

Considerando el alto rendimiento obtenido, hemos basado nuestro método de aislamiento de CD en el descrito por Lutz y col. (118). A partir de la médula ósea extraída de los fémures y tibias de un ratón se obtuvieron $4 - 5 \times 10^7$ leucocitos y se sembraron $2 - 4 \times 10^6$ leucocitos / placa de 100 mm de diámetro en presencia de mGM-CSF. Durante los primeros 3 días de cultivo se observó que los eritrocitos fueron desapareciendo en forma espontánea, fue aumentando el número de macrófagos adheridos a la placa y comenzaron a aparecer pequeños *clusters* o agregados celulares característicos del cultivo de CD. A partir del día 4 y hasta el día 7, se observó una importante proliferación celular con un aumento en el número de clusters de CD constituidos por células de distintos tamaños así como de CD que fueron liberadas de los clusters y que presentaban las vellosidades o dendritas que dan nombre a las mismas (**Figura 2 A-B**), obteniéndose un rendimiento de $8 - 10 \times 10^6$ células por placa.



Cuando se realizó el análisis por citometría de flujo (FACS), se observó que las células obtenidas presentaban similar contenido granuloso, diferencias en el tamaño como se había observado en los cultivos (**Figura 3 A**) y eran en su mayoría $CD11c^+$ (**Figura 3 B-C**). Asimismo, se comprobó que la presencia de granulocitos ($Gr-1^+$) en el cultivo no superó el 10 % (**Figura 3 B**) y la de células $B220^+$ fue $< 2\%$ (**Figura 3 C**), por lo tanto la pureza de los cultivos fue $> 85 \%$.



1.3 Expresión de marcadores de superficie

Como se explicó previamente, durante la maduración las CD experimentan una serie de cambios incluyendo el aumento de la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras tales como CD80, CD86 y CD40, de moléculas MHC clase I y MHC clase II, mientras que otras como la integrina CD11c permanecen constantes. Por lo tanto, dichas moléculas pueden ser utilizadas como marcadores de CD inmaduras o maduras. La expresión de las mismas fue analizada por FACS tanto en CD de 5 días de cultivo como en CD de 7 días de cultivo maduras en presencia de LPS ($0,1 \mu\text{g} / \text{ml}$) durante las últimas 24 hs. En la **Figura 4** se puede observar que las CD de 5 días de cultivo presentaban un fenotipo mayoritariamente inmaduro, con baja expresión de DEC-205, MHC I, CD80, CD40 y CD86 y una expresión heterogénea de MHC II que se puede dividir como células MHC II^{high} y MHC II^{low} siendo en su mayoría MHC II^{low}. La expresión de CD11c permaneció constante tanto en CD inmaduras como maduras, sin embargo se observó un marcado aumento en la expresión de CD80, CD86, CD40, DEC-205, MHC I y MHC II siendo ahora en su mayoría MHC II^{high}.

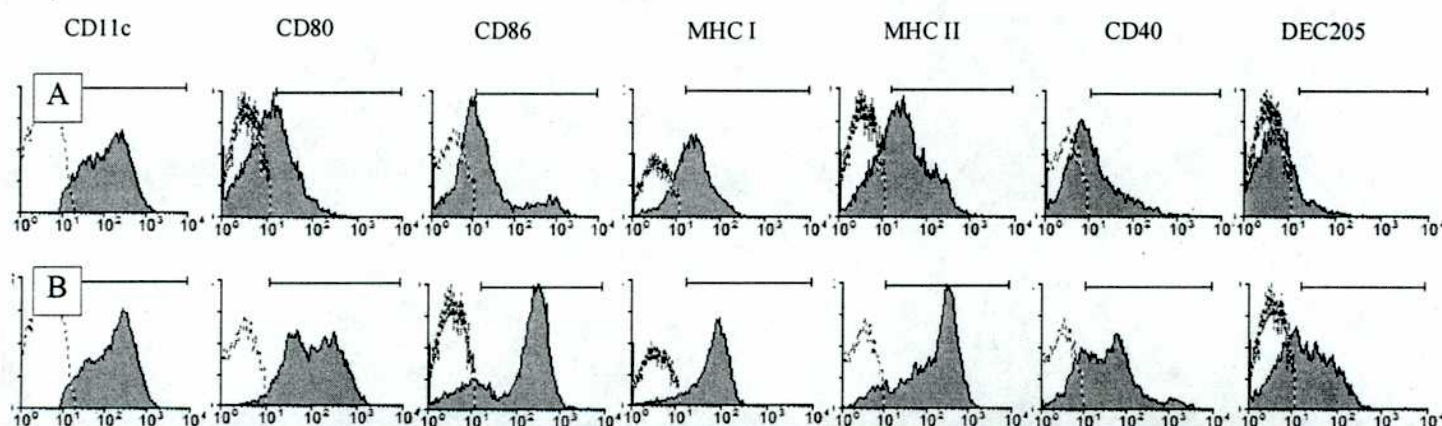


Figura 4: Análisis del fenotipo de las CD. La expresión en superficie de CD11c, CD80, CD86, MHC I, MHC II, CD40 y DEC-205 en (A) CD inmaduras de 5 días de cultivo y (B) CD de 7 días de cultivo maduras con LPS ($0,1 \mu\text{g} / \text{ml} / 24 \text{hs}$) fue analizada por FACS. Las líneas punteadas representan los respectivos controles de isotipo.

1.4 Evaluación de la captación antigénica de las CD

1.4.i Capacidad fagocítica

La eficiente capacidad de internalización de Ags es un atributo específico de las CD inmaduras que se pierde durante el proceso de maduración. En primera instancia se analizó la capacidad de las CD inmaduras de fagocitar *Saccharomyces cerevisiae*. Para ello CD de 5 días de cultivo fueron incubadas en presencia de *S. cerevisiae* en relación CD : levadura 1:10.

Luego de 2 hs de cultivo a 37°C se observaron 80 % de células con capacidad fagocítica, de las cuales 22 % había fagocitado entre 1 – 5 levaduras por célula, 27 % entre 6 –10 y 31 % había fagocitado más de 10 levaduras por célula (**Figura 5 A-B**). Como se ilustra en la **Figura 5 C**, aún después de 12 hs adicionales de cultivo se pudo observar en el citoplasma de las CD vacuolas fagocíticas conteniendo las levaduras internalizadas. Cuando se evaluó la capacidad fagocítica de CD que habían sido previamente maduras en presencia de LPS se observó una marcada disminución tanto en el porcentaje total de células con actividad fagocítica como en el número de levaduras por célula, con sólo 25 % de células que habían fagocitado no más de 5 levaduras por célula(**Figura 5 A**).

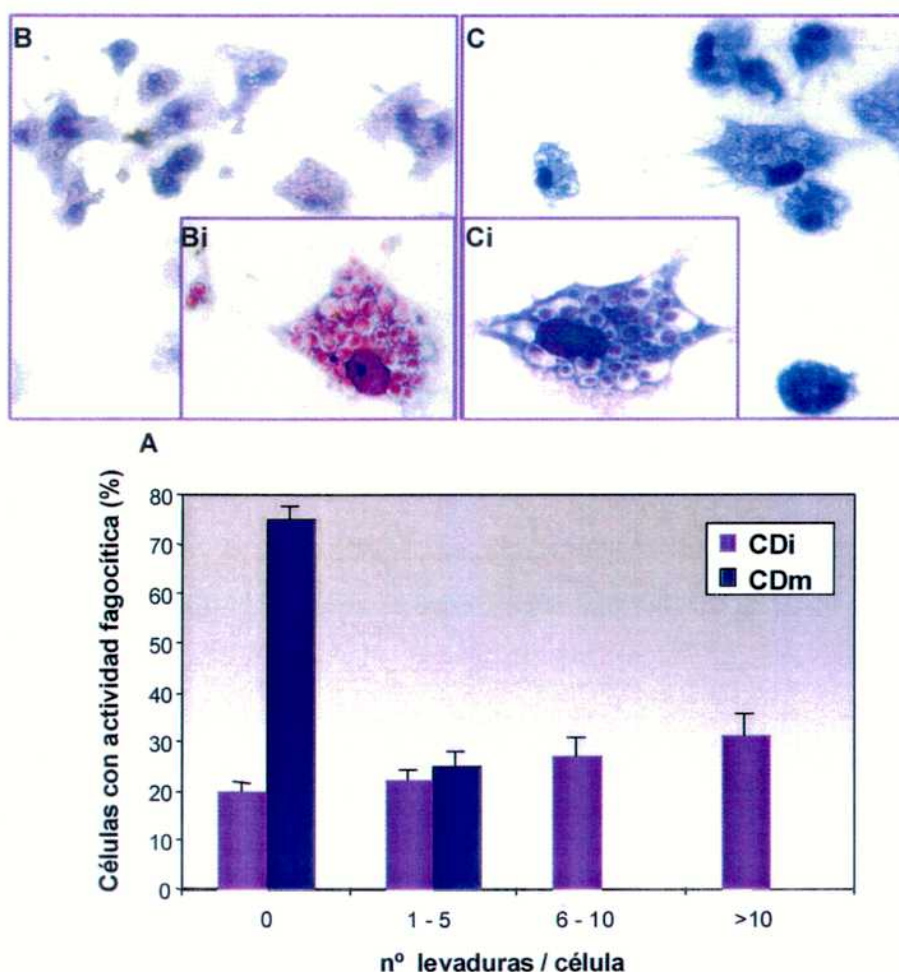
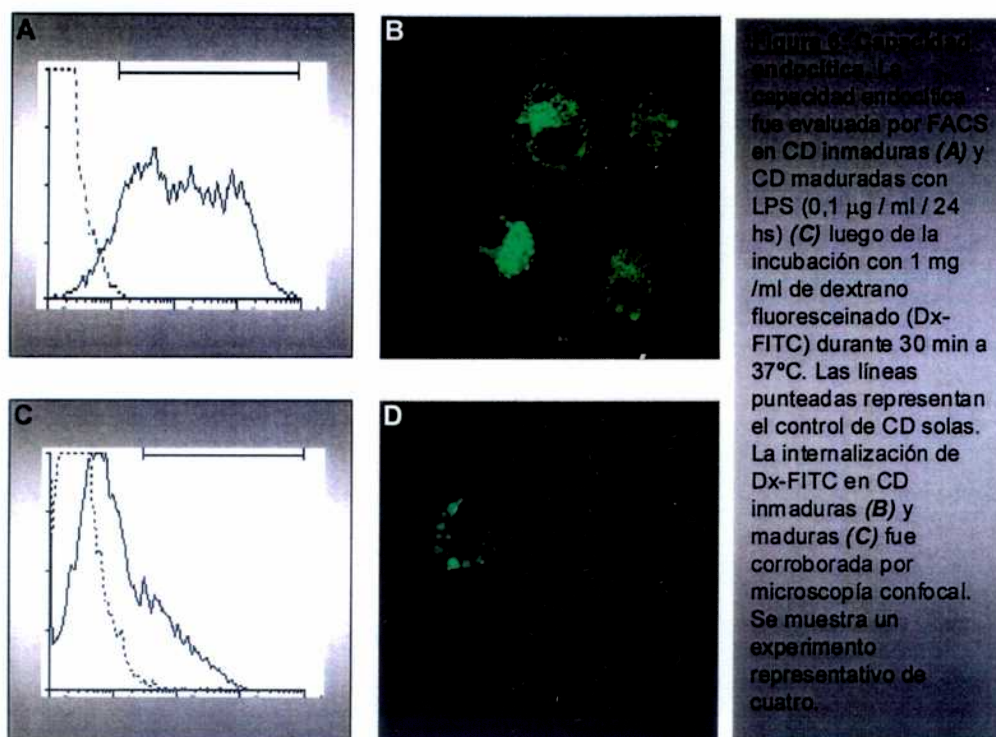


Figura 5: Evaluación de la capacidad fagocítica. (A) CD inmaduras (CDi) o maduras con LPS (0,1 µg / ml/ 24 hs) (CDm) fueron incubadas con *S. cerevisiae* en relación CD : levadura 1 : 10 durante 2 hs a 37°C. Los cultivos se lavaron y colorearon con May Grunwald-Giemsa y se cuantificaron las levaduras por célula. El resultado está expresado como el porcentaje de células que incorporaron 1 – 5, 6 – 10 y >10 levaduras / célula contadas en un total de 100 campos con un aumento 200x. (B) CD inmaduras incubadas con levaduras durante 2 hs (C) CD inmaduras incubadas con levaduras durante 12 hs. Aumento original: (B) y (C) 200x (Bi) y (Ci) 400x. Se muestra un experimento representativo de tres.

1.4.ii Capacidad endocítica

La capacidad de las CD de internalizar Ags mediante el proceso de endocitosis fue evaluada por FACS utilizando dextrano fluoresceinado (Dx-FITC) como sustrato. Luego de ser incubadas en presencia de Dx-FITC (1 mg / ml) durante 30 min a 37°C, el 90 % de las CD inmaduras había incorporado Dx-FITC (**Figura 6 A**) mientras que cuando se trató de CD maduras con LPS, solamente 30 % de las eran células capaces de internalizar el dextrano (**Figura 6 C**). Cabe destacar que, al igual que lo ocurrido en el caso de la fagocitosis de levaduras, se pudo observar en la población de CD inmaduras distintos niveles de endocitosis de Dx-FITC según se evidenció por la presencia de células con distinta intensidad de fluorescencia (**Figura 6 A**). Asimismo, la diferencia observada entre las CD maduras y las CD inmaduras se manifiesta no sólo como un menor porcentaje total de células positivas para Dx-FITC para las primeras, sino también como una menor cantidad de Dx-FITC incorporado por célula reflejado por la baja intensidad de fluorescencia (**Figura 6 C**). Para corroborar que la fluorescencia detectada por FACS no se trataba de una unión inespecífica del Dx-FITC sobre la superficie de las células, las mismas fueron observadas por microscopía confocal. En la **Figura 6 B** se puede observar la alta incorporación de Dx-FITC en el citoplasma de las CD inmaduras, mientras que en la **Figura 6 D** se observa la débil capacidad endocítica de las CD maduras.

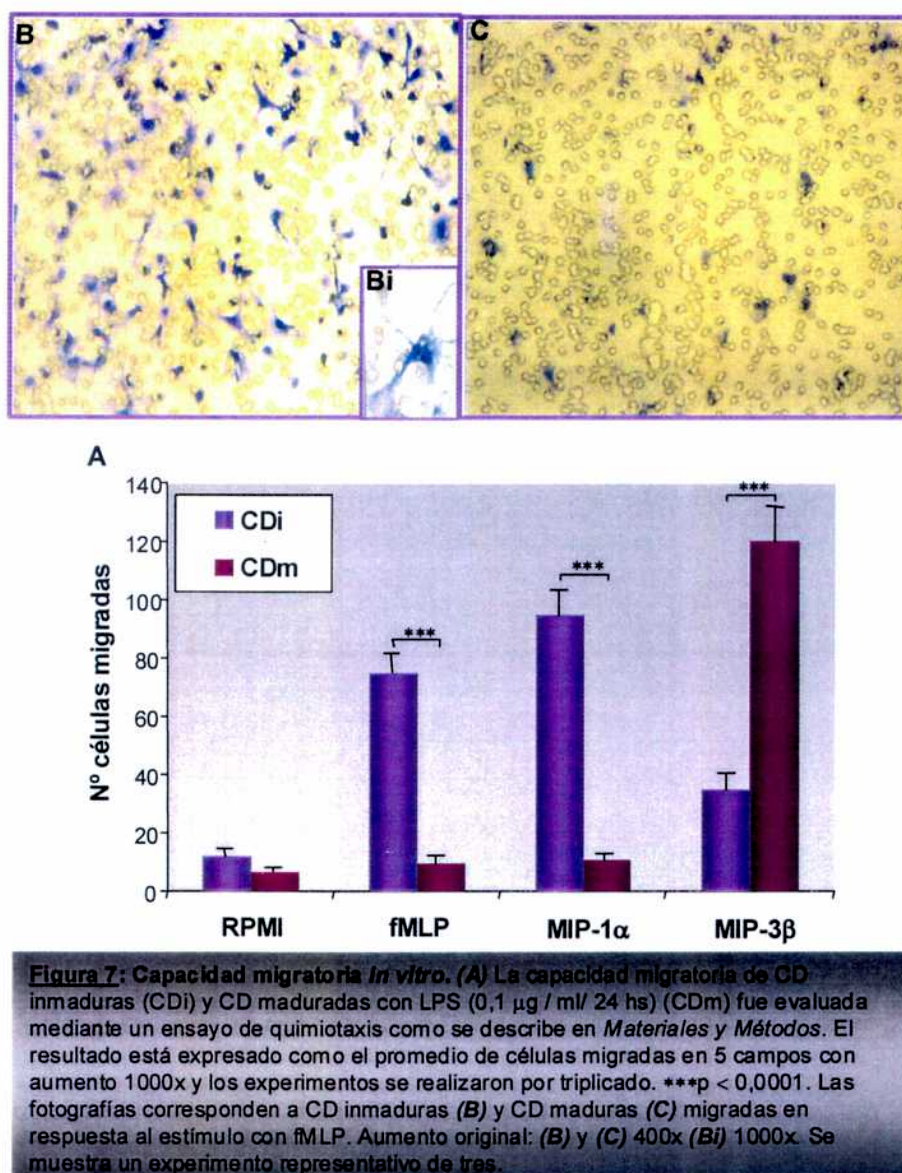


1.5 Evaluación de la capacidad migratoria de las CD

1.5.i Ensayos *in vitro*

Concomitantemente con los cambios en su habilidad para internalizar Ags y el aumento de la expresión de moléculas MHC clase I y II y coestimuladoras, la maduración induce también la migración de las CD desde los tejidos periféricos hacia los órganos linfoides secundarios. Este proceso migratorio desde la periferia se debe en parte a la disminución de la expresión de receptores para quimioquinas inflamatorias (CCR1, CCR5, etc.) y al aumento en la expresión de receptores para quimioquinas secretadas constitutivamente en los órganos linfoides secundarios (CCR7) que ocurre durante la maduración (79, 81-83). El tripéptido formilado fMLP (10^{-8} M), factor quimiotáctico prototípico de origen bacteriano, y las quimioquinas CCL3 / MIP-1 α y CCL19 / MIP-3 β (100 ng / ml) fueron utilizados como quimioattractantes para evaluar la capacidad migratoria de las CD *in vitro* mediante la utilización de una cámara de quimiotaxis según se detalla en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **Figura 7 A**, al cabo de 90 min de incubación las CD inmaduras migraron eficientemente hacia los estímulos con fMLP y MIP-1 α y en menor medida hacia MIP-3 β . Luego de inducir la maduración con LPS se observó una inhibición > 85 % de la respuesta a

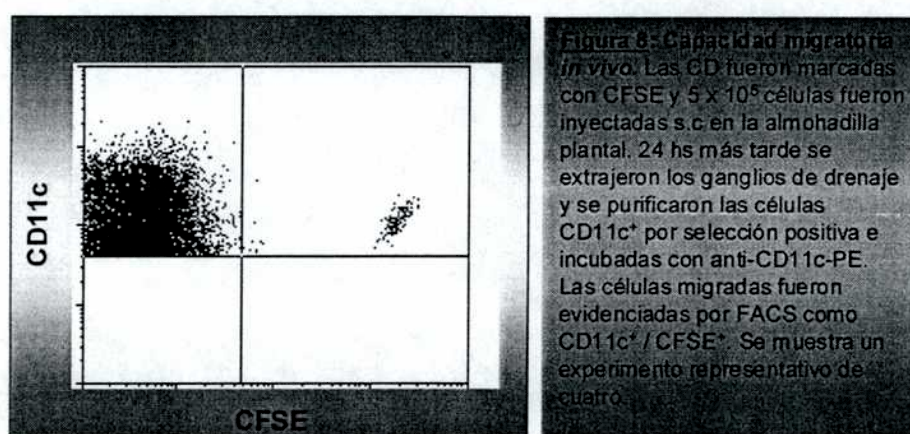
estímulos como fMLP y MIP 1 α . Sin embargo, las CD maduras mostraron un aumento de la potencia migratoria (número total de células migradas) hacia MIP 3 β de $3,5 \pm 0,5$ veces. En la **Figura 7 B-C** se ilustra, a modo de ejemplo, las CD inmaduras migradas en respuesta a fMLP y la ausencia de respuesta hacia el mismo estímulo de las CD maduras.



1.5.ii Ensayos *in vivo*

Para inducir una respuesta inmune primaria las CD deben llegar a los ganglios linfáticos donde se encontrarán con los linfocitos naïve a los que deben instruir. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con los ensayos de migración *in vitro*, el paso siguiente fue evaluar si las CD migraban hacia los órganos linfoides secundarios luego de ser inyectadas en forma s.c.,

modalidad que sería utilizada para la inmunización de los animales. Las CD obtenidas a partir de precursores de médula ósea fueron marcadas con CFSE como se describe en Materiales y Métodos e inyectadas en la almohadilla plantal de ratones C57BL/6. Veinticuatro horas después se extrajeron los ganglios linfáticos y se purificaron las células CD11c⁺ por selección positiva. Las CD que habían sido inyectadas migraron a los ganglios y fueron evidenciadas como células CFSE⁺ / CD11c⁺ presentes en la población celular purificada (**Figura 8**). El porcentaje de CD migradas presentes en los ganglios no superó el 2,5 % del total de células CD11c⁺, coincidente con datos encontrados en la literatura (130).



1.6 Evaluación de la capacidad estimulatoria

Al madurar, las CD pierden su eficiencia para capturar Ag. Sin embargo, con el aumento en la expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC I y II se convierten en potentes estimuladoras de linfocitos T. Este atributo de las CD fue evaluado mediante un cultivo mixto alogeneico. CD inmaduras o maduras con LPS fueron incubadas en distintas relaciones estimulador : respondedor (E : R) con 1×10^5 esplenocitos alogeneicos. Para evitar la proliferación de las células estimuladoras, las CD fueron previamente tratadas con Mitomicina C. Luego de 3 días de cultivo se añadió [³H]timidina al medio por 16 hs adicionales. Finalmente los cultivos fueron cosechados y la proliferación de los esplenocitos fue evaluada por la incorporación de [³H]timidina en un contador de centelleo. La presencia de 1 CD madura cada 100 esplenocitos fue suficiente para inducir la proliferación de los mismos, siendo máxima la capacidad estimulatoria con la relación E : R 1 : 10 (**Figura 9**). Por su parte, las CD inmaduras mostraron menor capacidad de presentación antigénica que las CD

maduradas con LPS, induciendo niveles significativamente menores de proliferación de los esplenocitos alogeneicos ($p < 0,0001$).

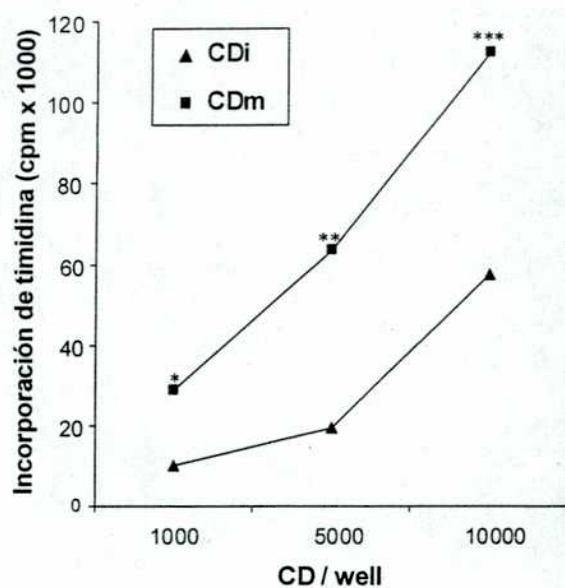


Figura 9: Capacidad estimuladora. La capacidad estimuladora de CD inmaduras (CDi) y maduras con LPS ($0,1 \mu\text{g} / \text{ml} / 24 \text{hs}$) (CDm) fue evaluada mediante un cultivo mixto alogeneico. 1×10^5 linfocitos fueron incubados con 1000, 5000 o 10000 CD previamente tratadas con Mitomicina C. Luego de 3 días se agregó al cultivo [^3H] timidina por 16 hs antes de ser cosechado. El desvío estándar de los triplicados fue menor a 15 %. * $p = 0,001$ ** $p = 0,0003$ *** $p < 0,0001$

Discusión

Las CD se encuentran como residentes de la mayoría de los tejidos periféricos estratégicamente ubicadas en la interfase con los sitios de potencial entrada de patógenos (ej. piel, mucosas). Por su habilidad incomparable de captación y procesamiento antigénico, estimulación de células T, así como su capacidad única de inducción de la respuesta inmune primaria, las CD se han convertido en adyuvantes de elección para inmunoterapia (131) (11, 132).

Con el propósito de llevar a cabo el objetivo principal del presente trabajo de Tesis, la utilización de CD como vectores para inmunoterapia del cáncer, en esta primera etapa se planteó como objetivo el aislamiento de CD y la caracterización de las mismas tanto fenotípica como funcionalmente.

La presencia de GM-CSF en el cultivo es imprescindible para la diferenciación de las CD a partir de sus precursores presentes en la médula ósea. Teniendo en cuenta la gran cantidad de dicha proteína necesaria para obtener suficientes CD para llevar a cabo los estudios *in vitro* e *in vivo*, en primera instancia nos propusimos establecer una línea celular productora de GM-CSF murino. De los 48 clones obtenidos se seleccionó el clon 48 por ser el de mayor expresión de mGM-CSF (**Figura 1**). La actividad biológica del mGM-CSF presente en el sobrenadante de cultivo del clon seleccionado fue evaluada en forma exitosa mediante su utilización en el cultivo de CD a partir de precursores de médula ósea. El sobrenadante fue utilizado en una concentración final 10 – 15 % y el rendimiento de CD obtenidas fue similar al obtenido con 200 – 500 U /ml de GM-CSF recombinante de origen comercial.

Cabe mencionar que si bien no se ha profundizado en la caracterización de los numerosos clones obtenidos, según lo observado en la **Figura 1 se dispone de una línea celular productora de mGM-CSF** que podría ser utilizada para el estudio de las distintas propiedades de dicha citoquina, ej. quimioattractante de células fagocíticas (133), activación de granulocitos (134), proliferación de ciertas células tumorales (135), acción neuromoduladora (136).

Considerando el importante número de CD que serían necesarias para llevar a cabo los protocolos de inmunización de animales hemos basado nuestro método de obtención de CD

en el descripto por Lutz y col. (118) y el rendimiento obtenido, por ratón, osciló entre 8×10^7 y 10^8 células con las características morfológicas típicas de las CD (Figuras 2-3). La expresión de CD40, CD80, CD86, MHC I y MHC II fue baja en CD inmaduras observándose un marcado aumento luego de la incubación de las CD con LPS (Figura 4). Este resultado indica que las CD obtenidas respondieron al estímulo de maduración inducido por LPS, ya que el alto nivel de expresión de moléculas coestimuladoras y de MHC es una característica de las CD maduras.

Luego se evaluó la capacidad de las CD de capturar Ag mediante distintos mecanismos: fagocitosis y endocitosis. Cuando se evaluó la capacidad fagocítica se observó en las CD inmaduras un alto índice de fagocitosis evidenciado por el porcentaje total de células que habían fagocitado *Saccharomyces cerevisiae* (80 %), así como el número de levaduras por célula que alcanzó a > 10 lev. / cél. Por el contrario, el porcentaje de CD maduras capaces de fagocitar levaduras no superó el 25 % y no se observaron células con más de 5 levaduras (Figura 5). Resultados similares fueron obtenidos cuando se evaluó la capacidad de las CD de endocitar Dx-FITC, observándose un 90 % de CD inmaduras capaces de internalizar Dx-FITC contra un 30 % de CD maduras. Además, también se pudo observar poblaciones de células inmaduras con mayor intensidad de fluorescencia, indicativo de mayor incorporación Dx-FITC (Figura 6).

La respuesta migratoria a MIP-1 α y MIP-3 β *in vitro* permitió evaluar en forma indirecta el cambio en la expresión de receptores para quimioquinas que se produce durante la maduración, y que permite a las CD abandonar los tejidos periféricos para migrar hacia los órganos linfoides secundarios (81). Las CD inmaduras mostraron alta potencia migratoria (total de células migradas) en respuesta al estímulo con MIP-1 α , que fue inhibida al inducir la maduración con LPS. Esto podría interpretarse como una disminución en la expresión del receptor CCR1, uno de los principales receptores expresados en CD inmaduras (137). La migración de las CD inmaduras en respuesta a MIP-3 β observada no fue sorprendente debido a que existe una migración espontánea de CD inmaduras hacia los ganglios linfáticos que podría estar involucrada en la inducción de tolerancia a Ag propios; sin embargo se observó un importante incremento en la potencia migratoria en respuesta a dicho estímulo en las CD maduras (Figura 7) indicativo del aumento en la expresión de CCR7. MIP-3 β es secretada en las regiones ricas en células T de los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo)

(138) donde las CD deben dirigirse para activar a los linfocitos T naïve, es por ello que el aumento en la expresión de CCR7 es biológicamente relevante.

Las CD son 10 – 100 veces más potentes que otras APC (linfocitos B, monocitos) para inducir la proliferación de linfocitos alogeneicos (139), por lo tanto la técnica del cultivo mixto linfocitario (CML) es ampliamente utilizada para evaluar la capacidad presentadora de las CD. Las CD obtenidas mostraron ser potentes estimuladoras del CML (**Figura 9**). Sin embargo el CML no permite evaluar el procesamiento antigénico y la eficiencia en la inducción de la respuesta Ag-específica, aspectos que serán discutidos en los siguientes capítulos.

En esta primera parte del trabajo hemos comprobado que las **CD obtenidas** utilizando el sobrenadante de cultivo de la línea celular productora de mGM-CSF establecida, además de ser *eficientes captadoras de Ag y potentes estimuladoras de linfocitos*, luego de ser inyectadas s.c. migran hacia los ganglios linfáticos preparando de esta forma el escenario para iniciar la respuesta inmune primaria. Por lo tanto, su utilización como herramienta para el diseño de una vacuna anti-melanoma resultó de gran interés.

Capítulo II

CAPITULO II

DESARROLLO DE UNA VACUNA ANTI-MELANOMA UTILIZANDO CD CARGADAS CON CÉLULAS TUMORALES APOPTÓTICAS.

La incidencia del melanoma aumenta a mayor velocidad que la de otros cánceres (140), y la sobrevida de pacientes con metástasis distantes es generalmente < 1 año. Entre los mecanismos que los tumores han desarrollado para evadir al sistema inmune se han descrito la secreción de factores inmunosupresores, la baja expresión de moléculas de MHC y la falta de señales coestimuladoras (141-144).

Con el avance en la comprensión de los requerimientos para inducir inmunidad y sobrepasar los mecanismos arriba mencionados, las CD se han convertido en atractivos vectores para la inmunoterapia del cáncer (11, 132, 145-150). Las CD están demostrando ser efectivas en la iniciación y expansión de la respuesta inmune en humanos (151, 152), proveyendo una justificación para su uso como adyuvantes en la inmunización activa contra el melanoma (108-110, 153, 154). Se han desarrollado diferentes estrategias para cargar a CD con Ag tumorales, incluyendo la utilización de péptidos sintéticos derivados de Ag para moléculas de MHC definidas (108-110, 153-155), ARN tumoral (156, 157), lisados de células tumorales (158) o exosomas derivados de tumor (159). Se ha demostrado también que las CD son capaces de fagocitar células apoptóticas y activar la respuesta inmune en el contexto de MHC I (61), por lo tanto también han sido utilizadas como fuente de Ag (62, 64, 160-162). Todas estas estrategias han sido ensayadas en modelos preclínicos y, en algunos casos, en ensayos clínicos. Las células tumorales enteras son una interesante fuente de Ag, ya que las CD tendrían el potencial de presentar Ag asociados al tumor tanto en el contexto de MHC clase I como de clase II sin la necesidad de identificar los péptidos antigénicos, e independientemente del haplotipo del paciente (61, 163-165). Otra posible ventaja es que, al mantenerse la integridad celular, se conserva el repertorio total de Ag asociados al tumor incluyendo epitopes crípticos que podrían ser presentados por las CD luego del procesamiento de las células tumorales.

Existen algunos ejemplos en los cuales utilizando CD cargadas con Ag tumorales definidos o células tumorales modificadas genéticamente para secretar GM-CSF, se ha adquirido resistencia contra melanoma en animales (166-168); sin embargo no existe

precedente respecto a la inducción de inmunidad que combine la respuesta restringida a MHC de clase I y II *in vivo* utilizando CD cargadas con células tumorales. Dentro de este contexto, nos propusimos utilizar el modelo del melanoma murino B16 (113) de origen espontáneo, débilmente inmunogénico y letal inclusive con cantidades inoculadas tan bajas como 10^4 células (169), con el objetivo de *estudiar si CD cargadas ex vivo con células tumorales apoptóticas pueden inducir inmunidad anti-tumoral a largo plazo dependiente de la acción combinada de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺*.

2.1 Inducción y detección de apoptosis de células B16

La muerte celular programada es un proceso fisiológico utilizado por organismos multicelulares para el desarrollo y la homeostasis tisular, así como para eliminar células infectadas, mutadas o dañadas. En 1972 Kerr y col. (170) adoptaron el término *apoptosis* para describir la morfología del proceso en el cual la célula participa activamente en su propia destrucción. Las células apoptóticas presentan características morfológicas distintivas que difieren de las que se manifiestan en la muerte celular producida por injuria (necrosis). Entre dichas características se incluyen la redistribución de los fosfolípidos de la membrana plasmática como la fosfatidilserina que pasa de la cara interna a la cara externa de la membrana, condensación del citoplasma, condensación de la cromatina hasta una o más esferas. Se produce el clivaje internucleosomal del DNA por activación de endonucleasas que degradan la cromatina en fragmentos de 300 kb y subsecuentemente en fragmentos pequeños de 50 kb dando un patrón característico. Durante todo este proceso se mantiene la integridad de la membrana plasmática; por lo tanto no hay liberación del contenido citoplasmático y no se produce inflamación como ocurre durante la muerte celular por necrosis. Finalmente la célula puede fragmentarse y se liberan cuerpos apoptóticos rodeados de membrana.

La apoptosis puede ser inducida *in vitro* por infección viral (influenza, vaccinia, EBV, HIV1), radiación (rayos X, γ , UV), privación de suero, vía Fas-L, tratamiento con distintas drogas, etc. En el presente trabajo la apoptosis de las células B16 fue inducida por radiación γ y evidenciada utilizando Anexina V-FITC que se une con gran afinidad a la fosfatidilserina como se detalla en Materiales y Métodos. En las células que permanecieron sin irradiar se observó un nivel basal de células en apoptosis temprana del 10 – 12 % caracterizadas por la

tinción Anexina V⁺ / IP⁻ (**Figura 10 A**). De las diferentes condiciones ensayadas, la irradiación con 70 Gy y posterior cultivo durante 48 hs resultó ser la óptima obteniéndose un 70 – 80 % de células en apoptosis temprana (**Figura 10 B**). Doce a 20 % de las células mostraron tinción Anexina V⁺ / IP⁺, indicativo de necrosis secundaria, tanto en los cultivos de células sin irradiar como en las irradiadas (**Figura 10 A-B**). En la **Figura 10 C** se muestra a modo de ejemplo el análisis por microscopía confocal de las células irradiadas teñidas con Anexina V-FITC / IP donde se puede observar también la condensación de la cromatina en este caso formando dos esferas. La **Tabla I** resume los resultados obtenidos con las diferentes dosis de radiación y los distintos tiempos de cultivo post – irradiación ensayados. Es importante destacar que las células que permanecieron Anexina V⁻ / IP⁻ aún luego de 72 hs post - irradiación no proliferaron *in vitro* ni fueron capaces de inducir el desarrollo tumoral en animales cuando se inyectaron 1×10^6 células.

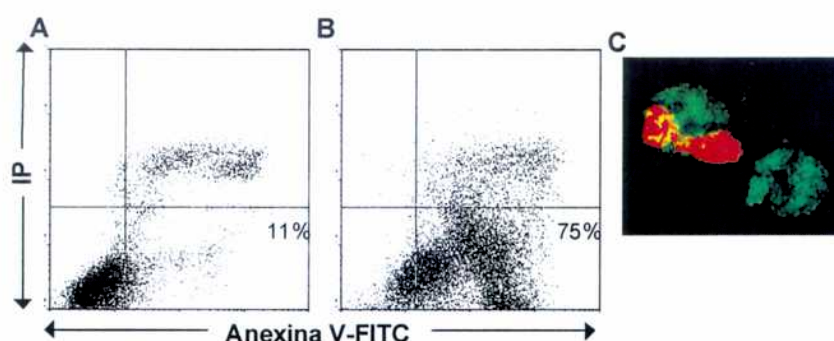


Figura 10: Detección de apoptosis de células B16. Células B16 (**A**) sin tratar o (**B**) irradiadas (70 Gy) fueron cultivadas durante 48 hs e incubadas con Anexina-V-FITC / IP. La apoptosis temprana fue caracterizada por la tinción Anexina-V⁺ / IP⁻ y la necrosis secundaria por la tinción doble positiva. (**C**) Microscopía confocal de las células B16 irradiadas. Aumento original 600x.

Tabla I: Inducción de apoptosis de células B16^a

Tpo	Dosis	50 Gy		70 Gy		100 Gy	
		Anex. V ⁺ / IP ⁻	Anex. V ⁺ / IP ⁺	Anex. V ⁺ / IP ⁻	Anex. V ⁺ / IP ⁺	Anex. V ⁺ / IP ⁻	Anex. V ⁺ / IP ⁺
0 h		≤ 10	10 – 12	≤ 10	10 – 12	≤ 10	80 – 90
24 hs		12 – 20	10 – 12	25 – 35	10 – 15	ND	ND
48 hs		18 – 32	10 – 18	70 – 80	12 – 20	ND	ND
72 hs		33 – 54	22 – 35	40 – 55	35 – 50	ND	ND

^a Las células B16 fueron irradiadas con distintas dosis de radiación y e incubadas durante distintos tiempos. La apoptosis fue evidenciada por tinción con Anexina V-FITC / IP donde la apoptosis temprana fue definida por la tinción Anexina V⁺ / IP⁻ y la necrosis por la tinción Anexina V⁺ / IP⁺. Los valores corresponden al porcentaje de células correspondientes a las diferentes tinciones.

2.2 Las CD inmaduras fagocitan eficientemente células B16 apoptóticas

Si bien en el Capítulo I se demostró que las CD inmaduras obtenidas poseían una alta actividad fagocítica (**Figura 6**), era importante comprobar que las mismas serían capaces de fagocitar eficientemente las células tumorales apoptóticas. Para ello CD de 5 días de cultivo fueron marcadas con el fluorocromo verde PKH-67 (**Figura 11 A**) y cocultivadas con igual número de células B16 apoptóticas que habían sido previamente marcadas con el fluorocromo rojo PKH-26 (**Figura 11 B**) y la fagocitosis fue documentada por FACS como el porcentaje de células con doble marca. El 27 % de las CD había fagocitado material apoptótico luego de 2 hs de cultivo a 37°C y el 35 % luego de 6 hs (**Figura 11 C-D**). Cuando las células fueron cocultivadas durante 24 hs el 53 % de las CD había incorporado material apoptótico (**Figura 11 E**). Para descartar la posibilidad de una unión inespecífica CD – célula tumoral, los cocultivos se realizaron a 4°C, obteniéndose un porcentaje de células doble positivas < 5 % independientemente del tiempo de cocultivo (**Figura 11 F**). La fagocitosis de

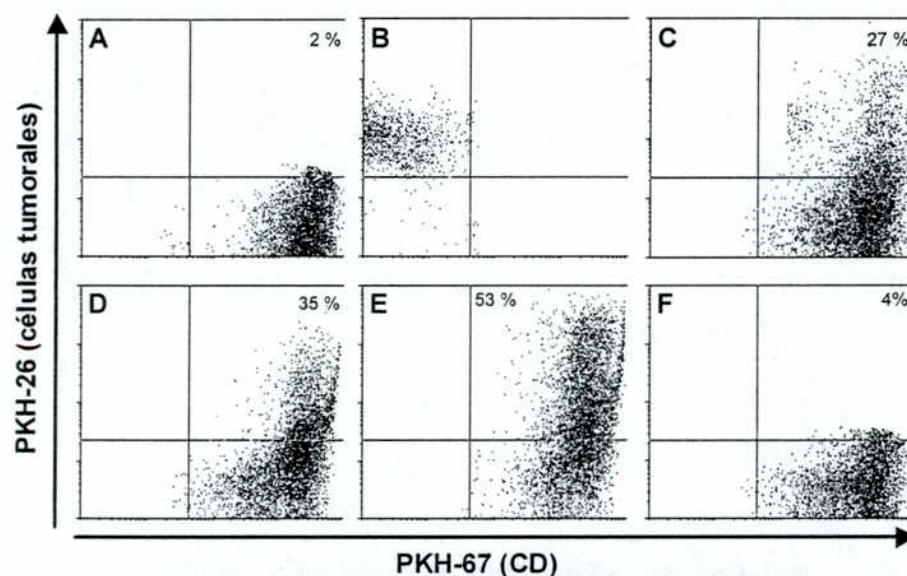


Figura 11: Fagocitosis de células B16 apoptóticas. Para demostrar la fagocitosis CD inmaduras marcadas con el fluorocromo verde PKH-67 (A) fueron cocultivadas con células B16 apoptóticas marcadas con el fluorocromo rojo PKH-26 (B) en relación 1 : 1 a 37°C durante 2 hs (C), 6 hs (D) o 24 hs (E). Alternativamente las células fueron coincubadas a 4°C (F). La fagocitosis fue definida por el porcentaje de células doble positivas. (C-F) Se seleccionó la región correspondiente a las células PKH-67⁺ (CD). Se muestra un experimento representativo de cuatro.

material apoptótico fue confirmada por microscopía confocal. En la **Figura 12 A** se observa claramente una célula tumoral apoptótica marcada con PKH-26 (rojo) que fue fagocitada por

una CD marcada con PKH-67 (verde); una situación similar es la que se observa en la **Figura 12 B**, donde el contenido citoplasmático y el núcleo de la CD se hallan desplazados por una célula tumoral.

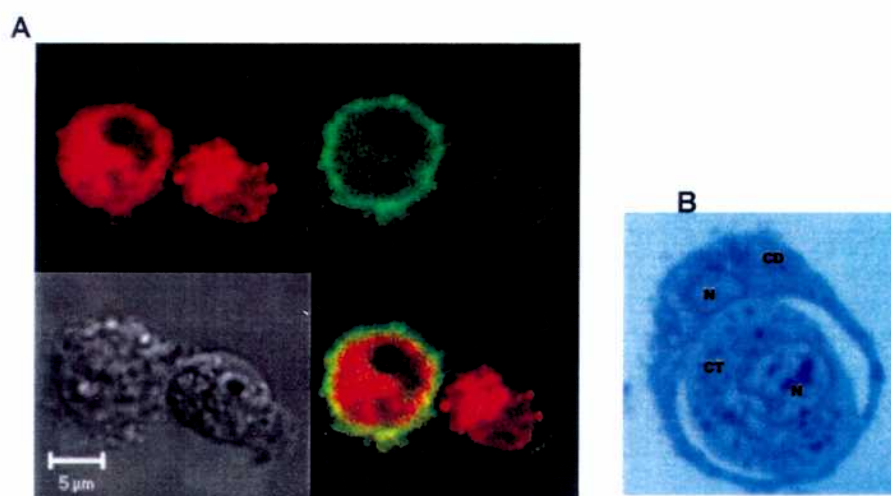


Figura 12: Fagocitosis de células B16 apoptóticas luego de 24 hs de cocultivo. (A) análisis por microscopía confocal del cocultivo de células B16 apoptóticas marcadas con PKH-26 (panel superior izquierdo) y CD marcadas con PKH-67 (panel superior derecho) donde se observa una célula apoptótica fagocitada por una CD (panel inferior derecho). (B) Cocultivos de CD y células tumorales apoptóticas fueron fijados con formol 4 % y coloreados con Hematoxilina-Eosina. En la fotografía se ilustra una célula tumoral entera dentro del citoplasma de una CD. Aumento original 600x. CT: célula tumoral, N: núcleo, CD: célula dendrítica.

Por otra parte, mediante el análisis por microscopía electrónica se pudo evidenciar que luego del cocultivo el núcleo irregular que ocupaba gran parte del citoplasma fue desplazado hacia la periferia observándose ahora un citoplasma con material proveniente de las células apoptóticas y gran cantidad de lisosomas de mayor tamaño con respecto a CD que permanecieron sin fagocitar (**Figura 13**).

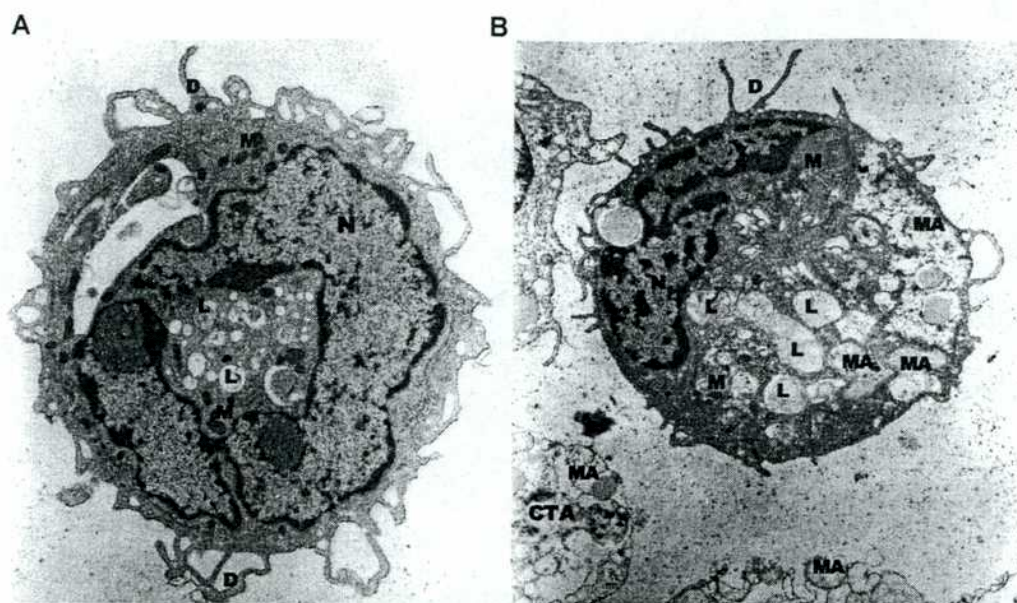
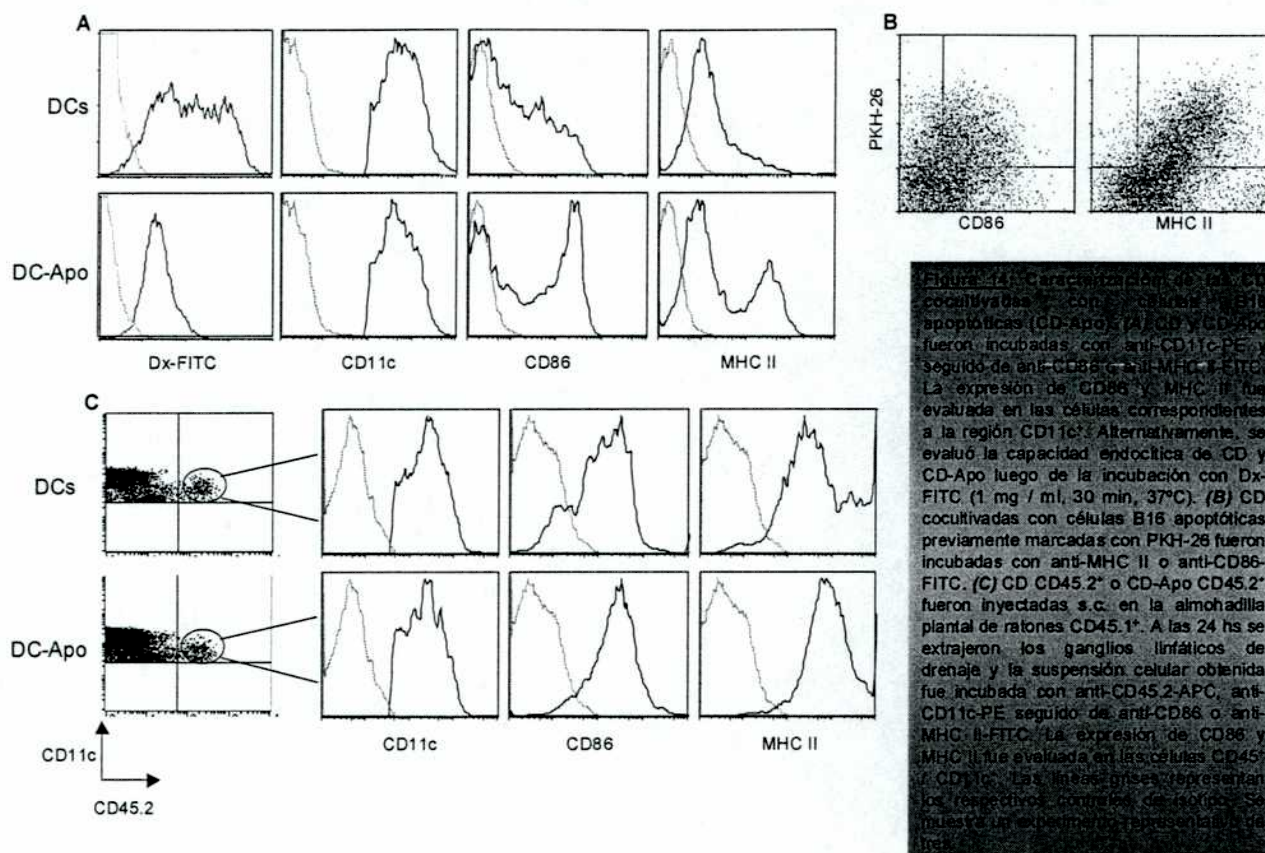


Figura 13: Microscopía electrónica de CD (A) antes y (B) después del cocultivo con células B16 apoptóticas. Luego del cocultivo se observa desplazamiento nuclear y activación citoplasmática con alto número de lisosomas y vesículas con material apoptótico. Las referencias corresponden a D: dendritas, L: lisosoma, M: mitocondria, N: núcleo, MA: material apoptótico, CTA: célula tumoral apoptótica. Aumento original: 6000x

2.3 Caracterización de las CD luego del cocultivo con células B16 apoptóticas

Para inducir una respuesta inmune primaria, las CD deben entrar en un proceso de maduración que involucra el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras y MHC; además las CD deben migrar hacia los ganglios linfáticos y seleccionar clones infrecuentes de células T naïve para su activación. Para evaluar estos atributos en nuestro sistema, las CD fueron cocultivadas con células B16 apoptóticas durante 24 hs (CD-Apo) y luego se evaluó la expresión en superficie de MHC II y CD86 y la endocitosis de Dx-FITC. Dado que las células B16 no expresan MHC II ni CD86, la expresión de dichas moléculas fue analizada solamente en la población de CD mediante una inmunofluorescencia doble (anti-CD11c-PE / anti-CD86-FITC o anti-MHC II-FITC). Mientras que la expresión de CD11c permaneció similar a la de CD cultivadas en ausencia de células tumorales, una gran fracción de CD expuestas a las células tumorales aumentaron la expresión de CD86 así como de MHC II (**Figura 14 A**). Cuando las CD fueron cocultivadas con células tumorales apoptóticas marcadas previamente con PKH-26 se comprobó que el aumento en la expresión de CD86 y

MHC II se observó principalmente en la población de CD que había incorporado material apoptótico (PKH-26⁺ / FITC⁺) (**Figura 14 B**). Consistentemente con el aumento en la expresión de CD86 y MHC II, las CD-Apo mostraron una marcada disminución en su habilidad para endocitar Dx-FITC respecto a las CD que no fueron expuestas a las células tumorales (intensidad de fluorescencia media 35,8 vs. 192,5 $p < 0,03$) (**Figura 14 A**).



Luego analizamos la capacidad migratoria de las CD-Apo. Además, aunque el aumento en la expresión de CD86 y MHC II se había observado principalmente en las CD que habían fagocitado material apoptótico, era importante corroborar el estadio de maduración de las células luego de la migración a los ganglios. Para poder determinar con certeza el nivel de maduración de las CD inyectadas independientemente de las CD endógenas residentes en los ganglios, CD obtenidas de ratones B6 (CD45.2⁺) que fueron pulsadas con células B16 apoptóticas o sin pulsar fueron inyectadas en forma s.c. en ratones CD45.1⁺. Luego de 24 hs los ganglios linfáticos fueron extraídos y se analizó el fenotipo de las CD que habían sido inoculadas (CD45.2⁺) por medio de una inmunofluorescencia triple (anti-CD45.2-APC / anti-CD11c-PE / anti-CD86-FITC o anti-MHC II-FITC). En los ganglios linfáticos se encontraron células CD11c⁺ / CD45.2⁺ provenientes tanto de las CD-Apo como de CD sin pulsar y en

ambos casos mostraron un aumento de la expresión de CD86 y MHC II (**Figura 14 C**). El número de células CD45.2⁺ inyectadas, encontradas en los ganglios, correspondía a ~ 0.5% del inóculo original, consistente con datos previos (Capítulo I, Figura 9; (130)). Por lo tanto la inyección s.c. de CD con o sin exposición a células tumorales apoptóticas lleva a la residencia de números comparables aunque pequeños de CD maduras en los ganglios linfáticos, condición necesaria para evaluar su capacidad inmunizante contra el desafío con el melanoma B16.

2.4 La vacunación con CD cargadas con células B16 apoptóticas induce protección contra el desarrollo de tumores B16

Para evaluar si las CD cocultivadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo) eran capaces de inducir resistencia contra el desafío con el tumor, ratones B6 fueron vacunados s.c semanalmente durante 4 semanas con 2×10^5 CD-Apo y desafiados con 1.3×10^4 células B16 una semana después. La eficacia de la vacunación con CD-Apo se comparó con diferentes controles de CD: CD más Apo sin cocultivo previo (CD + Apo), CD solas, células B16 apoptóticas solas (Apo), CD cocultivadas con células B16 necróticas (CD-Nec), células B16 necróticas solas (Nec) y vehículo (PBS). Las células B16 necróticas fueron obtenidas por cuatro ciclos rápidos de congelación / descongelación, el 100 % de las mismas incorporaron IP y fueron eficientemente fagocitadas por CD (**Figura 15 A-B**). Por último, para descartar la posibilidad de activación inespecífica de las CD luego del cocultivo con células apoptóticas, se incluyó un grupo de animales que recibieron CD cocultivadas con esplenocitos singeneicos apoptóticos (CD-Espl). Los animales fueron observados día por medio después del desafío tumoral y el tamaño de los tumores fue medido como se indicó en Materiales y Métodos (**Figura 16 A-B**).

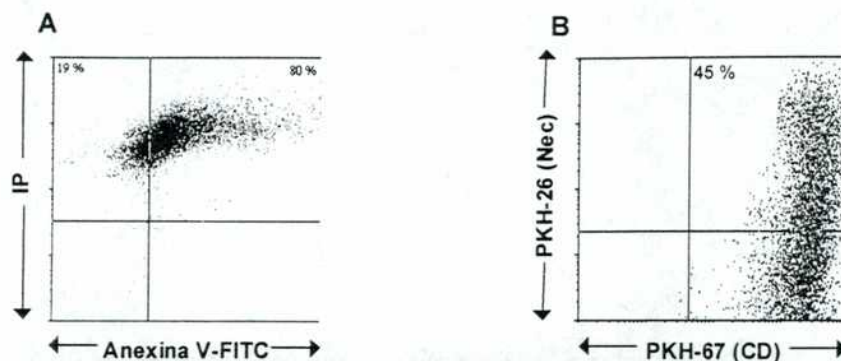


Figura 15: Inducción y fagocitosis de células B16 necróticas. (A) La necrosis de células B16 fue inducida por cuatro ciclos rápidos de congelación / descongelación y evidenciada por tinción con Anexina-V-FITC / IP. La necrosis fue definida por la incorporación de IP. (B) CD inmaduras marcadas con PKH-67 fueron incubadas con igual número de células B16 necróticas (Nec) marcadas con PKH-26 durante 24 hs a 37°C. La fagocitosis fue definida como el porcentaje de células doble positivas. Se muestra un experimento representativo de tres.

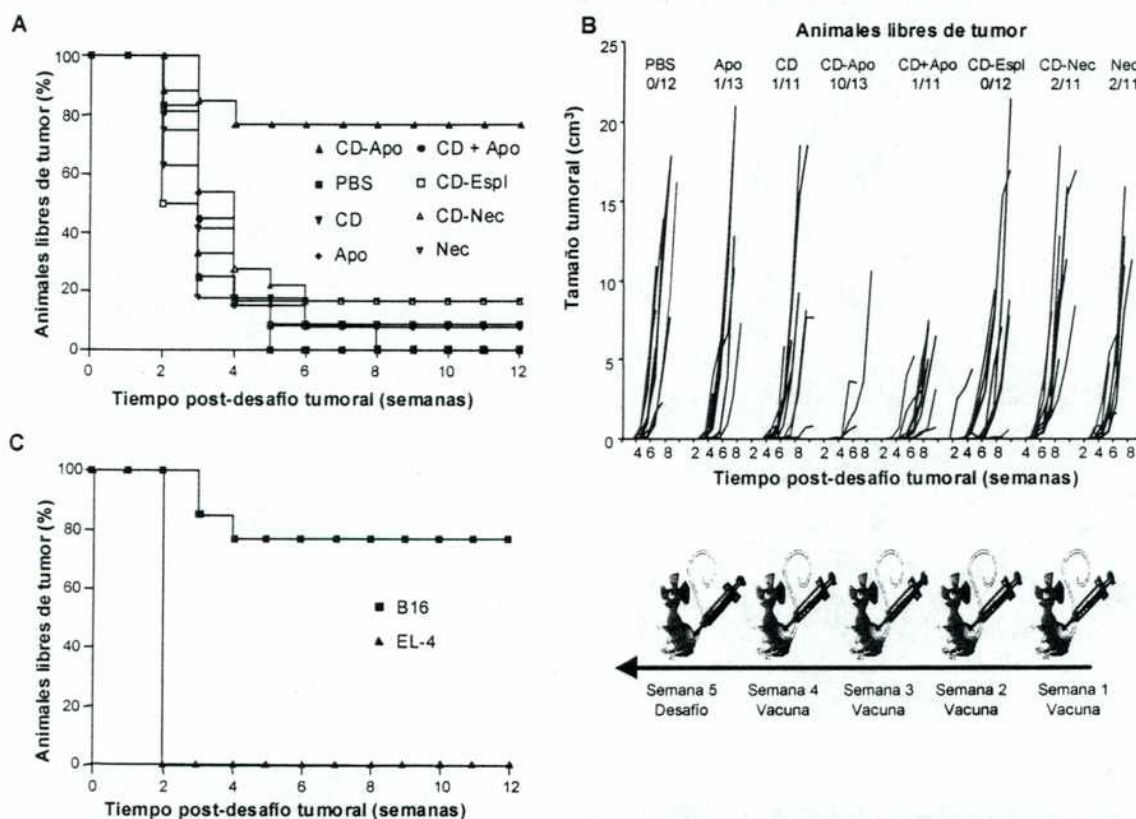


Figura 16: La vacunación con CD cocultivadas con células B16 apoptóticas induce protección contra el melanoma B16. (A-B) 10 – 13 animales por grupo fueron vacunados con 2×10^5 CD cocultivadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo), CD solas, células apoptóticas (Apo), CD más células apoptóticas sin cocultivo previo (CD + Apo), CD cocultivadas con esplenocitos singéneos apoptóticos (CD-Espl), CD cocultivadas con células B16 necróticas (CD-Nec), células necróticas (Nec) o PBS, semanalmente durante 4 semanas y desafiados con $1,3 \times 10^4$ células B16 una semana después. (C) Animales (10 / grupo) vacunados con CD-Apo fueron desafiados con células B16 o con el linfoma singéneo EL-4. (A-C) Los animales fueron observados día por medio durante 12 semanas y el volumen tumoral fue calculado como $d^2 \times D / 2$, donde d: diámetro menor y D: diámetro mayor. CD-Apo respecto a los otros grupos $p < 0.05$ (Mann-Whitney U test). Se muestra un experimento representativo de tres.

El 80 % de los animales vacunados con CD-Apo permanecieron libres de tumor 12 semanas después del desafío tumoral relativo a 0 % en el grupo control inyectado con PBS

($p < 0.01$) (**Figura 16 A**). Ninguno de los grupos control mostró protección relativa a los animales que recibieron PBS. Cuando los animales fueron inyectados con Apo o con CD + Apo sin cocultivo previo, solo el 8 % ($p < 0.01$) permanecieron libres de tumor en la semana 12 indicando que las CD son necesarias para inducir una fuerte protección y que además necesitan estar previamente cocultivadas con Apo. En los animales inyectados con CD solas, el 9 % ($p < 0.01$) permaneció libre de tumor después de 12 semanas, descartando la posibilidad que el rechazo tumoral sea debido solamente a la expansión de células NK, la cual puede ser inducida por CD (38, 39, 171) o debido a inmunidad en respuesta a proteínas del medio de cultivo presentadas por las CD. Se ha descrito que CD cultivadas en presencia de FBS son capaces de inducir respuesta de células T CD4⁺ (172) (173) y de activar linfocitos T citotóxicos (CTLs) más eficientemente que CD cultivadas en condiciones libres de FBS (172). Por lo tanto, es probable que la presencia de péptidos derivados de FBS cargados en las CD haya contribuido a la respuesta antitumoral observada. Cuando los animales fueron vacunados con CD cargadas con esplenocitos singeneicos apoptóticos, el 0 % permaneció libre de tumor ($p < 0.01$), indicando que la inducción de inmunidad no fue debido a una activación inespecífica de las CD luego de la fagocitosis de células apoptóticas. En contraste con CD-Apo, sólo 17 % ($p < 0.01$) de los animales inyectados con CD-Nec permanecieron libres de tumor, demostrando que Apo son mejor fuente de Ag para la inmunización con CD. En síntesis, ***solamente los animales vacunados con CD-Apo mostraron protección contra el melanoma débilmente inmunogénico B16*** (**Figura 16 A y Tabla II**).

Para analizar la especificidad de esta respuesta anti-tumoral, animales vacunados con CD cargadas con células B16 apoptóticas fueron desafiados con el linfoma EL-4: todos los animales desarrollaron tumor a las dos semanas (**Figura 16 C**). Este resultado indica que la vacunación con CD cargadas con células B16 apoptóticas induce fuerte protección contra el desafío con células B16 pero no protege contra un tumor singeneico no relacionado.

Tabla II: Animales libres de tumor luego de la vacunación con CD-Apo^a.

Exp. No.	CD-Apo	CD	Apo	PBS
1	10/13 (77%)	1/11 (9%)	1/12 (8%)	0/12 (0%)
2	8/10 (80%)	1/11 (9%)	1/12 (8%)	0/10 (0%)
3	8/10 (80%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	0/10(0%)

Exp. No.	CD+Apo	CD-Nec	Nec	CD-Espl
1	1/12 (8%)	2/13 (15%)	1/8 (12%)	0/12 (0%)
2	1/11 (9%)	2/11 (18%)	2/11 (18%)	0/12 (0%)

^a Ratones C57BL/6 (10-13 / grupo) fueron vacunados con 2×10^5 CD cocultivadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo), CD solas, células apoptóticas (Apo), CD más células apoptóticas sin cocultivo previo (CD + Apo), CD cocultivadas con esplenocitos singéneos apoptóticos (CD-Espl), CD cocultivadas con células B16 necróticas (CD-Nec), células necróticas (Nec) o PBS, semanalmente durante 4 semanas y desafiados con $1,3 \times 10^4$ células B16 una semana después. Los resultados están expresados como el número de animales libres de tumor respecto al número total de animales inyectados 12 semanas después del desafío tumoral.

2.5 La vacunación con CD cargadas con células B16 apoptóticas induce memoria inmunológica

Además de una fuerte respuesta anti-tumoral, un objetivo importante a alcanzar con nuestra estrategia de vacunación era que dicha respuesta incluyera memoria inmunológica a largo plazo. Los animales vacunados con CD-Apo que permanecieron libres de tumor resistieron un segundo desafío tumoral (**Figura 17 A**), observación que nos llevó a diseñar un segundo experimento para confirmar si los animales vacunados adquirían memoria inmunológica. Para ello, los animales fueron vacunados con CD-Apo y desafiados con células B16 diez semanas más tarde. Nuevamente se adquirió una fuerte protección luego de la vacunación con CD-Apo. 12 semanas después del desafío tumoral, 80 % de los animales permanecieron libres de tumor contra 0 % ($p < 0.01$) en los animales control (**Figura 17 B**). Estos resultados indican que *la vacunación con CD-Apo imparte una considerable memoria contra el tumor B16*.

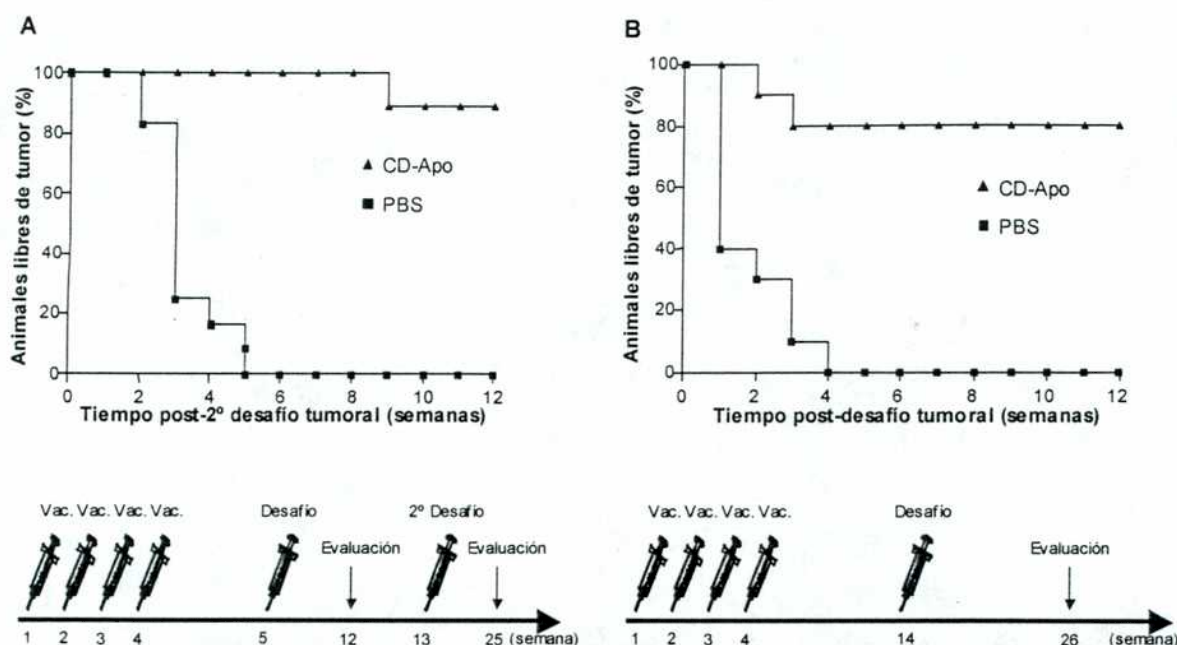


Figura 17: Inducción de memoria inmunológica luego de la vacunación con CD-Apo. (A) Los animales vacunados con CD-Apo y desafiados que permanecieron libres de tumor recibieron un segundo desafío tumoral con $1,3 \times 10^4$ células B16 en la semana 13 y fueron observados día por medio hasta la semana 25. (B) Animales (10 / grupo) vacunados con CD-Apo o PBS semanalmente durante cuatro semanas fueron desafiados con $1,3 \times 10^4$ células B16 diez semanas después de la inmunización y observados día por medio hasta el día 90. CD-Apo respecto a PBS $**p < 0,01$ (Wilcoxon Rank test). Se muestra un experimento representativo de tres.

2.6. Tanto células $CD4^+$ como $CD8^+$ son necesarias para la respuesta anti-tumoral

Luego de comprobar que la vacunación con CD-Apo induce una potente respuesta anti-tumoral provista de memoria inmunológica, el paso siguiente fue estudiar el rol de los linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en la resistencia observada contra el melanoma B16; el cual no se ha demostrado previamente que induzca una respuesta combinada de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en ratón. Animales vacunados con CD-Apo recibieron anticuerpos monoclonales anti- $CD4$, anti- $CD8$ o IgG de rata control el día anterior al desafío tumoral seguido de dos inyecciones el día del desafío y el subsiguiente. La depleción *in vivo* tanto de células T $CD4^+$ como $CD8^+$ eliminó completamente la protección contra el desafío tumoral (**Figura 18**). Como las deplecciones se realizaron después de la vacunación con CD-Apo, el resultado sugiere que tanto los linfocitos $CD4^+$ como $CD8^+$ juegan un rol crucial en la resistencia al melanoma B16 luego de la vacunación con CD-Apo.

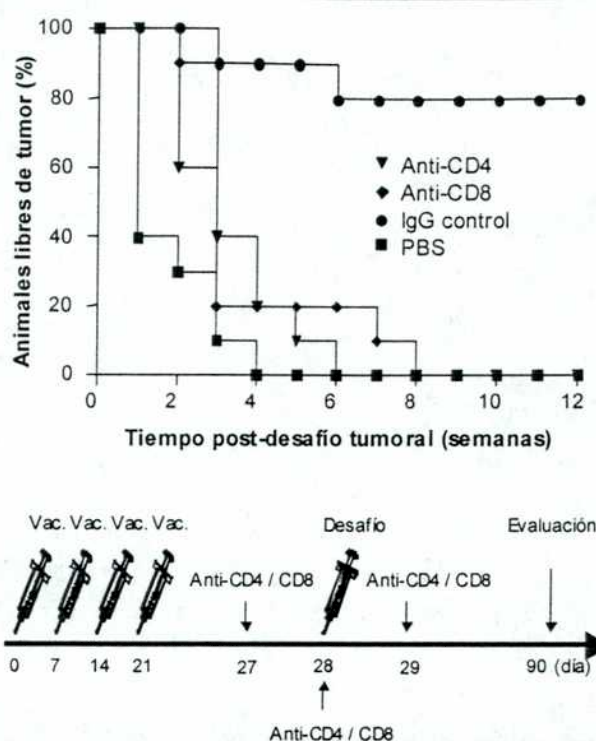


Figura 18: Depleción in vivo de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺. Animales (10 / grupo) vacunados con CD-Apo o PBS fueron inyectados con 1 mg de anticuerpos monoclonales anti-CD4, anti-CD8 o IgG de rata estándar repartido en 3 inyecciones consecutivas el día anterior al desafío tumoral, el día del desafío y el subsiguiente. El desafío se realizó con $1,3 \times 10^4$ en la semana 5. Los animales fueron observados día por medio durante 12 semanas. Se muestra un experimento representativo de dos.

Discusión

La inmunoterapia basada en la utilización de CD está siendo desarrollada como una nueva aproximación para la vacunación contra el cáncer. Las CD poseen el potencial para ser cargadas con un amplio espectro de Ag y activar tanto linfocitos T CD8⁺ como CD4⁺. Sin embargo, la respuesta inmune generada contra CD cargadas con diferentes fuentes de Ag tumorales aún requiere investigación. En este capítulo se demostró que células del melanoma B16 en apoptosis como consecuencia de la irradiación y posterior cultivo, son una efectiva fuente de Ag para la vacunación con CD induciendo una respuesta anti-tumoral dependiente de células CD8⁺ y CD4⁺ y provista de memoria inmunológica. El melanoma B16 es débilmente inmunogénico y letal aún cuando sólo se inyecten 10^4 células, convirtiéndose en un valioso modelo para el estudio de inmunidad tumoral. En trabajos realizados utilizando CD cargadas con diferentes clones de células B16 apoptóticas / necróticas (174, 175) no se ha

documentado la inducción de una respuesta combinada de células CD8⁺ y CD4⁺ ni de memoria a largo plazo.

Además de ser una fuente de Ag para ser presentados vía MHC I y MHC II, las células en apoptosis pueden también influir el estadio de maduración de las CD, y por consiguiente la calidad y nivel de la respuesta inmune resultante. Existen datos contradictorios respecto a la capacidad de las células apoptóticas o necróticas son capaces de inducir la maduración de las CD. Sauter y col. (65) reportaron que la incubación de CD con líneas de células tumorales necróticas, pero no apoptóticas, induce la maduración de las CD, mientras que otros autores concluyeron que la incubación con células apoptóticas es suficiente para inducir maduración (161, 162, 174, 176). Los resultados aquí descriptos muestran que luego del cocultivo con células B16 en apoptosis inducida por radiación γ , una alta proporción de las CD fagocitan las células apoptóticas y aumentan la expresión de CD86 y MHC II (**Figuras 11 – 14**). Sin embargo, es posible que la presencia de células necróticas (< 20%) en la preparación de células apoptóticas tenga relevancia en la maduración de las CD observada.

También se han caracterizado las CD que migraron a los ganglios linfáticos regionales luego de ser inyectadas en forma s.c., comparándose CD que fueron pulsadas con células B16 apoptóticas y CD que permanecieron sin pulsar. Las células migrantes mostraron alta expresión de CD86 y MHC II en forma uniforme (**Figuras 14 C**) comparable con CD maduras e inmunogénicas. No obstante, cuando se enumeraron las células migradas, sólo ~ 0,5 % del inóculo original fue encontrado en los ganglios linfáticos de drenaje un día después de la inyección.

El presente modelo de vacunación consiste en 4 inyecciones semanales de CD-Apo, y ha sido utilizado para la prevención del desarrollo del melanoma B16 obteniéndose un sorprendente nivel de protección: 80 % de los animales permanecieron libres de tumor 12 semanas después del desafío con células B16 (**Figura 16**). No se observó protección cuando los animales vacunados con CD-Apo fueron desafiados con el linfoma singeneico EL-4 (**Figura 16 C**), sugiriendo que la respuesta inmune obtenida fue dirigida específicamente contra Ag del melanoma B16. Más aún, la vacunación con CD-Apo también indujo memoria inmunológica, ya que nuevamente el 80 % de los ratones permanecieron libres de tumor cuando recibieron el desafío tumoral 10 semanas después de la inmunización (**Figura 17**). Sería de gran importancia utilizar la vacuna CD-Apo en términos terapéuticos, sin embargo una limitación importante, como se evidencia en la **Figura 14 C**, es el bajo número de CD que

migran a los ganglios linfáticos. Un día después de inyectar 2×10^5 células en cada almohadilla plantar, solamente ~ 4000 CD fueron encontradas en los ganglios linfáticos de drenaje. Esto sugiere que con los métodos corrientes las CD inyectadas están funcionando muy por debajo de su potencial. Este es un tema que debería estudiarse en profundidad para favorecer la migración de las CD hacia los ganglios y obtener respuestas inmunológicas de mayor potencia capaces de erradicar un tumor establecido y de rápido crecimiento como el melanoma B16.

La depleción *in vivo* tanto de la población de linfocitos T $CD4^+$ como $CD8^+$ en los animales vacunados eliminó completamente la protección, indicando que ambas subpoblaciones celulares son necesarias para la efectiva vacunación con CD-Apo (**Figura 18**). Aún así, las células NK, así como otros efectores de la respuesta inmune innata como los fagocitos, células NKT y componentes del sistema de complemento, pueden también contribuir en la resistencia que ocurre en presencia de células T específicas contra el tumor inducidas por la vacunación con CD-Apo. En el trabajo descrito por Hung y col. (168), la respuesta inmune inducida por la vacunación con células B16 modificadas genéticamente para secretar GM-CSF (B16:GM-CSF) requiere de células T $CD4^+$ en la fase efectora de la respuesta anti-tumoral. Por el contrario, sus resultados muestran que la depleción de células T $CD8^+$ revierte sólo parcialmente la respuesta protectora, sugiriendo que la vacunación con células B16:GM-CSF no induce una efectiva inmunidad de células $CD8^+$. En forma similar, Shibagaki y col. (167) mostraron que la vacunación con células B16:GM-CSF es relativamente ineficiente en la inducción de CTLs así como de memoria inmunológica. Los resultados expuestos en el presente capítulo indican que la vacunación con CD-Apo posee ventajas en la inducción de respuesta helper $CD4^+$ y citotóxica $CD8^+$ combinada y de memoria a largo plazo.

Un hallazgo llamativo en este trabajo fue que las CD cargadas con células tumorales apoptóticas, pero no con necróticas, resultaron inmunogénicas aún cuando ambas fuentes de células tumorales fueron efectivamente fagocitadas por las CD (**Figuras 11 y 15 B**). Shimizu y col. (177), utilizando vacunas con CD cargadas con lisados o péptidos, describieron que para la protección dependiente de células T $CD4^+$ era necesario incluir en el protocolo de inmunización el agregado de IL-2 y una proteína inmunogénica (keyhole limpet hemocyanin; KLH). Por su parte Kotera y col. (174) han reportado que CD pulsadas con células B16 altamente enriquecidas en células apoptóticas o necróticas (lisados) mostraban similar

actividad anti-tumoral, aunque cabe mencionar que sus experimentos fueron monitoreados solamente durante 18 días luego del desafío tumoral y que además las condiciones de inmunización que utilizaron sólo permitieron un retraso en el crecimiento tumoral. Sin embargo, existen otros ejemplos que muestran que CD cargadas con células apoptóticas son más eficientes que CD cargadas con células necróticas para la activación de células T (61) (160, 178, 179). En el trabajo de Albert y col. (61) los Ag adquiridos de células apoptóticas fueron eficientemente “presentados cruzadamente (cross-presentación) por CD, mientras que CD cargadas con Ag derivados de células necróticas fueron ineficientes inductoras de CTLs. Strome y col. encontraron que CD pulsadas con células tumorales modificadas para expresar OVA e irradiadas fueron efectivas estimuladoras *in vitro* de clones de CTLs específicos para OVA, pero CD pulsadas con células tumorales congeladas / descongeladas no fueron capaces de estimular la secreción de IFN γ (178). Más aún, los autores describieron un efecto inhibitorio de las células congeladas / descongeladas sobre la actividad CTL *in vitro*. Resultados similares fueron observados cuando los autores utilizaron líneas de melanoma humano y clones de CTLs específicos para el Ag de melanoma gp100. Luego, estos autores ensayaron ambas fuentes de Ag para la vacunación con CD *in vivo*, y nuevamente sólo las CD cargadas con células tumorales irradiadas fueron efectivas en la prevención del desarrollo del linfoma EG.7 modificado para expresar OVA. Schnurr y col. han encontrado también que CD pulsadas con células apoptóticas de un tumor pancreático fueron más adecuadas que CD pulsadas con un lisado de células tumorales para activar *in vitro* tanto linfocitos CD8 $^{+}$ como CD4 $^{+}$ (179). Utilizando un modelo de carcinoma espinocelular, Hoffmann y col. reportaron también que CD pulsadas con células apoptóticas indujeron respuestas CTL más potentes que CD cargadas con lisados celulares (160). Es probable que las células necróticas o lisados sean una adecuada fuente de Ag tumorales para la vacunación con CD solamente cuando las células tumorales son más resistentes a la proteólisis, o cuando los lisados proveen estímulos estimulatorios adicionales para las CD.

Muchos estudios han sido llevados a cabo utilizando células tumorales apoptóticas como fuente de Ag (62, 64, 160-162, 178, 179). No obstante, ninguno de ellos ha demostrado inducción *in vivo* de inmunidad anti-tumoral CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ combinada. En el presente trabajo de Tesis se ha demostrado, por primera vez, que ***CD que fagocitaron células tumorales apoptóticas inducen inmunidad a largo plazo dependiente de la acción combinada de linfocitos CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ contra el melanoma débilmente inmunogénico B16***. Este modelo

preclínico provee el marco necesario para la realización de estudios clínicos utilizando CD-Apo como adyuvante para la inmunización activa contra el cáncer.

Capítulo III

CAPITULO III

ESTUDIO DE LA RESPUESTA ANTI-TUMORAL INDUCIDA POR LA VACUNACIÓN CON CD-APO.

Teniendo en cuenta el sorprendente nivel de protección obtenido luego de la vacunación con CD-Apo y considerando que para inducir una respuesta anti – tumoral efectiva probablemente sea necesario inducir una respuesta inmune multifactorial, el objetivo de este capítulo fue *estudiar los mecanismos involucrados en la respuesta anti - tumoral observada, evaluando tanto la respuesta celular como la humoral.*

3.1 CD cargadas con células B16 apoptóticas activan eficientemente linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ *in vivo*

En el capítulo II se demostró que la depleción *in vivo* de células T CD4⁺ o CD8⁺ inhibía por completo la resistencia anti-tumoral observada en los animales vacunados con CD-Apo. Para verificar que ambas subpoblaciones celulares podían ser eficientemente activadas para producir IFN γ luego de la inmunización con CD-Apo, células T CD4⁺ y CD8⁺ fueron purificadas por selección positiva a partir del bazo de animales vacunados CD-Apo o control. Las fracciones de células T obtenidas fueron estimuladas *in vitro* durante 48 hs con células B16 enteras, CD-Apo, CD, o con CD previamente pulsadas con el péptido derivado de TRP-2 (CD-TRP-2) o con un péptido control derivado de OVA (CD-OVA) y el sobrenadante de cultivo fue luego utilizado para evaluar la producción de IFN γ (**Figura 19**). La proteína relacionada a tirosinasa-2 (TRP-2) es un Ag de diferenciación celular expresado por melanocitos normales y células de melanoma tanto en humanos como en ratón (166, 180-183) y fue utilizado como Ag tumoral modelo. Como se puede observar en la **Figura 19**, sólo los linfocitos T CD8⁺ de animales vacunados con CD-Apo fueron capaces de responder al estímulo con células B16 enteras. Sin embargo, ambos subtipos celulares respondieron al estímulo con CD-TRP-2 o CD-Apo, siendo la respuesta con las células T CD4⁺ más vigorosa (**Figura 19**). Como control, células T CD8⁺ de animales vacunados con CD-Apo produjeron menos de 30 pg / ml de IFN γ cuando permanecieron sin estimular o luego de ser estimulados con CD o CD-OVA (**Figura 19 A**). Las células T CD4⁺ de animales inmunizados con CD-

Apo tampoco fueron capaces de producir IFN γ en ausencia de CD, pero sí produjeron bajas cantidades de dicha citoquina al ser cultivadas en presencia de CD o CD pulsadas con el péptido control (**Figura 19 B**). Aunque estos ensayos se realizaron utilizando suero normal de ratón, las CD utilizadas como presentadoras antigénicas fueron previamente cultivadas en presencia de 10 % FBS, y la presencia de péptidos derivados de las proteínas presentes en el FBS podría explicar la respuesta de las células T CD4 $^{+}$ contra CD o CD-OVA (172) (173). Cuando los cultivos se realizaron con linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ obtenidos en forma conjunta, la respuesta observada frente al estímulo con células B16 enteras fue similar a la obtenida con células CD8 $^{+}$ solas, no obstante se obtuvo un importante incremento en la concentración de IFN γ en respuesta a CD-Apo y CD-TRP-2 con respecto a la obtenida con cada una de las subpoblaciones linfocitarias por separado (**Figura 19 C**). Células T obtenidas de ratones control produjeron niveles menores a 30 pg / ml de IFN γ con o sin estímulo. Estos resultados indican que cuando los animales son vacunados con CD cargadas con células B16 apoptóticas se activan linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ productores de IFN γ , específicos contra Ag de melanoma como por ejemplo TRP-2.

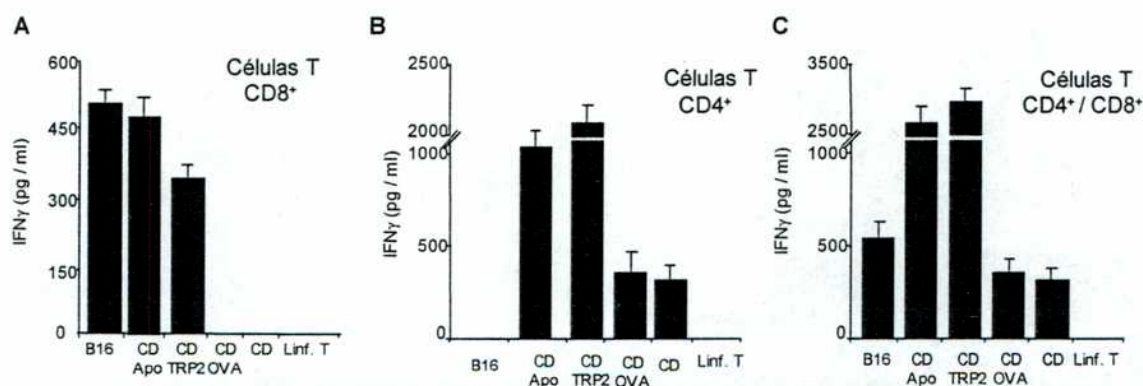


Figura 19: Linfocitos T CD4 $^{+}$ y CD8 $^{+}$ activados luego de la vacunación con CD-Apo producen IFN γ . Linfocitos T CD8 $^{+}$ (A), CD4 $^{+}$ (B) y CD4 $^{+}$ + CD8 $^{+}$ (C) fueron purificados por selección positiva a partir del bazo de ratones vacunados con CD-Apo o PBS como se describe en *Materiales y Métodos*. 3×10^5 linfocitos fueron reestimulados con células B16 enteras, CD-Apo, CD pulsadas con el péptido TRP-2₍₁₈₀₁₈₅₎ o CD pulsadas con el péptido derivado de OVA_(SIINFEKL). Luego de 48 hs de cultivo se cosechó el sobrenadante de cultivo y se evaluó la presencia de IFN γ por ELISA. No se detectó IFN γ en el sobrenadante de cultivo de los linfocitos obtenidos de animales inyectados con PBS. Los valores están expresados como la media $\pm$ DS de triplicados.

3.2 Estudio de la actividad citotóxica efectora *in vivo* inducida luego de la vacunación con CD-Apo

Para evaluar si luego de la vacunación con CD-Apo podía detectarse actividad citolítica Ag-específica *in vivo*, se realizó un ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Para llevar a cabo este ensayo, esplenocitos singeneicos fueron marcados con una alta concentración de CFSE y pulsados con el péptido TRP-2 (CFSE^{hi}). Dichos esplenocitos fueron co-inyectados i.v. con igual número de esplenocitos previamente marcados con una concentración menor de CFSE y que permanecieron sin pulsar (CFSE^{low}), en animales que habían sido inmunizados con CD-Apo o CD. Diez horas después de la inyección de la mezcla de células CFSE^{hi} y CFSE^{low} se extrajo el bazo. La actividad citolítica específica fue medida por la desaparición de la población CFSE^{hi} pulsada con TRP-2. No se observó actividad citolítica en los animales que habían sido inyectados con CD, pero en los animales vacunados con CD-Apo, la actividad citolítica específica fue del 75 % cuando se transfirieron 10^7 células CFSE^{hi} / CFSE^{low} y aumentó al 92 % cuando 5×10^6 células fueron transferidas (**Figura 20**). Por lo tanto, la vacunación con CD-Apo lleva a la producción de células T efectoras que secretan IFN γ y tienen actividad citolítica.

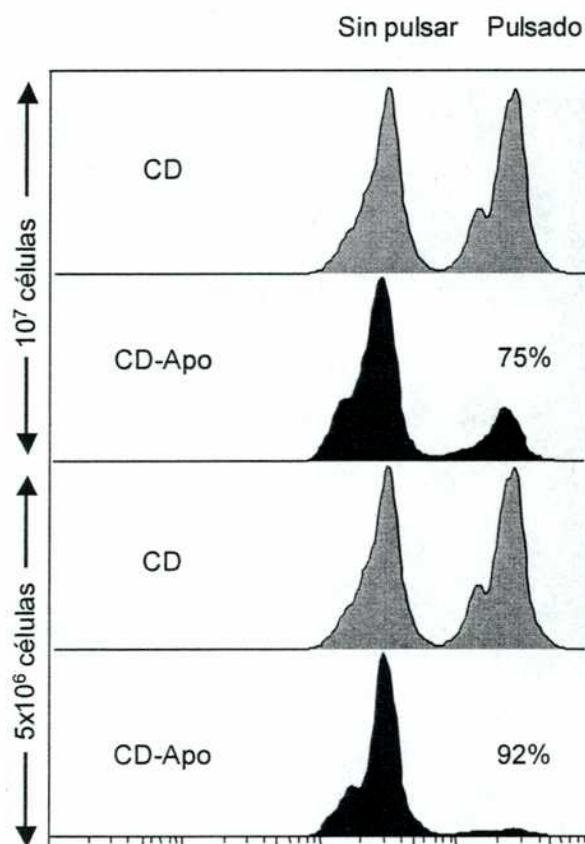


Figura 20. Ensayo de citotoxicidad *in vivo*. Esplenocitos singeneicos marcados con alta concentración de CFSE (CFSE^{hi}) pulsados con TRP-2₍₁₈₀₋₁₈₈₎ e igual número de esplenocitos marcados con baja concentración de CFSE (CFSE^{low}) sin pulsar fueron inyectados i.v. en animales vacunados con CD-Apo o CD. Luego de 10 hs se extrajo el bazo de los animales y se evaluó la lisis de las células transferidas por la desaparición selectiva de las células CFSE^{hi}. La actividad lítica específica se calculó con la fórmula detallada en *Materiales y Métodos*.

3.3 Estudio de la respuesta humoral inducida luego de la vacunación con CD-Apo

Para evaluar la respuesta humoral inducida luego de la vacunación con CD-Apo, se obtuvo el suero de los animales vacunados y se estudió la presencia de Ac dirigidos contra melanoma B16. Dos semanas después de la inmunización con CD-Apo, el título de Ac contra células B16 medido por ELISA fue de 1 / 2000, mientras que en el suero de los animales no vacunados se encontraron niveles menores, pero detectables (**Figura 21 A**). Como se mencionó con anterioridad, una ventaja en la utilización de células tumorales enteras como fuente de Ag es que las CD tendrían el potencial de presentar un amplio espectro de Ag tumorales. En base a ello, se analizó a continuación la reactividad del suero de los animales vacunados contra células B16 viables y permeabilizadas, observándose luego del análisis por FACS, la presencia de Ac dirigidos contra Ag de membrana así como contra Ag intracitoplasmáticos (**Figura 21 B-C**). Por citometría de flujo, se analizó también el isotipo de los Ac reactivos contra las células B16 presentes en el suero de los animales vacunados (**Figura 21 D**). El 85 % de las células fueron positivas para IgG1, 89 % para IgG2a, 59 % para IgG2b y 47 % para IgG3. El cambio en el isotipo de Igs que se producen requiere la colaboración de linfocitos T_H ($CD4^+$) y está dirigido por las citoquinas que éstos producen. Por ejemplo, en el ratón la IL-4 induce preferentemente el cambio hacia IgG1 e IgE, mientras que el $TGF\beta$ favorece la producción de IgG2b e IgA. Ambas citoquinas son producidas por linfocitos T_H2 . Por su parte, los linfocitos T_H1 a través de la secreción de $IFN\gamma$, favorecen el cambio hacia IgG2a e IgG3. Por lo tanto, los isotipos de Acs dirigidos contra las células B16 indicarían un patrón $Th1 / Th2$ mixto.

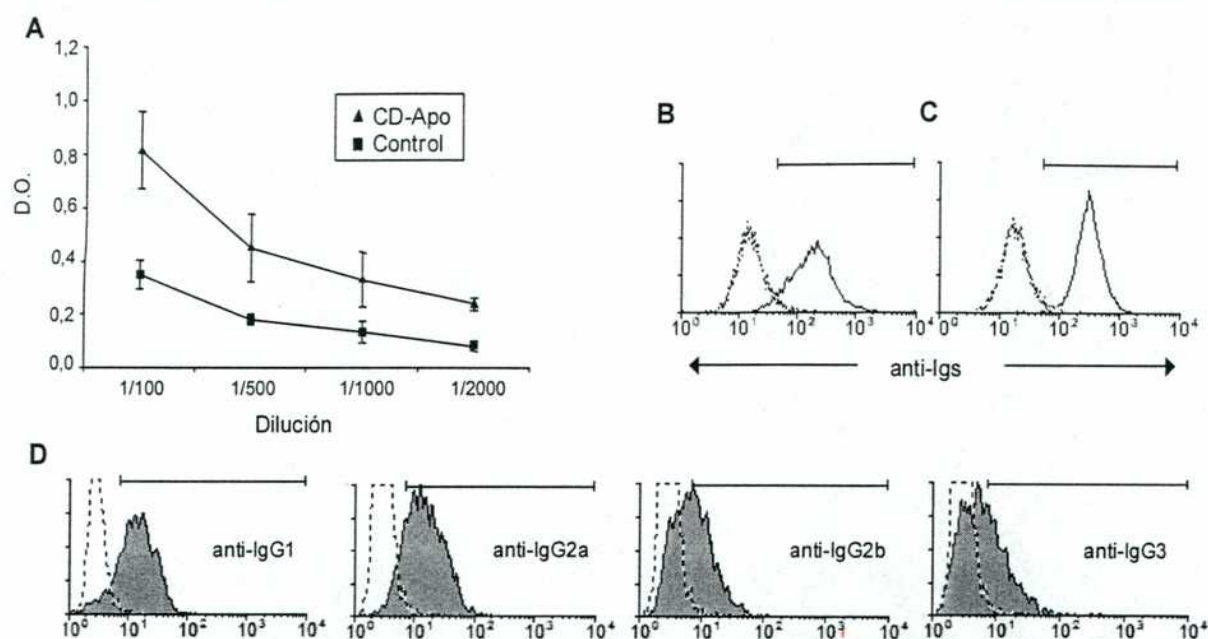


Figura 21. Estudio de la respuesta humoral inducida por la vacunación con CD-Apo. (A) La presencia de Ac contra células B16 en el suero de animales vacunados con CD-Apo o control fue evaluada por ELISA. Distintas diluciones de suero fueron incubadas sobre células B16 fijadas con formol 4 % y la reacción fue revelada utilizando anti-IgG totales-HRP. El suero (1 / 100) de animales vacunados con CD-Apo (línea entera) o control (línea punteada) fue incubado sobre (B) células B16 viables o (C) permeabilizadas con saponina 0,01 % y la reacción fue revelada con anti-IgG totales-FITC. (D) El suero de animales vacunados con CD-Apo (1 / 100) fue incubado con células B16 viables y la reacción fue revelada con anti-IgG1, -IgG2a, IgG2b o IgG3-FITC. La línea punteada representa el correspondiente control de isotipo.

Por último, se realizaron Western blots para determinar si la diferencia observada en el título de Ac presentes en el suero de los animales vacunados con respecto a los animales control se debía de una mayor concentración de Ac dirigidos contra los mismos Ag, o a la presencia de Ac dirigidos contra diferentes Ag tumorales. En el mismo, además de compararse la reactividad de los sueros frente al extracto de células B16, se evaluó también la reactividad de los mismos frente a un extracto de piel normal. En el suero de los animales vacunados se detectaron bandas dirigidas contra Ag de células B16 que no se encontraron en el suero de los animales control, y que además no reaccionaron con el extracto de piel normal (**Figura 22**). Por lo tanto, si bien el título de Ac alcanzado no fue muy alto, dichos Ac estarían dirigidos contra Ag específicos del melanoma B16.

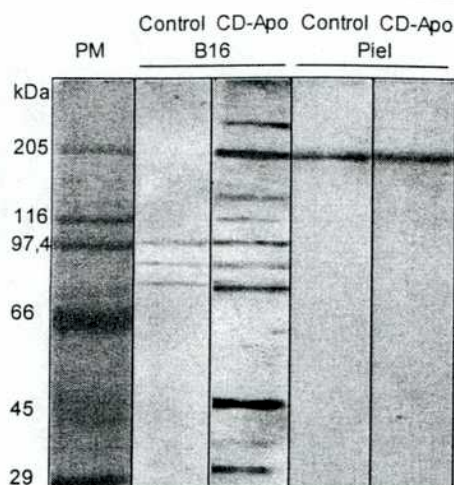


Figura 22: Estudio de la respuesta humoral inducida por la vacunación con CD-Apo. La reactividad del suero de ratones vacunados con CD-Apo o control fue evaluada por Western blot contra extractos de membrana de células B16 o piel normal. En un gel de poliacrilamida se sembraron 25 µg de proteína, luego de la corrida electroforética las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa que incubada con el suero correspondiente (1:1-25). La reacción fue revelada con enzimas totales-PA.

3.4 Análisis histológico del sitio de inyección

En el caso de los animales vacunados con CD-Apo y desafiados que permanecieron libres de tumor, los experimentos fueron terminados 12 semanas después del desafío tumoral. Los animales fueron autopsiados para investigar la ausencia de metástasis o desarrollo tumoral *in situ*. En ningún caso la autopsia reveló la presencia de metástasis, pero en un animal se encontró un pequeño tumor s.c en el sitio de inyección. Debido a que el tumor hallado era muy pequeño, ~ 2 mm en su mayor diámetro (**Figura 23 A-C**), para la comparación histológica se obtuvieron tumores controles inoculando $1,3 \times 10^4$ células B16 en animales no vacunados y extirpando los tumores en cuanto fueron palpables (**Figura 23 D**). En el tumor encontrado en el animal vacunado se observó que una gran proporción del mismo estaba necrótica (**Figura 23 A, ****). Se identificó un área definida de ataque linfoide (**Figura 23 B, flecha**), en la cual se observaron numerosas vénulas activadas con extravasación linfocítica en un borde donde se identificaron células tumorales necróticas (**Figura 23 G**). En otra zona de actividad linfoide (**Figura 23 C y H, flechas**), se distinguió un acumulo linfoide con vénulas activadas y extravasación de linfocitos (**Figura 23 I**), aunque relativamente distante del tumor. En la región intra-tumoral se hallaron abundantes células tumorales y macrófagos cargados con melanina (**Figura 23 E y F, respectivamente**). La imagen general fue muy diferente en los tumores controles, donde la amplia mayoría de células se encontraban viables, excepto un pequeño centro necrótico (**Figura 23 D**). Los márgenes tumorales se encontraron libres de infiltrado linfoide (**Figura 23 D**); las vénulas del tumor no

estaban activadas (**Figura 23 J**) y tampoco se observaron macrófagos o células tumorales cargados de melanina (**Figura 23 J**).

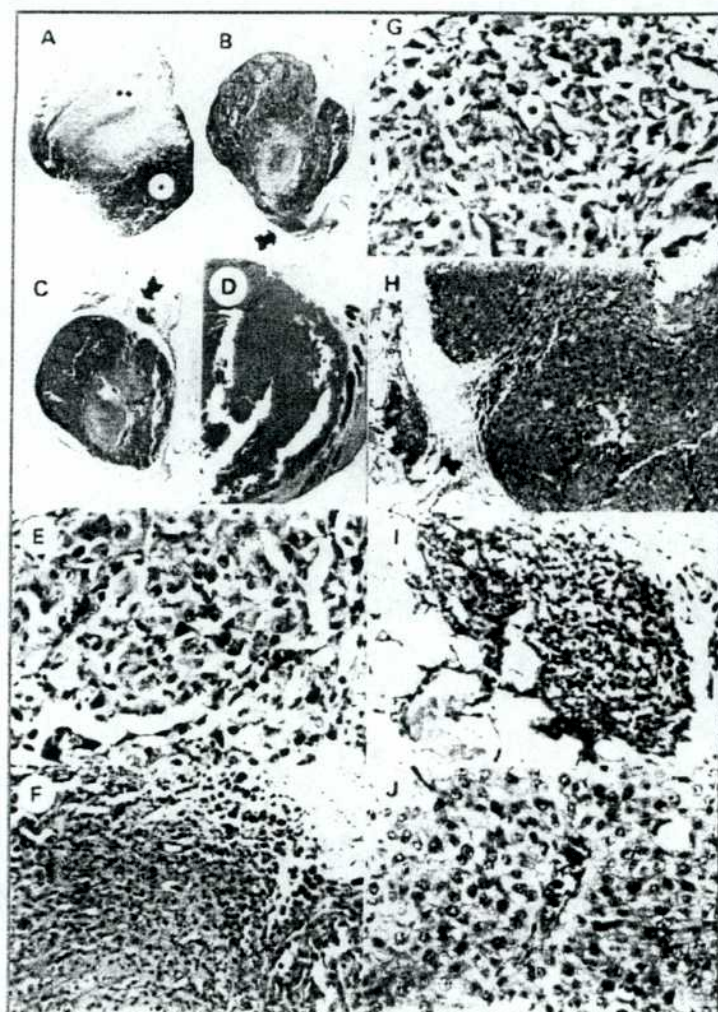
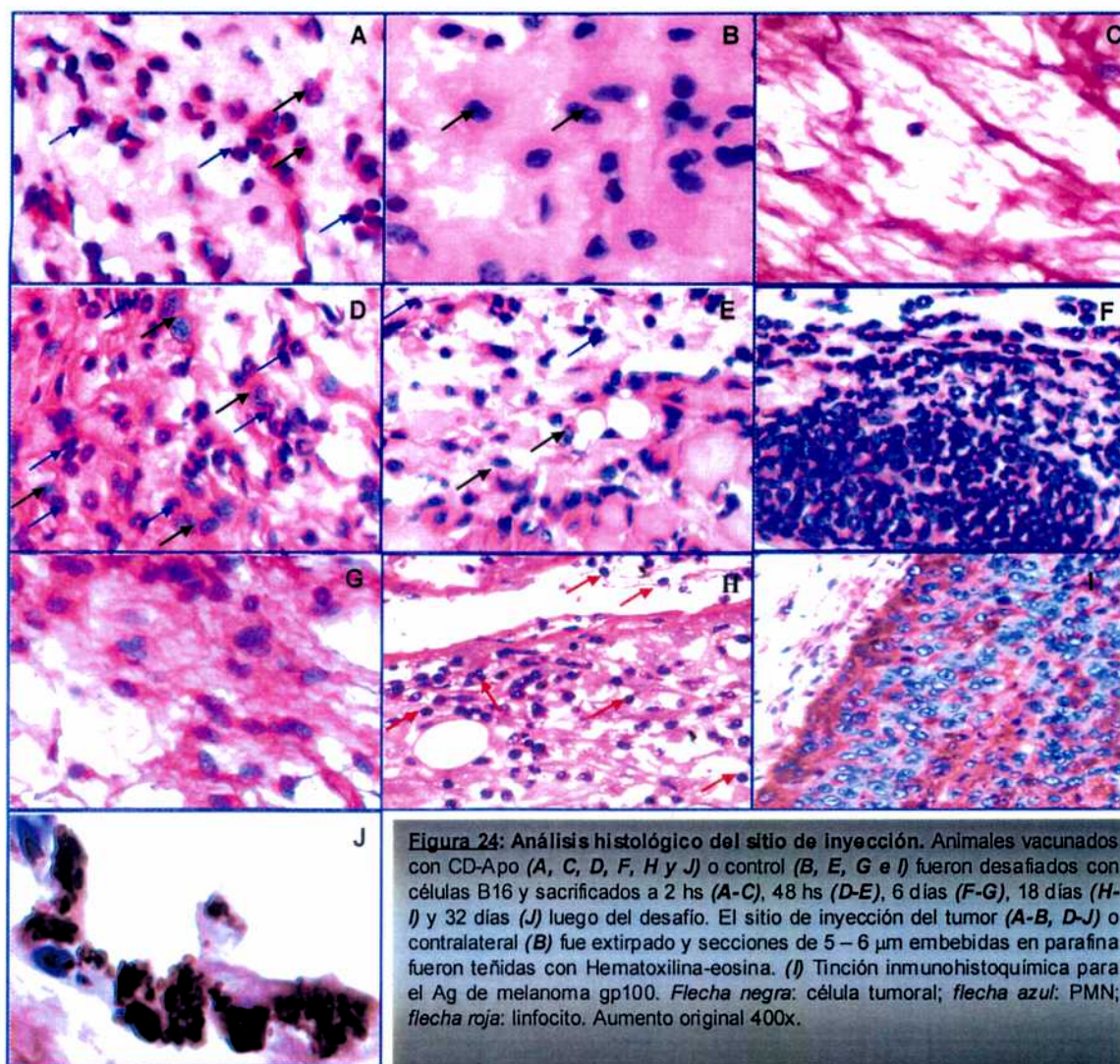


Figura 23: Análisis patológico del sitio de inoculación del tumor. Secciones de 5 – 6 μ m embebidas en parafina fueron teñidas con Hematoxilina-eosina. (A-C): tumor en regresión de 2 mm de diámetro mayor extirpado de un animal vacunado con CD-Apo 12 semanas después del desafío. (A*) área de infiltrado linfocítico, (A**) centro necrótico, (B-C) zonas de acumulación de linfocitos (flechas); (D) tumor control extirpado en cuanto fue palpable. (E) ampliación de (A*); (F) ampliación de (A**); (G) ampliación de (B flecha): zona de ataque linfóide; (H-I) ampliación de (C flecha); (J) tumor control. Escala: 1cm = 38.5 μ m para A – D, 10 μ m para F y H, 2.5 μ m para E, G, I y J.

A raíz de este particular hallazgo de un tumor probablemente en regresión, donde se observaron zonas definidas de ataque linfóide e invasión de macrófagos que podrían contribuir a la necrosis tumoral, resultó de gran interés analizar histológicamente los primeros pasos del rechazo tumoral. Con dicho fin, los animales vacunados con CD-Apo o controles inyectados con PBS fueron desafiados con células B16 y sacrificados a distintos tiempos para realizar el análisis patológico del sitio donde había sido inoculado el tumor. Sorprendentemente, en los animales vacunados con CD-Apo se observó un infiltrado de células polimorfonucleares (PMNs) entre las células tumorales dispersas, aún a tiempos tan tempranos como 2 hs luego de la inyección del tumor (**Figura 24 A**). Se descartó la posibilidad de una reacción inflamatoria producida por el daño tisular ocasionado por la inyección per se, ya que en los animales controles se observaron las células tumorales pero no se observó infiltrado de PMNs (**Figura 24 B**). Durante la inmunización los animales

recibieron 2 dosis de CD-Apo en cada flanco. Por lo tanto, se analizó el flanco contralateral en el cual se había inyectado solamente la vacuna. No se observó infiltrado inflamatorio en el sitio donde se había inyectado sólo la vacuna (**Figura 24 C**), descartándose la posibilidad que se trate de una respuesta inflamatoria local debida a la inyección de CD-Apo. Luego de 48 hs, en los animales vacunados se detectó un aumento en el infiltrado inflamatorio con abundantes PMNs alrededor de las células tumorales, mientras que en los animales controles se observaron escasos PMNs (**Figura 24 D-E**). Seis días después del desafío tumoral el infiltrado de PMNs en los animales vacunados fue impresionante (**Figura 24 F**), dejando a las escasas células tumorales completamente rodeadas. Por el contrario, en los animales controle se observaron células tumorales de mayor tamaño, formando acúmulos de células posiblemente en división y el escaso infiltrado de PMNs había desaparecido casi completamente (**Figura 24 G**). El escenario cambió notablemente luego de 18 días de haber inoculado las células B16. El copioso infiltrado de PMNs observado en los animales vacunados con CD-Apo disminuyó marcadamente. Se observaron en su lugar linfocitos y escasos PMNs y lo más importante: no se encontraron células tumorales (**Figura 24 H**). Por su parte, en los animales que no habían sido vacunados, se observaron nidos tumorales, con tinción inmunohistoquímica positiva para el Ag de melanoma gp100 y con bordes libres de infiltrado inflamatorio (**Figura 24 I**). Finalmente, a los 32 días del desafío tumoral, en los animales que habían sido inmunizados con CD-Apo sólo se observaron abundantes macrófagos con gran cantidad de melanina en su citoplasma (**Figura 24 J**).



Discusión

El importante rol que juegan las CD como adyuvantes naturales para el diseño de vacunas antitumorales se debe a que son capaces de inducir diferentes mecanismos de resistencia inmunológica. Además de ser potentes activadoras de células T específicas, las CD participan activamente en la inducción de la respuesta humoral (184-188) y en la activación y expansión de componentes de la respuesta innata como las células NK y NKT (37-40, 171, 189).

En el capítulo II se demostró que la respuesta antitumoral inducida luego de la vacunación con CD-Apo depende de la acción combinada de linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$. En el

presente capítulo se profundizó en el estudio de los mecanismos involucrados en dicha protección. Ensayos *in vitro* con células T purificadas indicaron que, tanto células CD4⁺ como CD8⁺ provenientes de animales vacunados con CD-Apo, fueron efectivamente activadas para producir IFN γ luego de ser re-estimuladas con CD pulsadas con el Ag de melanoma TRP-2 o con células B16 apoptóticas (**Figura 19**). Los linfocitos CD8⁺ también produjeron IFN γ cuando se cocultivaron con células B16 enteras (**Figura 19 A**). Además, experimentos de citotoxicidad *in vivo* demostraron que los animales inmunizados fueron capaces de eliminar esplenocitos pulsados con el péptido TRP-2 (**Figura 20**). Estos resultados indican que ***la vacunación con CD-Apo induce células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas, capaces de producir IFN γ y con actividad citolítica.*** Si bien las células B16 expresan bajos niveles de MHC I, el IFN γ producido por los linfocitos activados por las CD-Apo puede inducir un aumento en la expresión de MHC I en las células tumorales (190-192), y de esta forma transformarlas en susceptibles a la acción de linfocitos CD8⁺.

Aunque los linfocitos T CD4⁺ no reconocieron células B16 en forma directa, porque las últimas no expresan MHC II, las células T CD4⁺ activadas por la vacuna sí reconocieron Ag tumorales presentados por las CD (CD-Apo y CD-TRP-2) (**Figura 19 B**). El sinergismo en la producción de IFN γ observado cuando ambas subpoblaciones linfocitarias se enfrentaron en forma simultánea (CD4⁺ / CD8⁺) a CD-Apo o CD-TRP-2 (**Figura 19 C**), podría deberse a la mayor activación de los linfocitos CD8⁺ por la colaboración de los linfocitos CD4⁺. Ossendorp y col. han mostrado previamente que la óptima inducción de CTL requiere la colaboración de células T CD4⁺, aún en el caso de tumores MHC II negativos (193). En ese estudio, los autores utilizaron un modelo de vacunación con péptido para demostrar que la depleción de células T CD4⁺ tanto durante la fase inductora como la fase efectora de la respuesta inmune, reduce la sobrevivencia de animales preinmunizados. Del mismo modo, Mumberg y col. (194), reportaron que la transferencia de células T CD4⁺ es suficiente para eliminar un tumor MHC II negativo en ratones con inmunodeficiencia severa combinada. Si bien los autores mostraron que la presencia de IFN γ era necesaria, su acción no fue a través del aumento de MHC II en las células tumorales, sugiriendo que los Ag tumorales fueron cross-presentados por células MHC II⁺ del huésped. Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo de Tesis, en concordancia con otros autores (166, 168, 193), indican que para obtener una efectiva respuesta antitumoral, es necesaria la presencia de células T CD4⁺ específicas contra el tumor en el momento del desafío. Dichas células T pueden desplegar

diversas funciones: colaborar con linfocitos CD8⁺ en los ganglios linfáticos de drenaje, contribuir con la infiltración de CTL en el lecho tumoral (195), mantener *in situ* las funciones efectoras de CTL (196), liberar factores solubles que proveen resistencia contra el tumor en forma más directa por ej. IFN γ (190-192), y /o reclutar otras células efectoras (168).

Interesantemente, el péptido TRP-2₍₁₈₀₋₁₈₈₎ fue reconocido tanto por células T CD8⁺ como CD4⁺. Dicho péptido ha sido identificado como un epítopo relevante para MHC clase I (K^b) (181, 182). Sin embargo, Wang y col. reportaron que la inmunización con CD cargadas con el péptido TRP-2₍₁₈₀₋₁₈₈₎ fusionado con un péptido de penetración celular también induce respuesta T CD4⁺ y que la misma es requerida para la inmunidad antitumoral, según lo evidenciado por la depleción de células CD4⁺ y la utilización de ratones deficientes en dichas células (166). Es sabido que los péptidos se unen a la moléculas de MHC II vía una secuencia central de nueve aminoácidos (197-199), y dicha secuencia de nueve aminoácidos es también reconocida por el receptor T (200). Es por ello, que la fuerte respuesta de linfocitos T CD4⁺ observada contra TRP-2 no es del todo sorprendente.

Diferentes autores utilizaron CD cargadas con TRP-2 (utilizando el péptido solo, una fusión con otro péptido, expresión de la proteína TRP-2) para vacunar animales contra el melanoma B16, pero la sobrevida fue menor que la observada cuando los animales fueron vacunados con células B16 modificadas para secretar GM-CSF y la última fue a su vez menor que la observada en el presente trabajo, presumiblemente porque TRP-2 es sólo uno de muchos Ag presentes en las células B16 (166-168). De allí puede desprenderse que la vacunación con CD-Apo induce una potente respuesta antitumoral, posiblemente porque inmuniza linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contra numerosos Ag del melanoma B16, además de TRP-2.

Cuando se analizó la respuesta humoral, se evidenciaron Ac específicos contra células B16 en el suero de los animales vacunados (**Figuras 21 y 22**) y los isotipos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 detectados indicaron un perfil mixto Th1 / Th2. Dichos Ac podrían participar en la respuesta antitumoral favoreciendo el ataque de las células NK mediante la reacción de citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC). Las células NK expresan en su superficie el receptor para Ig Fc γ RIII (CD16), el cual al unirse a IgG1 o IgG3 activa el mecanismo de ADCC. Por otra parte, las CD del huésped podrían fagocitar las células tumorales opsonizadas y presentarlas a linfocitos T potenciando la respuesta contra el tumor. Además, las células

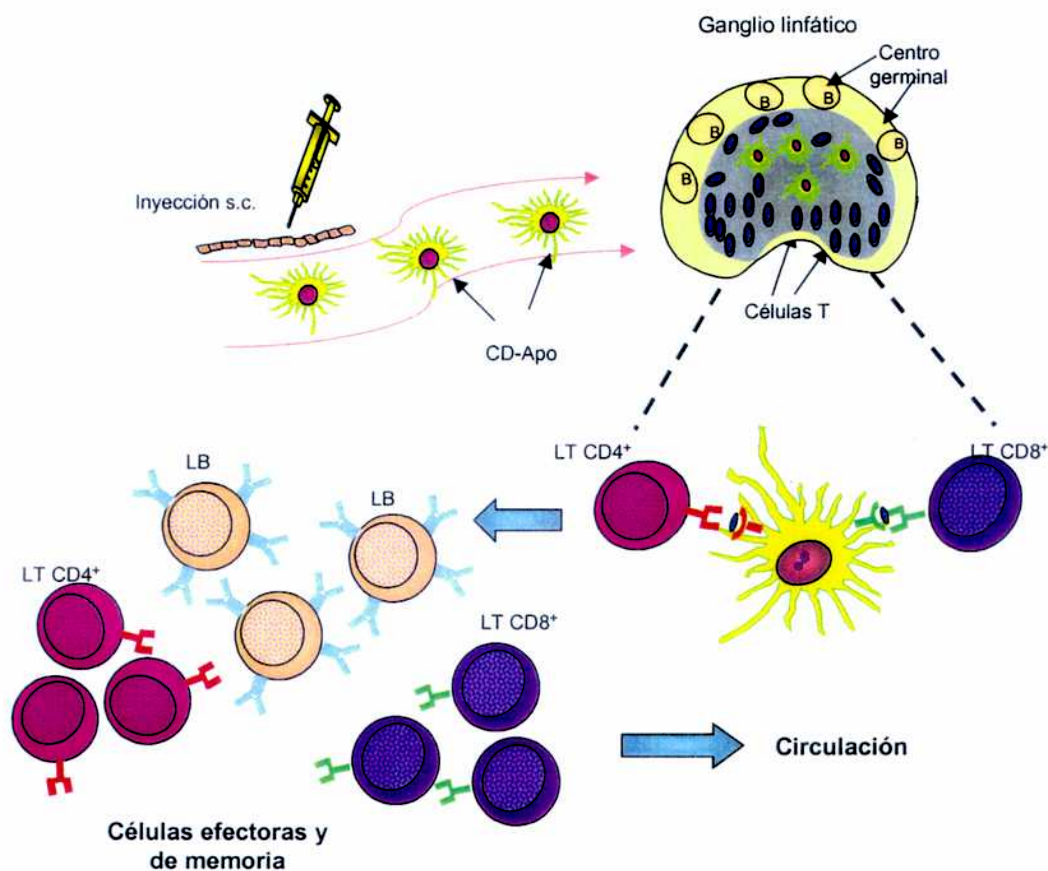
tumorales opsonizadas podrían ser blanco de células fagocíticas como los macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) que se unen principalmente a IgG1 e IgG3.

En el análisis patológico del pequeño tumor probablemente en regresión, hallado durante la autopsia de un animal vacunado, se identificaron sólo algunas zonas de activación linfoide y destrucción de células tumorales directamente atribuibles al ataque linfocítico, sin observarse una alta relación linfocitos : células tumorales. De allí surgió la idea de analizar: i) si el incipiente desarrollo tumoral era necesario para que se produzca el subsiguiente ataque del sistema inmune, o si las células tumorales eran eliminadas antes de establecerse el tumor, ii) si la baja relación linfocitos : células tumorales observada sería mayor inmediatamente luego de la inoculación del tumor.

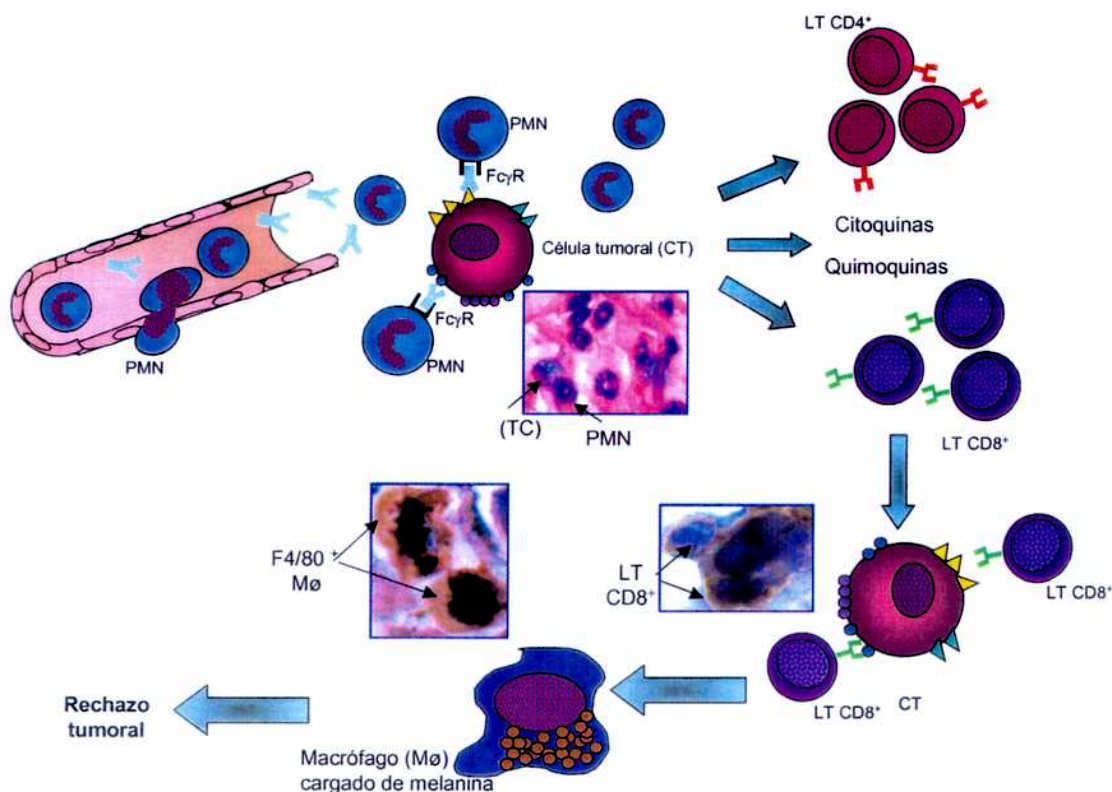
Para responder a dichos interrogantes, se realizó el estudio histológico del sitio de inyección a distintos tiempos luego del desafío tumoral, desde escasas horas hasta 32 días (**Figura 24**). En ningún momento se observó un alto aflujo de linfocitos. En cambio, se observó un sorprendente infiltrado de PMNs siendo máximo 6 días después del desafío tumoral (**Figura 24 F**). Luego de 18 días de inyectado el tumor, el infiltrado de PMNs disminuyó notoriamente y aparecieron los linfocitos en escena pero no se encontraron células tumorales (**Figura 24 H**). Transcurridos 32 días del desafío tumoral, se observaron abundantes macrófagos con melanina en su interior (**Figura 24 J**). Los PMNs son células efectoras fundamentales en la respuesta contra patógenos debido a la rápida movilización y liberación de enzimas degradativas como catepsina G, elastasa y lisozima, presentes en sus gránulos (201, 202). Además, debido a su capacidad de responder rápidamente al daño biológico, los PMNs son los primeros leucocitos en llegar al sitio de inflamación y una vez activados pueden actuar como inmunomoduladores a través de la secreción de factores como el factor de necrosis tumoral (TNF) α , IFN γ , IL-8, IL-12, MIP-1 α y MIP-1 β (203-207) (207-210), promoviendo el reclutamiento de más PMNs y la acumulación y activación de monocitos, linfocitos y macrófagos. Más aún, mediante la liberación de IL-12 los PMNs pueden modular el desarrollo de la respuesta específica de células T CD4⁺ hacia Th1, favoreciendo la respuesta de linfocitos T citotóxicos (209, 211-214). Estudios recientes demostraron que los PMNs acumulan IL-12 durante su proceso de maduración (215), permitiendo la rápida liberación de la citoquina al recibir la estimulación apropiada.

Conclusiones

Sobre la base de los resultados expuestos a lo largo del presente trabajo de Tesis, se puede proponer el siguiente modelo de rechazo tumoral inducido por la vacunación con CD-Apo:



En la fase inductora, las CD-Apo inyectadas migran desde la periferia hacia los ganglios linfáticos donde activan linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$, generando células T efectoras y de memoria. También se induce la producción de Ac dirigidos contra Ag tumorales regulada por la acción de citoquinas liberadas por los linfocitos colaboradores T $CD4^+$.



Durante la **fase efectora**, las células tumorales viables son opsonizadas por los Ac específicos, luego los primeros PMNs que llegan al sitio de inyección se unen a través de los receptores Fc γ a los Ac opsonizantes y son activados. Una vez activados, los PMNs liberan citoquinas / quimioquinas que reclutan nuevos PMNs y otras células efectoras, entre ellas los linfocitos. De esta forma, los PMNs además de ejercer una acción citotóxica directa sobre las células tumorales opsonizadas, actuarían confinando al tumor hasta la llegada de los linfocitos T específicos. Los linfocitos T CD4⁺ mediante la secreción de citoquinas favorecen la infiltración de linfocitos CD8⁺ y estimulan su función efectora. Por su parte, los linfocitos CD8⁺ son los responsables de la destrucción de las células tumorales mediante su acción citotóxica. Finalmente, los macrófagos podrían contribuir a eliminar las células tumorales remanentes.

CONCLUSIONES

El presente trabajo de Tesis se ha basado en la utilización de CD como adyuvantes para la inmunoterapia del cáncer, y en particular, en el desarrollo de una vacuna anti – melanoma. Para ello, se eligió como modelo experimental el melanoma murino B16 que por sus características – débilmente inmunogénico, rápida velocidad de crecimiento, alta capacidad metastásica – es un tumor contra el cual resulta particularmente difícil inducir una respuesta inmune adaptativa, situación representativa de muchos tumores humanos.

En primera instancia **se obtuvo una línea celular productora de GM-CSF murino** que resultó ser una herramienta fundamental para la generación *in vitro* de CD a partir de precursores de médula ósea, permitiendo obtener cultivos con alto rendimiento de CD y en forma reproducible.

Utilizando el GM-CSF presente en el sobrenadante de cultivo de las células transfectadas, **se generaron CD con características fenotípicas y funcionales correspondientes a las descritas para CD inmaduras:**

- Expresión uniforme de CD11c
- Baja expresión de las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40
- Baja expresión de moléculas MHC I
- Expresión heterogénea de moléculas MHC II, siendo mayoritaria la población MHC II^{low}
- Alta capacidad fagocítica y endocítica
- Alta capacidad migratoria en respuesta a estímulos quimiotácticos

La exposición a estímulos inflamatorios indujo **la maduración de CD con el consiguiente aumento en la expresión de moléculas MHC I y II, CD40, CD80 y CD86 y la adquisición de una potente capacidad estimuladora de linfocitos T.**

Además, las CD también fueron capaces de migrar hacia los ganglios linfáticos luego de ser inyectadas en forma s.c.

A raíz del éxito obtenido en la generación de CD potencialmente capaces de inducir una respuesta inmune primaria, se desarrolló una **vacuna anti – melanoma utilizando CD cargadas con células B16 apoptóticas (CD-Apo)**.

No todos los métodos de inducción de apoptosis determinan similares resultados. En este trabajo, la **irradiación y posterior cultivo de células B16 indujo alto porcentaje (70 – 80 %) de células apoptóticas que fueron eficientemente fagocitadas por CD inmaduras**.

El cocultivo con células apoptóticas, indujo un aumento en la expresión de MHC II y CD86 en una gran proporción de CD. La expresión aumentada de dichas moléculas se observó mayoritariamente en la población de CD que habían incorporado material apoptótico. **Las CD-Apo inyectadas en forma s.c. migraron hacia los ganglios linfáticos donde mostraron una expresión uniforme de MHC II y CD86 comparable a las CD maduras**.

La capacidad inmunizante de las CD-Apo fue asombrosa, ya que 80 % de los animales vacunados permanecieron libres de tumor 12 semanas luego del desafío tumoral. Por el contrario, ninguno de los grupos controles indujeron protección contra el desafío con células B16, incluyendo al grupo de animales que fue vacunado con CD cargadas con células B16 necróticas. Por lo tanto, se puede concluir que en este sistema **las células apoptóticas son mejor fuente de Ag que las necróticas para la vacunación con CD**.

Cuando los animales vacunados fueron desafiados con un tumor singeneico no relacionado todos desarrollaron tumor al cabo de dos semanas, indicando que **la vacunación con CD-Apo induce una respuesta anti – tumoral específica**.

Una característica fundamental de la respuesta inmune adaptativa es la memoria a largo plazo, atributo que fue evaluado en este sistema cuando los animales vacunados fueron desafiados 10 semanas después de la inmunización. Nuevamente, 80 % de los animales permanecieron libres de tumor, evidenciando que **la vacunación con CD-Apo induce memoria inmunológica**.

El estudio de los mecanismos involucrados en la respuesta anti – tumoral, demostró que **tanto los linfocitos T CD4⁺ como los CD8⁺ son necesarios para la efectiva vacunación con CD-Apo**, ya que la depleción *in vivo* de cualquiera de las dos subpoblaciones elimina completamente la protección contra el tumor. Además, estudios *in vitro* señalaron que **la vacunación con CD-Apo induce células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas, capaces de producir**

IFN γ . Más aún, mediante un ensayo de citotoxicidad *in vivo* se comprobó también la presencia de células con actividad citolítica específica contra Ag tumorales.

Por su parte, el estudio de la respuesta humoral evidenció la **presencia de Ac dirigidos contra las células B16, y los isotipos detectados se correlacionaron con un perfil mixto T_H 1 / T_H 2.**

El copioso infiltrado de PMNs observado en el sitio de inyección del tumor en los animales vacunados, podría indicar que los mismos juegan un rol importante en los pasos iniciales del rechazo tumoral. Los PMNs podrían actuar confinando al tumor hasta la llegada de las células efectoras específicas, ejerciendo una acción citotóxica directa mediada por Ac específicos y reclutando otras células efectoras, demostrando a su vez la estrecha relación que existe entre la respuesta inmune innata y la adaptativa.

Resumiendo, en el presente trabajo de Tesis se ha demostrado por primera vez, que la vacunación con CD cargadas con células tumorales apoptóticas (CD-Apo) induce inmunidad a largo plazo dependiente de la acción combinada de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ contra el melanoma B16 débilmente inmunogénico.

Teniendo en cuenta los mecanismos de escape a la vigilancia inmunológica que los tumores son capaces de desarrollar, para inducir una vacuna terapéutica efectiva probablemente sea necesario inducir una respuesta inmunológica multifactorial contra múltiples Ag tumorales. Por lo tanto, **el modelo preclínico desarrollado en este trabajo de Tesis provee el marco necesario para su extrapolación a estudios clínicos comparables utilizando CD-Apo para la inmunización activa contra el cáncer.**

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

1. Vogelstein, B., and K. W. Kinzler. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138.
2. Jimbow, K., S. K. Lee, M. G. King, H. Hara, H. Chen, J. Dakour, and H. Marusyk. 1993. Melanin pigments and melanosomal proteins as differentiation markers unique to normal and neoplastic melanocytes. *J Invest Dermatol* 100:259S.
3. Hsu, M. Y., F. Meier, and M. Herlyn. 2002. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation* 70:522.
4. Gilchrest, B. A., M. S. Eller, A. C. Geller, and M. Yaar. 1999. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 340:1341.
5. Paul, W. E. *Fundamental Immunology*. 4th edn. New York, Raven Press, 1998.
6. Janeway Charles W., P. T., Mark Walport and Mark Shlomchik. *Immunobiology*. 5th edn. New York, Garland Publishing, 2001.
7. Stites D.P., T. A. I. a. P. T. G. *Basic & Clinical Immunology*. 8 edn. Appleton & Lange, Paramount Publishing Group.
8. J, E. R. A. B. a. H. 1998. Innate immunity. *Curr.Opin. Immunol.* 10:9.
9. Fearon, D. T., and R. M. Locksley. 1996. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272:50.
10. Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142.
11. Banchereau, J., and R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245.
12. Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y.-J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767.
13. Ardavin, C. 2003. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 3:582.
14. Shortman, K., and Y.-J. Liu. 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151.
15. Hochrein, H., K. Shortman, D. Vremec, B. Scott, P. Hertzog, and M. O'Keeffe. 2001. Differential production of IL-12, IFN- α , and IFN- γ by mouse dendritic cell subsets. *J. Immunol.* 166:5448.
16. Martin, P., G. M. del Hoyo, F. Anjuere, S. R. Ruiz, C. F. Arias, A. R. Marin, and C. Ardavin. 2000. Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8 α (-) and CD8 α (+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors [In Process Citation]. *Blood* 96:2511.

17. Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, M. Dalod, I. Durand, N. Yessaad, C. Dezutter-Dambuyant, A. Vicari, A. O'Garra, C. Biron, F. Briere, and G. Trinchieri. 2001. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol.* 2:1144.
18. Martin, P., G. M. Del Hoyo, F. Anjuere, C. F. Arias, H. H. Vargas, L. A. Fernandez, V. Parrillas, and C. Ardavin. 2002. Characterization of a new subpopulation of mouse CD8alpha(+) B220(+) dendritic cells endowed with type 1 interferon production capacity and tolerogenic potential. *Blood* 100:383.
19. Julia, V., E. M. Hessel, L. Malherbe, N. Glaichenhaus, A. O'Garra, and R. L. Coffman. 2002. A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16:271.
20. Hart, D. N. J. 1997. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245.
21. Akbari, O., R. H. DeKruyff, and D. T. Umetsu. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* 2:725.
22. Sallusto, F., and A. Lanzavecchia. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* 179:1109.
23. Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman, and W. A. Muller. 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity* 11:753.
24. Manz, M. G., D. Traver, T. Miyamoto, I. L. Weissman, and K. Akashi. 2001. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97:3333.
25. Balazs, M., F. Martin, T. Zhou, and J. F. Kearney. 2002. Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* 17:341.
26. Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Maeda, K. Takahara, Y. Akiyama, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* 195:1289.
27. Maldonado- Lopez, R., T. De Smedt, P. Michel, J. Godfroid, B. Pajak, C. Heirman, K. Thielemans, O. Leo, J. Urbain, and M. Moser. 1999. CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo. *J. Exp. Med.* 189:587.
28. Maldonado-Lopez, R., C. Maliszewski, J. Urbain, and M. Moser. 2001. Cytokines regulate the capacity of CD8 α ⁺ and CD8 α ⁻ dendritic cells to prime Th1/Th2 cells in vivo. *J. Immunol.* 167:4345.
29. Boonstra, A., C. Asselin-Paturel, M. Gilliet, C. Crain, G. Trinchieri, Y.-J. Liu, and A. O'Garra. 2003. Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J. Exp. Med.* 197:1.
30. Manickasingham, S. P. 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur. J. Immunol.* 33:101.
31. Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, M. C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. CD40 Ligand and CTLA-4 Are Reciprocally Regulated in the Th1 Cell Proliferative Response Sustained by CD8(+) Dendritic Cells. *J Immunol* 169:1182.

32. Bröcker, T., and K. Karjalainen. 1997. Targeted expression of MHC class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but no positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 185:541.
33. Kyewski, B. A., C. G. Fathman, and R. V. Rouse. 1986. Intrathymic presentation of circulating non-MHC antigens by medullary dendritic cells. An antigen-dependent microenvironment for T cell differentiation. *J. Exp. Med.* 163:231.
34. Inaba, K., M. Pack, M. Inaba, H. Sakuta, F. Isdell, and R. M. Steinman. 1997. High levels of a major histocompatibility complex II - self peptide complex on dendritic cells from lymph node. *J. Exp. Med.* 186:665.
35. Finkelman, F. D., A. Lees, R. Birnbaum, W. C. Gause, and S. C. Morris. 1996. Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion. *J. Immunol.* 157:1406.
36. Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, K. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194:769.
37. Fujii, S., K. Shimizu, M. Kronenberg, and R. M. Steinman. 2002. Prolonged interferon- γ producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded dendritic cells. *Nat. Immunol.* 3:867.
38. Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz. 2002. Human dendritic cells activate resting NK cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med.* 195:343.
39. Fernandez, N. C., A. Lozier, C. Flament, P. Ricciardi-Castagnoli, D. Bellet, M. Suter, M. Perricaudet, T. Tursz, E. Maraskovsky, and L. Zitvogel. 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5:405.
40. Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri. 2002. Reciprocal activating interaction between Natural Killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:327.
41. Slepnev, V. I., and P. De Camilli. 2000. Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161.
42. Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type 1 [CD64] and type 11 [CD32] Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J. Immunol.* 157:541.
43. Esposito-Farese, M. E., C. Sautes, H. de la Salle, S. Latour, T. Bieber, C. de la Salle, P. Ohlmann, W. H. Fridman, J. P. Cazenave, J. L. Teillaud, and et al. 1995. Membrane and soluble Fc gamma RII/III modulate the antigen-presenting capacity of murine dendritic epidermal Langerhans cells for IgG-complexed antigens. *J Immunol* 155:1725.
44. Reis e Sousa, C., P. D. Stahl, and J. M. Austyn. 1993. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509.
45. Basu, S., R. J. Binder, T. Ramalingam, and P. K. Srivastava. 2001. CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14:303.
46. Nakamura, K., H. Funakoshi, K. Miyamoto, F. Tokunaga, and T. Nakamura. 2001. Molecular cloning and functional characterization of a human scavenger receptor with C-type lectin (SRCL), a novel member of a scavenger receptor family. *Biochem Biophys Res Commun* 280:1028.

47. Platt, N., R. P. da Silva, and S. Gordon. 1998. Recognising death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends in Cell Biol.* 8:365.
48. Platt, N., and R. Haworth. 1999. *Scavenger receptors and phagocytosis of bacteria and apoptotic cells*. JAI Press Inc., Stanford, CT.
49. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen in the major histocompatibility class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389.
50. Jiang, W., W. J. Swiggard, C. Heufler, M. Peng, A. Mirza, R. M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151.
51. Ezekowitz, R. A. B., D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. K. Armstrong, A. Warner, F. F. Richards, and R. M. Rose. 1991. Uptake of pneumocystis carinii mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155.
52. Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 151:673.
53. Valladeau, J., O. Ravel, C. Dezutter-Dambuyant, K. Moore, M. Kleijmeer, Y. Liu, V. Duvert-Frances, C. Vincent, D. Schmitt, J. Davoust, C. Caux, S. Lebecque, and S. Saeland. 2000. Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71.
54. Geijtenbeek, T. B. H., R. Torensma, S. J. van Vliet, G. C. F. van Duijnhoven, G. J. Adema, Y. van Kooyk, and C. G. Figdor. 2000. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575.
55. Bell, D., J. W. Young, and J. Banchereau. 1999. Dendritic cells. *Adv. Immunol.* 72:255.
56. Rescigno, M., M. Urbano, B. Valzasina, M. Francolini, G. Rotta, R. Bonasio, F. Granucci, J. P. Kraehenbuhl, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat. Immunol.* 2:361.
57. d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, A. Mencacci, P. Ricciardi-Castagnoli, and L. Romani. 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191:1661.
58. Gorak, P. M. A., C. R. Engwerda, and P. M. Kaye. 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. *Eur. J. Immunol.* 28:687.
59. Konecny, P., A. J. Stagg, H. Jebbari, N. English, R. N. Davidson, and S. C. Knight. 1999. Murine dendritic cells internalize *Leishmania* major promastigotes, produce IL-12 p40 and stimulate primary T cell proliferation in vitro. *Eur J Immunol* 29:1803.
60. Subklewe, M., C. Paludan, M. L. Tsang, R. M. Steinman, and C. Münz. 2001. Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr Virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8⁺ killer T cells. *J. Exp. Med.* 193:405.
61. Albert, M. L., B. Sauter, and N. Bhardwaj. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86.

62. Shaif-Muthana, M., C. McIntyre, K. Sisley, I. Rennie, and A. Murray. 2000. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res* 60:6441.
63. Russo, V., S. Tanzarella, P. Dalerba, D. Rigatti, P. Rovere, A. Villa, C. Bordignon, and C. Traversari. 2000. Dendritic cells acquire the Mage-3 human tumor antigen from apoptotic cells and induce a class I-restricted T cell response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:2185.
64. Berard, F., P. Blanco, J. Davoust, E.-M. Neidhart-Berard, M. Nouri-Shirazi, N. Taquet, D. Rimoldi, J. C. Cerottini, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2000. Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J. Exp. Med.* 192:1535.
65. Sauter, B., M. L. Albert, L. Francisco, M. Larsson, S. Somersan, and N. Bhardwaj. 2000. Consequences of cell death. Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med.* 191:423.
66. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 5:1249.
67. Albert, M. L., S. F. A. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha_v\beta_5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359.
68. Albert, M. L., J. I. Kim, and R. B. Birge. 2000. $\alpha_v\beta_5$ integrin recruits the CrkII-Dock180-rac1 complex for phagocytosis of apoptotic cells. *Nat Cell Biol* 2:899.
69. Scott, R. S., E. J. McMahon, S. M. Pop, E. A. Reap, R. Caricchio, P. L. Cohen, H. S. Earp, and G. K. Matsushima. 2001. Phagocytosis and clearance of apoptotic cells is mediated by MER. *Nature* 411:207.
70. Fadok, V. A., D. L. Bratton, D. M. Rose, A. Pearson, R. A. Ezekewitz, and P. M. Henson. 2000. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405:85.
71. Medzhitov, R., and C. Janeway, Jr. 2000. Innate immunity. *N Engl J Med* 343:338.
72. Kalinski, P., C. M. Hilkens, E. A. Wierenga, and M. L. Kapsenberg. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol. Today* 20:561.
73. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J. Exp. Med.* 180:1263.
74. Rescigno, M., V. Piguet, B. Valzasina, S. Lens, R. Zubler, L. French, V. Kindler, J. Tschopp, and P. Ricciardi-Castagnoli. 2000. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1 β , and the production of interferon in the absence of IL-12 during DC-T Cell cognate interaction. A new role for fas ligand in inflammatory responses. *J. Exp. Med.* 192:1661.
75. Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena. 1999. Fc γ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371.
76. Geissmann, F., P. Launay, B. Pasquier, Y. Lepelletier, M. Leborgne, A. Lehen, N. Brousse, and R. C. Monteiro. 2001. A subset of human dendritic cells expresses IgA Fc receptor

- (CD89), which mediates internalization and activation upon cross-linking by IgA complexes. *J. Immunol.* 166:346.
77. Jurgens, M., A. Wollenberg, D. Hanau, H. de la Salle, and T. Bieber. 1995. Activation of human epidermal Langerhans cells by engagement of the high affinity receptor for IgE, FcεR1. *J. Immunol.* 155:5184.
 78. Allavena, P., W. Luini, R. Bonecchi, G. D'Amico, G. Bianchi, D. Longoni, A. Vecchi, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1999. Chemokines and chemokine receptors in the regulation of dendritic cell trafficking. *Chem Immunol* 72:69.
 79. Sozzani, S., P. Allavena, A. Vecchi, and A. Mantovani. 1999. The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. *J. Leuk. Biol.* 66:1.
 80. Gallucci, S., and P. Matzinger. 2001. Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol* 13:114.
 81. Sozzani, S., P. Allavena, G. D'Amico, W. Luini, G. Bianchi, M. Kataura, T. Imai, O. Yoshie, R. Bonecchi, and A. Mantovani. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083.
 82. Vecchi, A., L. Massimiliano, S. Ramponi, W. Luini, S. Bernasconi, R. Bonecchi, P. Allavena, M. Parmentier, A. Mantovani, and S. Sozzani. 1999. Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 66:489.
 83. Sozzani, S., F. Sallusto, W. Luini, D. Zhou, L. Peimonti, P. Allavena, J. van Damme, S. Salitutti, A. Lanzavecchia, and A. Mantovani. 1995. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* 155:3292.
 84. Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191:411.
 85. Huang, F.-P., N. Platt, M. Wykes, J. R. Major, T. J. Powell, C. D. Jenkins, and G. G. MacPherson. 2000. A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J. Exp. Med.* 191:435.
 86. Aliberti, J., S. Hieny, E. S. C. Reis, C. N. Serhan, and A. Sher. 2002. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat. Immunol.* 3:76.
 87. Robbiani, D. F., R. A. Finch, D. Jaeger, W. A. Muller, A. C. Sartorelli, and G. J. Randolph. 2000. The leukotriene C4 transporter MRP1 regulates CCL19 (MIP-3β, ELC)-dependent mobilization of dendritic cells to lymph nodes. *Cell* 103:757.
 88. Luft, T., M. Jefford, P. Luetjens, T. Toy, H. Hochrein, K. A. Masterman, C. Maliszewski, K. Shortman, J. Cebon, and E. Maraskovsky. 2002. Functionally distinct dendritic cell (DC) populations induced by physiologic stimuli: prostaglandin E(2) regulates the migratory capacity of specific DC subsets. *Blood* 100:1362.
 89. Rescigno, M., S. Citterio, C. Thery, M. Rittig, D. Medaglini, G. Pozzi, S. Amigorena, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1998. Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class I molecules in mouse dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5229.
 90. Yewdell, J. W., C. C. Norbury, and J. R. Bennink. 1999. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73:1.

91. Watts, C. 1997. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 15:821.
92. Binder, R. J., N. E. Blachere, and P. K. Srivastava. 2001. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol Chem* 276:17163.
93. Singh-Jasuja, H., R. E. Toes, P. Spee, C. Munz, N. Hilf, S. P. Schoenberger, P. Ricciardi-Castagnoli, J. Neefjes, H. G. Rammensee, D. Arnold-Schild, and H. Schild. 2000. Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J Exp Med* 191:1965.
94. Haicheur, N., E. Bismuth, S. Bosset, O. Adotevi, G. Warnier, V. Lacabanne, A. Regnault, C. Desaynard, S. Amigorena, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Goud, W. H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour. 2000. The B subunit of shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J. Immunol.* 165:3301.
95. Guernonprez, P., N. Khelef, E. Blouin, P. Rieu, P. Ricciardi-Castagnoli, N. Guiso, D. Ladant, and C. Leclerc. 2001. The adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* binds to target cells via the $\alpha(M)\beta(2)$ integrin (CD11b/CD18). *J Exp Med* 193:1035.
96. Machy, P., K. Serre, and L. Leserman. 2000. Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fc γ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30:848.
97. Rovere, P., M. G. Sabbadini, C. Vallinoto, U. Fascio, M. Recigno, M. Crosti, P. Ricciardi-Castagnoli, G. Balestrieri, A. Tincani, and A. A. Manfredi. 1999. Dendritic cell presentation of antigens from apoptotic cells in a proinflammatory context: role of opsonizing anti-beta2-glycoprotein I antibodies. *Arthritis Rheum* 42:1412.
98. Wallace, P. K., K. Y. Tsang, J. Goldstein, P. Correale, T. M. Jarry, J. Schlom, P. M. Guyre, M. S. Ernstoff, and M. W. Fanger. 2001. Exogenous antigen targeted to Fc γ RI on myeloid cells is presented in association with MHC class I. *J. Immunol. Meth.* 248:183.
99. Cella, M., A. Engering, V. Pinet, J. Pieters, and A. Lanzavecchia. 1997. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782.
100. Villadangos, J. A., M. Cardoso, R. J. Steptoe, D. van Berkel, J. Pooley, F. R. Carbone, and K. Shortman. 2001. MHC class II expression is regulated in dendritic cells independently of invariant chain degradation. *Immunity* 14:739.
101. Askew, D., R. S. Chu, A. M. Krieg, and C. V. Harding. 2000. CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. *J. Immunol.* 165:6889.
102. Porcelli, S. A., and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu. Rev. Immunol.* 17:297.
103. Soumelis, V., P. A. Reche, H. Kanzler, W. Yuan, G. Edward, B. Homey, M. Gilliet, H. S., S. Antonenko, A. Lauerma, K. Smith, D. Gorman, S. Zurawski, J. Abrams, S. Menon, T. McClanahan, R. de Waal-Malefyt, F. Bazan, R. A. Kastelein, and Y.-J. Liu. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell-mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol.* 3:673.
104. Blanco, P., A. K. Palucka, M. Gill, V. Pascual, and J. Banchereau. 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540.

105. Steinman, R. M., and M. Pope. 2002. Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J. Clin. Invest.* 109:1519.
106. Zitvogel, L., E. Angevin, and T. Tursz. 2000. Dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Ann Oncol* 11 Suppl 3:199.
107. Hsu, F. J., C. Benike, F. Fagnoni, T. M. Liles, D. Czerwinski, B. Taidi, E. G. Engleman, and R. Levy. 1996. Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 2:52.
108. Nestle, F. O., S. Alijagic, M. Gilliet, Y. Sun, S. Grabbe, R. Dummer, G. Burg, and D. Schadendorf. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide-or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328.
109. Thurner, B., I. Haendle, C. Roder, D. Dieckmann, P. Keikavoussi, H. Jonuleit, A. Bender, C. Maczek, D. Schreiner, P. von den Driesch, E. B. Brocker, R. M. Steinman, A. Enk, E. Kampgen, and G. Schuler. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190:1669.
110. Banchereau, J., A. K. Palucka, M. Dhodapkar, S. Burkeholder, N. Taquet, A. Rolland, S. Taquet, S. Coquery, K. Wittkowski, N. Bhardwaj, L. Pineiro, R. M. Steinman, and J. Fay. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34⁺ progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res.* 61:6451.
111. Small, E. J., P. Fratesi, D. M. Reese, G. Strang, R. Laus, M. V. Peshwa, and F. H. Valone. 2000. Immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer with antigen-loaded dendritic cells. *J. Clin. Oncol.* 18:3894.
112. Timmerman, J. M., D. K. Czerwinski, T. A. Davis, F. J. Hsu, C. Benike, Z. M. Hao, B. Taidi, R. Rajapaksa, C. B. Caspar, C. Y. Okada, A. van Beckhoven, T. M. Liles, E. G. Engleman, and R. Levy. 2002. Idiotypic-pulsed dendritic cell vaccination for B-cell lymphoma: clinical and immune responses in 35 patients. *Blood* 99:1517.
113. Fidler, I. J., and G. L. Nicolson. 1978. Tumor cell and host properties affecting the implantation and survival of blood-borne metastatic variants of B16 melanoma. *Isr J Med Sci* 14:38.
114. Shevach, E. M., J. D. Stobo, and I. Green. 1972. Immunoglobulin and theta-bearing murine leukemias and lymphomas. *J Immunol* 108:1146.
115. Puck, T. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108:945.
116. Wilde, D. B., P. Marrack, J. Kappler, D. P. Dialynas, and F. W. Fitch. 1983. Evidence implicating L3T4 in class II MHC antigen reactivity; monoclonal antibody GK1.5 (anti-L3T4a) blocks class II MHC antigen-specific proliferation, release of lymphokines, and binding by cloned murine helper T lymphocyte lines. *J Immunol* 131:2178.
117. Ledbetter, J. A., and L. A. Herzenberg. 1979. Xenogeneic monoclonal antibodies against mouse lymphocyte differentiation antigens. *Immunol.Rev.* 47:63.
118. Lutz, M. B., N. Kukutsch, A. L. J. Ogilvie, S. RoBner, F. Koch, N. Romani, and G. Schuler. 1999. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol.Meth.* 223:77.
119. Chen, T. R. 1977. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent hoechst 33258 stain. *Exp.Cell.Res.* 104:255.

120. Chen, C., and H. Okayama. 1987. High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7:2745.
121. Baron, S., J. Poast, D. Rizzo, E. McFarland, and E. Kieff. 2000. Electroporation of antibodies, DNA, and other macromolecules into cells: a highly efficient method. *J. Immunol. Methods* 242:115.
122. Steinman, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271.
123. Thery, C., and S. Amigorena. 2001. The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13:145.
124. Ortner, U., K. Inaba, F. Koch, M. Heine, M. Miwa, G. Schuler, and N. Romani. 1996. An improved method to obtain murine migratory cutaneous dendritic cells. *J. Immunol. Meth.* 193:71.
125. Inaba, K., Swiggard W.J., Steinman R.M., Romani N. and Schuler G. 1998. Isolation of dendritic cells. *Curr Protocols Immunol*:3.7.1.
126. Vremec, D., M. Zorbas, R. Scollay, D. J. Saunders, C. F. Ardavin, L. Wu, and K. Shortman. 1992. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 176:47.
127. Inaba, K., R. M. Steinman, M. Witmer-Pack, H. Aya, M. Inaba, T. Sudo, S. Wolpe, and G. Schuler. 1992. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J. Exp. Med.* 175:1157.
128. Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, and R. M. Steinman. 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176:1693.
129. Metcalf, D. 1989. The molecular control of cell division differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature (London)* 339:27.
130. Josien, R., H.-L. Hi, E. Ingulli, S. Sarma, B. R. Wong, M. Vologodskaya, R. M. Steinman, and Y. Choi. 2000. TRANCE, a tumor necrosis family member, enhances the longevity and adjuvant properties of dendritic cells in vivo. *J. Exp. Med.* 191:495.
131. Nestle, F. O., J. Banchereau, and D. Hart. 2001. Dendritic cells: On the move from bench to bedside. *Nat. Med.* 7:761.
132. Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, A. K. Palucka, and G. Schuler. 2001. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 106:271.
133. Haddad, D., J. Ramprakash, M. Sedegah, Y. Charoenvit, R. Baumgartner, S. Kumar, S. L. Hoffman, and W. R. Weiss. 2000. Plasmid vaccine expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor attracts infiltrates including immature dendritic cells into injected muscles. *J. Immunol.* 165:3772.
134. Lopez, A. F., N. A. Nicola, A. W. Burgess, D. Metcalf, F. L. Battye, W. A. Sewell, and M. Vadas. 1983. Activation of granulocyte cytotoxic function by purified mouse colony-stimulating factors. *J Immunol* 131:2983.
135. Diament, M. J., M. I. Stillitani, L. Puricelli, E. Bal de Kier-Joffe, and S. Klein. 2003. GM-CSF secreted by murine adenocarcinoma cells modulates tumor progression and immune activity. *Oncol Rep* 10:1647.

136. Lukashenko, P. V., T. M. Lukashenko, Savanovich, II, D. B. Sandakov, and V. Gerein. 2004. Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Regulates Activity of the Nervous System. *Neuroimmunomodulation* 11:36.
137. Foti, M., F. Granucci, D. Aggularo, E. Liboi, W. Luini, S. Minardi, A. Mantovani, S. Sozzani, and P. Ricciardi-Castagnoli. 1999. Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. *Int Immunol* 11:979.
138. Dieu, M.-C., B. Vanbervliet, A. Vicari, J.-M. Bridon, E. Oldham, S. Ait-Yahia, F. Briere, A. Zlotnik, S. Lebecque, and C. Caux. 1998. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp. Med.* 188:373.
139. Steinman, R. M., B. Gutchinov, M. D. Witmer, and M. C. Nussenzweig. 1983. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *J. Exp. Med.* 157:613.
140. Greenlee, R. T., T. Murray, S. Bolden, and P. A. Wingo. 2000. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J. Clin.* 50:7.
141. Morvillo, V., L. Bover, and J. Mordoh. 1996. Identification and characterization of a 14 kDa immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-J, a human melanoma cell line. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 42:779.
142. Gabrilovich, D. I., H. I. Chen, K. R. Girgis, H. T. Cunningham, G. M. Meny, S. Nadaf, D. Kavanaugh, and D. P. Carbone. 1996. Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat. Med.* 2:1096.
143. Garrido, F., T. Cabrera, A. Concha, S. Glew, F. Ruiz-Cabello, and P. L. Stern. 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491.
144. Schwartz, R. H. 1992. Costimulation of T lymphocytes: The role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 71:1065.
145. Timmerman, J. M., and R. Levy. 1999. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 50:507.
146. Fong, L., and E. G. Engleman. 2000. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18:245.
147. Schuler, G., B. Schuler-Thurner, and R. M. Steinman. 2003. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* 15:138.
148. Reid, S. D., G. Penna, and L. Adorini. 2000. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12:114.
149. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2001. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 106:263.
150. Guernonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621.
151. Dhodapkar, M., R. M. Steinman, M. Sapp, H. Desai, C. Fossella, J. Krasovsky, S. M. Donahoe, P. R. Dunbar, V. Cerundolo, D. F. Nixon, and N. Bhardwaj. 1999. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.* 104:173.

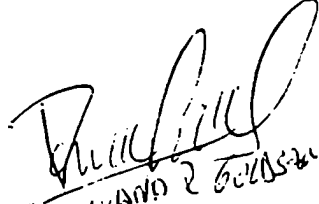
152. Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky, R. M. Steinman, and N. Bhardwaj. 2000. Mature dendritic cells boost functionally superior T cells in humans without foreign helper epitopes. *J. Clin. Invest.* 105:R9.
153. Schuler-Thurner, B., E. S. Schultz, T. G. Berger, G. Weinlich, S. Ebner, P. Woerl, A. Bender, B. Feuerstein, P. O. Fritsch, N. Romani, and G. Schuler. 2002. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:1279.
154. Schuler-Thurner, B., D. Dieckmann, P. Keikavoussi, A. Bender, C. Maczek, H. Jonuleit, C. Roder, I. Haendle, W. Leisgang, R. Dunbar, V. Cerundolo, P. von Den Driesch, J. Knop, E. B. Brocker, A. Enk, E. Kämpgen, and G. Schuler. 2000. Mage-3 and influenza-matrix peptide-specific cytotoxic T cells are inducible in terminal stage HLA-A.2.1⁺ melanoma patients by mature monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* 165:3492.
155. Zitvogel, L., J. I. Mayordomo, T. Tjandrawan, A. B. DeLeo, M. R. Clarke, M. T. Lotze, and W. J. Storkus. 1996. Therapy of murine tumors with tumor peptide pulsed dendritic cells: dependence on T-cells, B7 costimulation, and Th1-associated cytokines. *J. Exp. Med.* 183:87.
156. Boczkowski, D., S. K. Nair, D. Snyder, and E. Gilboa. 1996. Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 184:465.
157. Nair, S. K., A. Heiser, D. Boczkowski, A. Majumdar, M. Naoe, J. S. Lebkowski, J. Vieweg, and E. Gilboa. 2000. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat. Med.* 6:1011.
158. Fields, R. C., K. Shimizu, and J. J. Mule. 1998. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:9482.
159. Wolfers, J., A. Lozier, G. Raposo, A. Regnault, C. Thery, C. Masurier, C. Flament, S. Pouzieux, F. Faure, T. Tursz, E. Angevin, S. Amigorena, and L. Zitvogel. 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 7:297.
160. Hoffmann, T. K., N. Meidenbauer, G. Dworacki, H. Kanaya, and T. L. Whiteside. 2000. Generation of tumor-specific T lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells. *Cancer Res.* 60:3542.
161. Paczesny, S., S. Beranger, J. L. Salzman, D. Klatzmann, and B. M. Colombo. 2001. Protection of mice against leukemia after vaccination with bone marrow-derived dendritic cells loaded with apoptotic leukemia cells. *Cancer Res* 61:2386.
162. Ronchetti, A., P. Rovere, G. Iezzi, G. Galati, S. Heltai, M. P. Protti, M. P. Garancini, A. A. Manfredi, C. Rugarli, and M. Bellone. 1999. Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J. Immunol.* 163:130.
163. Inaba, K., S. Turley, F. Yamaide, T. Iyoda, K. Mahnke, M. Inaba, M. Pack, M. Subklewe, B. Sauter, D. Sheff, M. Albert, N. Bhardwaj, I. Mellman, and R. M. Steinman. 1998. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the MHC class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 188:2163.
164. Dhodapkar, K. M., J. Krasovsky, B. Williamson, and M. V. Dhodapkar. 2002. Anti-tumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:125.

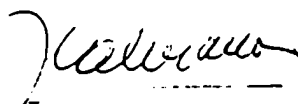
165. Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky, and K. Olson. 2002. T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:13009.
166. Wang, H. Y., T. Fu, G. Wang, G. Zeng, D. M. Perry-Lalley, J. C. Yang, N. P. Restifo, P. Hwu, and R. F. Wang. 2002. Induction of CD4⁺ T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest* 109:1463.
167. Shibagaki, N., and M. C. Udey. 2003. Dendritic cells transduced with TAT protein transduction domain-containing tyrosinase-related protein 2 vaccinate against murine melanoma. *Eur J Immunol* 33:850.
168. Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll, and D. Levitsky. 1998. The central role of CD4⁺ T cells in the antitumor immune response. *J. Exp. Med.* 188:2357.
169. Ochsenbein, A. F., S. Sierro, B. Odermatt, M. Pericin, U. Karrer, J. Hermans, S. Hemmi, H. Hengartner, and R. M. Zinkernagel. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411:1058.
170. Kerr, J. F. R., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26:239.
171. Zitvogel, L. 2002. Dendritic and natural killer cells cooperate in the control/switch of innate immunity. *J. Exp. Med.* 195:F9.
172. Stober, D., I. Jomantaite, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 2003. NKT cells provide help for dendritic cell-dependent priming of MHC class I-restricted CD8⁺ T cells in vivo. *J. Immunol.* 170:2540.
173. Schnell, S., J. W. Young, A. N. Houghton, and M. Sadelain. 2000. Retrovirally transduced mouse dendritic cells require CD4⁺ T cell help to elicit antitumor immunity: implications for the clinical use of dendritic cells. *J. Immunol.* 164:1243.
174. Kotera, Y., K. Shimizu, and J. J. Mule. 2001. Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization. *Cancer Res* 61:8105.
175. Chen, Z., T. Moyana, A. Saxena, R. Warrington, Z. Jia, and J. Xiang. 2001. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 93:539.
176. Rovere, P., C. Vallinoto, A. Bondanza, M. C. Crosti, M. Rescigno, P. Ricciardi-Castagnoli, C. Rugarli, and A. A. Manfredi. 1998. Bystander apoptosis triggers dendritic cell maturation and antigen-presenting function. *J. Immunol.* 161:4467.
177. Shimizu, K., E. K. Thomas, M. Giedlin, and J. J. Mule. 2001. Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein. *Cancer Res* 61:2618.
178. Strome, S. E., S. Voss, R. Wilcox, T. L. Wakefield, K. Tamada, D. Flies, A. Chapoval, J. Lu, J. L. Kasperbauer, D. Padley, R. Vile, D. Gastineau, P. Wettstein, and L. Chen. 2002. Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response. *Cancer Res* 62:1884.
179. Schnurr, M., C. Scholz, S. Rothenfusser, P. Galambos, M. Dauer, J. Robe, S. Endres, and A. Eigler. 2002. Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and $\gamma\delta$ T cells. *Cancer Res* 62:2347.

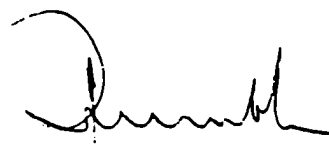
180. Wang, R.-F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang, and S. A. Rosenberg. 1996. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 184:2207.
181. Parkhurst, M. R., E. B. Fitzgerald, S. Southwood, A. Sette, S. A. Rosenberg, and Y. Kawakami. 1998. Identification of a shared HLA-A*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). *Cancer Res* 58:4895.
182. Bloom, M. B., D. Perry-Lalley, P. F. Robbins, Y. Li, M. El-Gamil, S. A. Rosenberg, and J. C. Yang. 1997. Identification of tyrosinase-related protein 2 as a tumor rejection antigen for the B16 melanoma. *J. Exp. Med.* 185:453.
183. Bowne, W. B., R. Srinivasan, J. D. Wolchok, W. G. Hawkins, N. E. Blachere, R. Dylla, J. J. Lewis, and A. N. Houghton. 1999. Coupling and uncoupling of tumor immunity and autoimmunity. *J. Exp. Med.* 190:1717.
184. Inaba, K., R. M. Steinman, W. C. Van Voorhis, and S. Muramatsu. 1983. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6041.
185. Fayette, J., B. Dubois, S. Vandenabelle, J.-M. Bridon, B. Vanbervliet, I. Durand, J. Banchereau, C. Caux, and F. Briere. 1997. Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J. Exp. Med.* 185:1909.
186. Wykes, M., and G. MacPherson. 2000. Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunol.* 100:1.
187. Litinskiy, M. B., B. Nardelli, D. M. Hilbert, B. He, A. Schaffer, P. Casali, and A. Cerutti. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat. Immunol.* 3:822.
188. Colino, J., Y. Shen, and C. M. Snapper. 2001. Dendritic cells pulsed with intact *Streptococcus pneumoniae* elicit both protein- and polysaccharide-specific immunoglobulin isotype responses in vivo through distinct mechanisms. *J. Exp. Med.* 195:1.
189. Vincent, M. S., D. S. Leslie, J. E. Gumperz, X. Xiong, E. P. Grant, and M. B. Brenner. 2002. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat. Immunol.* 3:1163.
190. Bohm, W., S. Thoma, F. Leithauser, P. Moller, R. Schirmbeck, and J. Reimann. 1998. T cell-mediated, IFN- γ -facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol* 161:897.
191. Weber, J. S., and S. A. Rosenberg. 1988. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigens by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res* 48:5818.
192. Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old, and R. D. Schreiber. 1998. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:7556.
193. Ossendorp, F., E. Mengede, M. Camps, R. Filius, and C. J. M. Melief. 1998. Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J. Exp. Med.* 187:693.
194. Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber, and H. Schreiber. 1999. CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN- γ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:8633.

195. Marzo, A. L., B. F. Kinnear, R. A. Lake, J. J. Frelinger, E. J. Collins, B. W. Robinson, and B. Scott. 2000. Tumor-specific CD4⁺ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165:6047.
196. Stohlman, S. A., C. C. Bergmann, M. T. Lin, D. J. Cua, and D. R. Hinton. 1998. CTL effector function within the central nervous system requires CD4⁺ T cells. *J Immunol* 160:2896.
197. Rammensee, H., J. Bachmann, N. P. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50:213.
198. Barclay, A. N., M. L. Birkeland, M. H. Brown, A. D. Beyers, S. J. Davis, C. Somoza, and A. F. Williams. 1993. *The Leukocyte Antigen FactsBook*. Academic Press, San Diego, CA.
199. Fremont, D. H., W. A. Hendrickson, P. Marrack, and J. Kappler. 1996. Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides. *Science* 272:1001.
200. Reinherz, E. L., K. Tan, L. Tang, P. Kern, J. Liu, Y. Xiong, R. E. Hussey, A. Smolyar, B. Hare, R. Zhang, A. Joachimiak, H. C. Chang, G. Wagner, and J. Wang. 1999. The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* 286:1913.
201. Lehrer, R. I., and T. Ganz. 1990. Antimicrobial polypeptides of human neutrophils. *Blood* 76:2169.
202. Tapper, H. 1996. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. *J Leukoc Biol* 59:613.
203. Anderson, K. L., K. A. Smith, F. Pio, B. E. Torbett, and R. A. Maki. 1998. Neutrophils deficient in PU.1 do not terminally differentiate or become functionally competent. *Blood* 92:1576.
204. Rogers, H. W., and E. R. Unanue. 1993. Neutrophils are involved in acute, nonspecific resistance to *Listeria monocytogenes* in mice. *Infect Immun* 61:5090.
205. Conlan, J. W., and R. J. North. 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cells as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J Exp Med* 174:741.
206. Conlan, J. W., and R. J. North. 1994. Neutrophils are essential for early anti-*Listeria* defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J. Exp. Med.* 179:259.
207. Bliss, S. K., Y. Zhang, and E. Y. Denkers. 1999. Murine neutrophil stimulation by *Toxoplasma gondii* antigen drives high level production of IFN-gamma-independent IL-12. *J Immunol* 163:2081.
208. Cassatella, M. A. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 16:21.
209. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, G. Del Sero, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4⁺ T helper subset selection in mice with candidiasis. *J Immunol* 158:2356.
210. Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, G. Del Sero, I. Nicoletti, G. Trinchieri, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. Neutrophil production of IL-12 and IL-10 in candidiasis and efficacy of IL-12 therapy in neutropenic mice. *J Immunol* 158:5349.
211. Trinchieri, G. 1994. Interleukin-12: A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 84:4008.

212. Trinchieri, G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251.
213. Trinchieri, G. 1998. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int Rev Immunol* 16:365.
214. Tateda, K., T. A. Moore, J. C. Deng, M. W. Newstead, X. Zeng, A. Matsukawa, M. S. Swanson, K. Yamaguchi, and T. J. Standiford. 2001. Early recruitment of neutrophils determines subsequent T1/T2 host responses in a murine model of *Legionella pneumophila* pneumonia. *J Immunol* 166:3355.
215. Bliss, S. K., B. A. Butcher, and E. Y. Denkers. 2000. Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection. *J Immunol* 165:4515.


SILVIO R. BORSARI






Abreviaturas

ABREVIATURAS

Ac	anticuerpo
Ag	antígeno
ADCC	citotoxicidad dependiente de anticuerpos
APC	célula presentadora de antígenos
BSA	seroalbúmina bovina
CD	células dendrítica
cpm	cuentas por minuto
DMEM	Dulbecco's Modified Medium
DS	desviación estándar
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FBS	suero fetal bovino
FITC	isotiocianato de fluoresceína
fMLP	formil-metionina-leucina-fenilalanina
GM-CSF	factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IFN γ	interferón gamma
Ig	inmunoglobulina
kDa	kiloDalton
KLH	Keyhole Limpet Hemocyanin
LB	linfocito B
LPS	lipopolisacárido
LT	linfocito T
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad
NK	linfocito natural killer
OVA	ovoalbúmina
PMN	leucocito polimorfonuclear
PBS	buffer fosfato
RE	retículo endoplásmico

Agradecimientos

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rosa Wainstok, por abrirme las puertas de su laboratorio, por su dirección y consejos. Por su ayuda y por los gratos momentos y las innumerables horas de bioterio compartidas!!

Al Dr. José Mordoh, por brindarme la posibilidad de integrar su grupo de trabajo. Por su dirección, consejos y supervisión del trabajo realizado durante todos estos años. Por su confianza y estímulo permanente.

A la Universidad de Buenos Aires, por otorgarme la beca que me permitió realizar la carrera de Doctorado.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por otorgarme los conocimientos necesarios para iniciarme en la carrera de Doctorado.

A las Autoridades de la Fundación Instituto Leloir (antes Fundación Campomar) por permitirme desarrollar mi trabajo de Tesis Doctoral. Y a todas las personas que contribuyen cotidianamente con su buena predisposición y cariño: a Georgina, Aída, Juan, Darío, Ana y a todo el personal de Biblioteca, administrativo y de mantenimiento.

A la Fundación Sales, por haberme otorgado la Beca que me permitió finalizar esta Tesis y por su importante apoyo económico brindado a nuestro grupo de investigación.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, por la Beca otorgada que me permitió continuar este trabajo.

Al Dr. Ralph Steinman, por brindarme la oportunidad de desarrollar parte de mi trabajo de Tesis en su laboratorio. Por su supervisión, consejos y dirección

durante el tiempo transcurrido allí. Y a toda la gente del *Laboratory of Cellular Physiology and Immunology, Rockefeller University*.

A la Dra. Inés Bravo, por su colaboración en los trabajos realizados y por haberme transmitido los conocimientos de patología que me permitieron "encontrar las células en los tejidos"

A todos mis compañeros del laboratorio 101, Mariana, Claudia, Paula, Juliana, Silvina, Adriana, Laura, Teresa y Marcela. Con quienes he compartido todos estos años, por las ayudas recibidas, los mates y los buenos momentos.

A Martín, Blanca, Deborah, Nathalie, Caetano, Sebastián, Helena, por su cariño y su apoyo. Por los buenos consejos y la santa paciencia.

A mis padres y mi hermano, por su amor, apoyo incondicional y por creer en mí.

A mi "abu" por su amor y confianza.

A Daniel, por estar a mi lado cada día...

A todos, GRACIAS!!!