

Tesis Doctoral

Terapias combinadas contra tumores murinos: inmunoterapia y quimioterapia. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado inmunológico del portador

Maglioco, Andrea Florencia

2011

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:

Maglioco, Andrea Florencia. (2011). Terapias combinadas contra tumores murinos: inmunoterapia y quimioterapia. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado inmunológico del portador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Maglioco, Andrea Florencia. "Terapias combinadas contra tumores murinos: inmunoterapia y quimioterapia. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado inmunológico del portador". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2011.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Terapias combinadas contra tumores murinos: inmunoterapia y
quimioterapia. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado
inmunológico del portador**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Licenciada Andrea Florencia Maglioco

Director de tesis: Dra. Graciela Dran
Consejero de Estudios: Dr Eduardo Arzt

Lugar de trabajo: Instituto de Medicina Experimental, Academia Nacional de Medicina
Buenos Aires, 2011

Terapias combinadas contra tumores murinos: inmunoterapia y quimioterapia. Relación de la eficacia del tratamiento con el estado inmunológico del portador.

Resumen

El ganglio linfático drenante del tumor (NLDT) es central en el primado de células T contra antígenos tumorales y en el inicio de la respuesta antitumoral. Sin embargo, también allí el tumor generaría inmunosupresión y tolerancia. La tolerancia no sólo favorece el crecimiento tumoral sino que constituye un obstáculo para el éxito de las inmunoterapias.

Utilizamos un fibrosarcoma murino tempranamente inmunogénico que evoluciona hacia un estado tolerogénico, con el fin de estudiar los mecanismos celulares que llevan a la generación de la tolerancia a nivel del NLDT y de diseñar un tratamiento inmunológico apropiado.

Determinamos que tras una activación inicial, se induce el aumento de células plasmacitoides, linfocitos B-IL10+ y T regulatorios, todos ellos asociados con inmunosupresión, los cuales coexisten con signos de inmunidad antitumoral locales y sistémicos. Por lo tanto evaluamos la utilidad de extirpar el NLDT como medio de eliminar un foco de inmunosupresión y favorecer el rechazo del tumor; por el contrario se indujo exacerbación del mismo. La restitución de las células efectoras del ganglio extraído conjuntamente con la depleción in vivo de células regulatorias por una dosis baja de ciclofosfamida resultó en menor crecimiento, mayor sobrevida y una alta tasa de regresión tumoral, sin recidivas.

Parte de los mecanismos involucrados en la regresión comprenden la disminución del número y la actividad de las células regulatorias, la disminución de la producción de TGF- β , y el aumento de la citotoxicidad específica.

PALABRAS CLAVE: CANCER, INMUNOTERAPIA, TOLERANCIA ,
LINFADENECTOMIA, GANGLIO DRENANTE DEL TUMOR

Combined therapies against murine tumors: immunotherapy and chemotherapy. Relationship between the efficacy of the treatments and the immunological status of the host.

Abstract

Tumor-draining lymph nodes (TDLN) are central sites where T cell priming to tumor antigens and onset of the antitumor immune response occur. However, tumor-induced immunosuppression has been demonstrated at TDLN, leading to downregulation of antitumor reaction and tolerance induction. Tolerance in turn is a main impairment for immunotherapy trials. We used a murine immunogenic fibrosarcoma that evolves to a tolerogenic state, to study the cellular mechanisms underlying tolerance induction at the level of TDLN and to design an appropriate immunotherapy.

We determined that following a transient activation, the established tumor induces signs of immunosuppression at TDLN that coexist with local and systemic evidences of antitumor response. Therefore, we evaluated the feasibility of removing TDLN in order to eliminate a focus of immunosuppression and favor tumor rejection; but instead, a marked exacerbation of tumor growth was induced. Combining the restoring of the TDLN-derived cells into the donor mouse by adoptive transference with the in vivo depletion of regulatory cells by low-dose cyclophosphamide, resulted in lowered tumor growth, enhanced survival and a considerable degree of tumor regression.

The mechanisms accounting for tumor remission are at least in part the inhibition of regulatory cells and TGF- β production and the enhancement of the specific cytotoxicity.

KEY WORDS: CANCER, IMMUNOTHERAPY, TOLERANCE, LYMPHADENECTOMY, TUMOR- DRAINING LYMPH NODE

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar me gustaría aclarar que en estos 5 años es mucha la gente que estuvo acompañándome y probablemente este listado no sea **estadísticamente significativo y menos su orden altere el resultado...**

A mi mamá y mi papá que aún me tienen revoloteando en casa y me han apoyado siempre. A mi hermana, con quien siempre tendremos la discusión eterna psiquis o biología, por los buenos momentos. Al resto de la familia.

A “la Colo”, mi directora, por estar a mi lado en estos años. Por guiarme, dejarme crecer científicamente con libertad y por sobre todas las cosas por seguir acompañándome en esta nueva etapa.

A mis amigos. A Gi y Lula por ser cable a tierra muchas veces. A Leti por tantas salidas copadas. A Juli por estar siempre y permitirme malcriar a sus hijos. A Vicky por ser reflejo en tantas cosas y compartir tantos momentos. A Cami por ser como es, por decirme las cosas de una y por permitirme ser la madrina de su pequeño monstruito. A Juan y Noe por tanto aguante. A Dami, mi copiloto experimental, por tantas charlas experimentales y de las otras. A Bar, por tanta charlas. A Dani, Julián, Romi, Gabo, Tito, Gaby, Ana y Pili por los momentos compartidos. A los chicos de la facu, porque aunque podamos vernos poco todo es igual que siempre pero con mamaderas, pañales y charlas de posdocs.

A la gente de Medicina experimental. A los que pasaron y a los que quedaron. A los que hacen e hicieron posible el trabajo allí. A Isabel, Irene, Raúl, Tito. A la Dra Pasqualini. En especial a Gaby y Juli por ser mi primer contacto con los ratones y la citometría.

A la gente del laboratorio de Inmuno-oncología. A los chicos. A Mónica que siempre estuvo con la mejor onda, a Pauli, Mirta y Romina.

A la gente del laboratorio de Inmunología. A los chicos. A Martín y Marina.

Al personal del servicio de citometría y de patología

A Pato y Nati de Virología por su buena onda y predisposición.

A la UBA y mis alumnos de la facu que me permitieron complementar ciencia con docencia, las dos cosas que me encantan.

A Conicet por permitirme llegar hasta acá.

Parte de los resultados presentados en esta Tesis integran la siguiente publicación:

Maglioco A, Machuca D, Mundiñano J, Cabrera G, Camicia G, Bruzzo J, Camerano G, Costa H, Ruggiero RA and Dran GI. *“Lymphadenectomy exacerbates tumor growth while lymphadenectomy plus the adoptive transfer of autologous cytotoxic cells and low-dose cyclophosphamide induces regression of an established murine fibrosarcoma”*. Cancer Immunology Immunotherapy (2011), 60(3):389-99.

INDICE

RESUMEN	-----	2
ABSTRACT	-----	3
ABREVIATURAS	-----	11
Breve descripción del trabajo y sus objetivos	-----	12
OBJETIVOS	-----	16
INTRODUCCIÓN	-----	18
Cáncer	-----	19
Sistema Inmune	-----	20
Células dendríticas	-----	22
Células dendríticas involucradas en tolerancia	-----	23
Linfocitos B	-----	24
Linfocitos B con función regulatoria	-----	25
Linfocitos T	-----	26
Linfocitos T CD8+	-----	26
Linfocitos T CD4+	-----	27
Células T regulatorias	-----	27
Cáncer y sistema inmune	-----	29
Ganglio linfático drenante del tumor (NLDT)	-----	32
Tratamientos del cáncer	-----	33
Terapias inmunológicas	-----	33
Tumor MCC	-----	37
MATERIALES Y MÉTODOS	-----	39
Animales	-----	40
Tumor MCC	-----	40
Identificación del NLDT	-----	40
Obtención de suspensiones celulares	-----	40
Medio completo	-----	41
Células y condiciones de cultivo celular	-----	41
Extracto acelular de MCC (EA _{MCC})	-----	41

Ensayo de fagocitosis de FITC DEXTRAN	41
Ensayo de proliferación alogeneica	41
Ensayo de sensibilidad por contacto	42
Citometría de flujo	42
ELISA	42
Ensayo de citotoxicidad in vitro (<i>JAM test</i>)	43
Ensayo de citotoxicidad in vivo	43
Actividad inhibitoria de células T regulatorias	43
Extirpación del NLDT (LNx)	44
Tratamiento con ciclofosfamida (Cy) y LNx	44
Cultivo de linfocitos de NLDT	44
Transferencia Adoptiva	44
Localización de células inoculadas durante TA.....	44
Análisis estadístico de los datos	44
RESULTADOS	46
1 Estudio del sistema inmune del portador	47
1.1 Estudio de las poblaciones celulares presentes en NLDT y nNLDT	
 durante el crecimiento tumoral	48
1.1.1 Células presentadoras de antígeno (CPA).....	49
A Cambios en el fenotipo	49
B Cambios en la funcionalidad	51
i- Ensayo de fagocitosis de Fitc Dextrán	51
ii- Ensayo de inducción de la proliferación alogeneica	52
iii- Ensayo de captación de antígeno y migración- Reacción de	
Hipersensibilidad por contacto	53
Conclusión parcial	58
1.1.2 Linfocitos T	59
A Cambios en el fenotipo	59
B Cambios en la funcionalidad	61
i- Citotoxicidad	61
ii- Capacidad inhibitoria de las Treg	62
1.2 Patrón de citoquinas	63
Conclusión parcial	66

2 Elaboración de una terapia inmunológica	67
2.1 Extirpación del NLDT (LNx)	68
2.2 Terapia combinada (Cy + LNx + TA)	69
2.3 Mecanismos involucrados en la regresión tumoral inducida por la inmunoterapia	71
2.3.1 Efecto sobre la fórmula leucocitaria	71
2.3.2 Efecto del tratamiento sobre el patrón de citoquinas	72
2.3.3 Efecto de la administración de Cy in vivo	73
2.3.4 Efecto del anti-CD3 + IL-2 sobre las células de NLDT	74
A Composición celular	74
B Capacidad citotóxica	75
2.3.5 Localización de las células provenientes de la TA	76
2.3.6 Citotoxicidad anti- MCC en linfocitos infiltrantes del tumor	77
2.3.7 Cambios histológicos inducidos por el tratamiento	79
Conclusión parcial	81
 DISCUSIÓN	 82
CONCLUSIÓN	90
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

ABREVIATURAS

MCC: fibrosarcoma inducido por metilcolantreno

CPA: célula presentadora de antígeno

CDs: células dendríticas

pCDs: células plasmocitoides

IFM: intensidad de fluorescencia media

NL: ganglios

NLDT: ganglio inguinal drenante del tumor

nNLDT: ganglio inguinal contralateral – distal al tumor

DBF: Dibutil ftalato

Cy: ciclofosfamida

LNx: gangliectomía – extirpación de ganglio drenante

TA: transferencia adoptiva

IDO: indoleamina 2,3 dioxigenasa

IT: inmunoterapia

Estadios tumorales

NP: tumor no palpable

INM: tumor inmunogénico

TOL: tumor avanzado

OLS: órganos linfáticos secundarios

e.v: inoculación endovenosa

i.p.: inoculación intraperitoneal

p.i.: post-inóculo tumoral

BREVE DESCRIPCIÓN DEL TRABAJO Y SUS OBJETIVOS

Las evidencias de una respuesta inmune antitumoral en pacientes con cáncer, tales como la presencia de anticuerpos y de células citotóxicas tumor-específicas, sugieren que el tejido maligno es en cierto grado inmunogénico. A pesar de ello, el rechazo espontáneo de tumores establecidos en individuos inmunocompetentes es un hecho sumamente infrecuente. Los estudios en el campo de la inmunidad tumoral demuestran que las células tumorales son capaces de crear y mantener un entorno supresor que interfiere con el montaje de la respuesta antitumoral y favorece su expansión, y que a menudo evoluciona hacia un estado de *tolerancia* frente al tumor. Se han descrito una serie de mecanismos a través de los cuales el tumor puede generar tolerancia inmunológica; los mismos consisten principalmente en la inducción de desbalances locales en diferentes subsets de células presentadoras de antígeno (CPAs) y en la proporción de células efectoras/ regulatorias. El hallazgo de este tipo de mecanismos en una gran variedad de cánceres animales y humanos dio origen a la búsqueda de estrategias inmunoterapéuticas (IT) tendientes a restituir o exacerbar los elementos inmunogénicos del tumor, o bien a suprimir aquellos elementos inhibitorios. A pesar de que se han desarrollado una variedad de protocolos de IT del cáncer en las últimas décadas, algunos exitosos en el tratamiento de tumores experimentales o incipientes, aún no se logran resultados claros en el rechazo inducido por IT una vez que el tumor se encuentra establecido. Una causa probable es que la inmunosupresión en el portador de tumor, además de afectar a las células antitumorales endógenas, alcance a aquellas modificadas o transferidas exógenamente. De este modo, además de propiciar la progresión de la enfermedad, la tolerancia inmunológica también constituiría el principal obstáculo contra la eficacia de las IT.

El modelo murino de carcinogénesis por 3-metilcolantreno (MCA) fue ampliamente utilizado en inmunología tumoral para ilustrar las respuestas innata y adaptativa frente al cáncer. En particular en el presente estudio empleamos el fibrosarcoma murino MCC. Como la mayoría de los tumores transplantables de ratón, el implante de MCC desencadena una vigorosa respuesta inmune, la cual no es suficiente para lograr el rechazo y decae a medida que el tumor crece dando lugar a un estado de tolerancia. Dicha característica nos permitió profundizar en los mecanismos celulares y moleculares que llevan al silenciamiento de la respuesta antitumoral y al establecimiento de la tolerancia, como paso previo para lograr el diseño y la aplicación exitosa de tratamientos inmunoterapéuticos.

En primer término, estudiamos las alteraciones inducidas por el crecimiento del MCC sobre diversas poblaciones celulares presentes en los ganglios linfáticos (NL) tanto proximales como distales del tumor. Los ganglios drenantes del tumor (NLDT) revisten importancia no sólo desde el punto de vista anatómico como una de las vías de diseminación, sino desde la biología del tumor. Al ser el principal componente del sistema inmune en tomar contacto con las células tumorales o sus productos, constituyen un sitio central para el primado contra antígenos tumorales y la iniciación de la respuesta inmune. Es asimismo factible que en estos mismos órganos se genere la tolerancia específica a antígenos tumorales; de hecho algunos trabajos reportan la presencia de un entorno inmunoregulatorio en los NLDT.

Demostramos que durante su crecimiento, el MCC induce a nivel del NLDT un marcado incremento del número de células totales y de linfocitos T, células dendríticas, y especialmente linfocitos B, mientras que en el ganglio distal el contenido celular tiende a disminuir con el crecimiento tumoral. A partir del estadio de tumor establecido, el tumor induce la aparición de células B y células dendríticas inmaduras, y deficiencias en la función de presentación antigénica. A su vez, la relación entre linfocitos TCD4 activados y TCD4 regulatorios disminuye con el crecimiento tumoral, y aumenta la expresión intracelular de IL-10 en células B y la secreción de esta citoquina por parte de células ganglionares. Los cambios mencionados aparecen primero en NLDT y más tardíamente en NL distales. Si bien a partir de un pequeño volumen tumoral el microambiente en los NLDT es predominantemente inmunosupresor también detectamos indicios de activación de la respuesta inmune, tales como la activación de linfocitos TCD4 y TCD8 y el aumento en los mismos de la expresión de IFN- γ intracelular, y, a nivel sistémico, la persistencia de citotoxicidad MCC- específica.

En base a ello, y dado que la linfadenectomía es un procedimiento de rutina en la clínica, **evaluamos la factibilidad de extraer el NLDT como medio de eliminar un foco inmunosupresor y favorecer el rechazo tumoral.** Contrariamente a lo esperado la extirpación del NLDT indujo una marcada exacerbación del tumor, sugiriendo que junto con el ganglio, se estarían eliminando elementos importantes para la respuesta anti-tumoral.

Por lo tanto, **evaluamos reinocular las células efectoras del NL extirpado, previamente expandidas ex vivo.** Paralelamente, con el fin de crear un desbalance a favor de la eliminación del tumor, administramos una dosis baja de ciclofosfamida cuyo efecto es disminuir las células regulatorias presentes en el portador de tumor. Esta

terapia combinada indujo disminución del crecimiento tumoral, aumento de los índices de supervivencia y un importante grado de regresión tumoral (63%), sin recidivas (evaluadas durante 6 meses). Además, en los casos en que no se produjo remisión, el tumor creció más lentamente.

Nuestros resultados indican que existen elementos importantes para la respuesta antitumoral que pueden ser eliminados mediante la linfadenectomía proximal y prueban que la administración de bajas dosis de ciclofosfamida junto con la restitución de células citotóxicas autólogas provee protección. Sugerimos que dicho protocolo inmunoterapéutico puede ser útil especialmente en los casos en que la extirpación del ganglio es indispensable.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el impacto del crecimiento tumoral sobre el sistema inmunológico (SI) del portador, con el fin de diseñar protocolos de tratamiento inmunoterapéutico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1. Analizar los cambios inducidos por el crecimiento tumoral en las células inmunes de los ganglios drenantes y distales del tumor MCC.**
- 2. En base a los resultados obtenidos, elaborar y evaluar un protocolo de tratamiento combinado para el tumor MCC.**

INTRODUCCIÓN

Cáncer

La palabra Cáncer deriva de los términos karkinos y karkinoma que en griego significan cangrejo. Esta denominación fue brindada por Hipócrates (400 a.c.) al observar los centros sólidos de los tumores de donde partían proyecciones que le recordaron al crustáceo. Si bien la definición etimológica de nuevo crecimiento es neoplasia, cuando se habla de tumores malignos la denominación más utilizada es cáncer.

Clínicamente, se agrupan bajo la denominación de cáncer distintas enfermedades que pueden originarse en diferentes tejidos del organismo y que difieren en su tasa de crecimiento, incidencia por edad y sexo y respuesta al tratamiento. Según el punto de vista de la biología celular y molecular, se trata de un grupo de enfermedades causadas por genes defectivos cuyos productos proteicos alterados, aumentados o ausentes perturban una serie de señales intracelulares responsables de la conducta celular¹.

Según el origen histológico, los cánceres pueden ubicarse en tres grupos diferentes^{2,3,4}. los carcinomas, los sarcomas y las leucemias y linfomas.

- Los **carcinomas** tienen su origen en los epitelios, es decir en las capas de células que recubren la superficie del cuerpo y revisten las diversas glándulas. Se trata sin duda del tipo de cáncer más común y responsable del mayor número de muertes, calculándose que alrededor de un 85% de los procesos malignos son carcinomas⁵. En los seres humanos los cánceres más frecuentes como el de pulmón, mama ó colon son todos carcinomas.
- Los **sarcomas** son cánceres menos frecuentes que tienen su origen en las estructuras de sostén derivadas del mesodermo, como huesos, músculos, vasos sanguíneos. Si el sarcoma tiene su origen en el hueso se llama sarcoma osteogénico u osteosarcoma; si deriva de un cartílago se denomina condrosarcoma y si se origina en tejido fibroso se llama fibrosarcoma.

- Las **leucemias y linfomas** son neoplasias malignas que tienen su origen en las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea.

A diferencia de las leucemias, que crecen en forma diseminada, los carcinomas, sarcomas y linfomas crecen como una masa relativamente compacta, por lo que se los denomina tumores “sólidos”.

Todos los tumores, benignos y malignos, tienen dos componentes básicos: las células neoplásicas proliferantes, que constituyen el parénquima, y el estroma de sostén que está constituido por tejido conjuntivo y vasos sanguíneos. Una célula normal se convertiría progresivamente en una célula neoplásica a través de la adquisición de nuevas habilidades⁶:

- 1) independencia de factores de crecimiento
- 2) insensibilidad frente a señales inhibitorias de crecimiento
- 3) evasión de la muerte celular programada
- 4) potencial replicativo indefinido
- 5) capacidad angiogénica
- 6) invasión de tejidos y metástasis

Recientemente se incluyó una nueva característica particular de las células tumorales: **evitar la vigilancia inmunológica**. Las células tumorales escapan al sistema inmune volviéndose una variante no inmunogénica o suprimen^{7,8} activamente la respuesta inmune. Este punto será detallado oportunamente.

Sistema inmune

El sistema inmune discrimina y elimina lo “no propio”. Posee un sistema efector encargado de reaccionar y eliminar todo aquello que considera ajeno al organismo y un sistema regulatorio que impide el ataque de las células efectoras a las células somáticas. Esta regulación se da por dos fenómenos: la tolerancia central y la periférica. En la tolerancia central, durante la ontogenia de las células T y B en timo y médula ósea respectivamente, se produce la delección clonal de las células que

reaccionan frente a antígenos propios y en el caso de las células T, algunas son convertidas en células regulatorias. En la tolerancia periférica, aquellas células que son reactivas a antígenos propios son eliminadas o mantenidas anérgicas en la periferia. De hecho el balance entre inmunidad y tolerancia determina el resultado de una reacción inmune.

Los linfocitos recirculan continuamente con patrones de tráfico definidos entre la sangre, los órganos linfáticos secundarios (OLS) y la linfa. Los linfocitos vírgenes maduros, pasan a la circulación sanguínea para luego extravasarse en los OLS (ganglios linfáticos, bazo, placas de Peyer, amígdalas y adenoides). El antígeno puede llegar al ganglio linfático al ser captado en los tejidos periféricos por una célula dendrítica (CD) que lo transportará hacia el ganglio más cercano donde será presentado a los linfocitos T vírgenes. Asimismo, el sistema de drenaje linfático transporta antígenos hacia los órganos linfáticos secundarios drenantes para permitir su reconocimiento por los linfocitos B específicos que se hayan extravasado. Los linfocitos T y B que reconozcan antígenos y reciban señales coestimuladoras apropiadas se activan, sufren expansión clonal y adquieren funciones efectoras particulares con patrones de migración característicos: los Th1, Th2 y Th17 pasan a circulación para extravasarse en tejidos periféricos; las células Th foliculares permanecen en los OLS para cooperar con los linfocitos B que desencadenarán respuestas humorales y los linfocitos T regulatorios ejercerán sus funciones tanto en los OLS como en los tejidos periféricos. La mayoría de los linfocitos T que han proliferado mueren en semanas y sólo una pequeña proporción permanece como células de memoria (centrales en los OLS y efectoras en los tejidos periféricos). Los linfocitos B activados en los OLS originan plasmoblastos y células B de memoria; los plasmoblastos pueden permanecer en los OLS y producir anticuerpos o abandonarlos y por torrente circulatorio llegar a sitios distantes como médula ósea y mucosas. Las células B de memoria también recircularan entre la sangre, los OLS y la linfa.

El sistema inmune es tan fascinante como complejo. En este apartado nos centraremos en las poblaciones y características que consideramos más relevante para la comprensión de nuestro trabajo: las células dendríticas, los linfocitos B y los linfocitos T.

Células dendríticas

Las células dendríticas (CDs) cumplen un rol fundamental en la iniciación y control de las respuestas inmunes innata y adquirida⁹, como así también en el balance entre inmunidad y tolerancia inmunológica¹⁰. Representan una población celular heterogénea que se encuentra distribuída en la mayoría de los tejidos periféricos, en particular en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas), en donde representan un 1-2% de las células totales^{11,12}. Se han descripto numerosos tipos de CDs tanto en humanos como en ratón^{13,14}, dependiendo de su localización y de la expresión de una variedad de marcadores de superficie. En la actualidad, el mejor marcador para las CDs murinas es la integrina CD11c¹⁵.

En ausencia de respuestas inmunes e inflamatorias, las CDs inmaduras cumplen la función de “centinelas” capaces de detectar la entrada de patógenos, inflamación o daño celular. Una vez en contacto con el antígeno, las CDs inmaduras usan diversas vías de captura como la endocitosis mediada por receptor y la endocitosis no específica de partículas y solutos (fagocitosis y macropinocitosis)¹⁶. Estas vías también parecen ser utilizadas para la captura de antígenos propios¹⁷. Las CDs inmaduras poseen una alta capacidad para capturar antígenos pero la presentación de los mismos a las células T es ineficiente.

Antes de poder formar los complejos péptido antigénico-molécula MHC y presentarlos en la superficie celular, las CDs deben pasar por un proceso de maduración funcional. Es un proceso complejo que conduce a la diferenciación de las CDs hacia células con una potente actividad inmunoestimuladora. Varios eventos forman parte de este proceso: reorganización del citoesqueleto, adquisición de motilidad celular, migración a los tejidos linfoides, aumento de la capacidad de activación de células T y desarrollo de extensiones citoplasmáticas o “dendritas”¹⁸.

La maduración es inducida por estímulos que alertan a las CDs sobre la presencia de patógenos, inflamación o daño tisular^{19,20}. Estas señales pueden provenir de moléculas inflamatorias del huésped como TNF- α , IL-1, IL-6 e IFN- γ o de productos microbianos como el LPS y moléculas liberadas por tejidos dañados que interactúan con los receptores de las CDs.

Entre los cambios producidos durante el proceso de maduración se encuentran aumentos en la carga de péptidos en moléculas MHC, en el transporte del complejo

molécula MHC-péptido a la superficie celular, en la vida media del complejo en la membrana²¹ y particularmente en la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86, CD40), moléculas de adhesión, integrinas y miembros de la familia TNF¹⁸. Por otro lado, la maduración de las CD induce la producción de un patrón de citoquinas que depende del tipo de estímulo madurativo, el subtipo de CDs estimulado y su origen. Entre las citoquinas que producen los distintos tipos de CDs se encuentran: citoquinas que participan en la polarización de la respuesta T helper, como la IL-12^{22,23}; citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6²⁴, involucradas en la respuesta inmune innata y en la activación de CDs inmaduras; citoquinas que participan en la respuesta antiviral como los interferones de tipo I (IFN α/β) y citoquinas involucradas en la inducción de tolerancia inmunológica, como la IL-10²⁵.

Las CDs activadas y cargadas con el Ag migran a las zonas T de los órganos linfáticos secundarios donde activan a las células T. La migración de las CDs a las zonas T de los ganglios linfáticos es promovida por cambios en la expresión de moléculas de adhesión y receptores de quemoquinas. Las CDs pueden entrar al ganglio linfático a través de la sangre o de la linfa. Las interacciones estables entre CDs y células T inducen la activación de estas últimas. También pueden interactuar directamente con las células B induciendo su proliferación, el *switch* de clase y la diferenciación en célula plasmática²⁶. En el caso particular de la presentación de antígenos tumorales a las células T CD8+, las CDs realizan un proceso conocido como presentación cruzada por el cual ingresan antígenos tumorales, los procesan y los presentan en moléculas MHC I.

Células dendríticas involucradas en tolerancia

En los últimos años se han descrito poblaciones de CDs inmaduras que residen en regiones discretas de los órganos linfáticos secundarios²⁷. Se cree que estas CDs presentan en forma continua antígenos propios, participando de la inducción y mantenimiento de la tolerancia inmunológica hacia ellos^{17,28}. Se han descrito mecanismos por los cuales las CDs pueden ser transformadas en células tolerogénicas como la presencia de IL-10¹⁸ o la presencia de TGF- β ²⁹. Las células CD4+CD25+ regulatorias pueden, a su vez, influir sobre la capacidad tolerogénica de las CDs, restringiendo su maduración^{30,31,32}.

Por un lado las CD_s inmaduras inducen delección o anergia de las células T antígeno específicas^{33,34,35}; si las CD_s presentan el antígeno a las células T en ausencia de señales coestimuladoras o en presencia de cohibición, las células T pueden ser silenciadas funcionalmente y transformarse en células no respondedoras (anérgicas) a dicho antígeno en el futuro^{36,37}. Por otro lado, las CD_s pueden generar tolerancia a través de la inducción de diversos tipos de células regulatorias capaces de suprimir una respuesta T. Entre ellos, las CD_s inmaduras generarían células CD4⁺ regulatorias inducidas, como las células Tr1 y las Th3, que suprimen respuestas inmunes a través de citoquinas como IL-10 y TGF- β ^{29,38,39}. Las células Treg pueden, a su vez, influir sobre la capacidad tolerogénica de las CD_s, restringiendo su maduración^{30,31,32}.

Ante la entrada de un patógeno, las CD_s maduras serían efectivas para romper la anergia de las células CD4⁺CD25⁺ e inducir su proliferación^{40,41,42}, así como para anular la capacidad supresora de las Tregs, lo cual permitiría que ocurra una respuesta efectora.

Recientemente se ha descrito, en humanos y en ratones, una subpoblación de CD_s que expresa indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima que cataboliza triptofano y cuya actividad se asocia con la inhibición de la proliferación de células T. En ratones se las ha caracterizado como un subset de CD_s que expresan CD11c junto a marcadores plasmocitoides en la superficie celular (CD19⁺ B220⁺) y se ha visto que su actividad inhibitoria sobre los linfocitos T no es sólo a través del catabolismo del triptofano sino que también participan en la diferenciación⁴³ y activación de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺⁴⁴. La presencia de estas CD_s en los ganglios linfáticos drenantes de tumores contribuiría a la falta de respuesta inmunológica en modelos murinos y pacientes con cáncer^{45,46}.

Linfocitos B

Los linfocitos B son las células responsables de la producción de anticuerpos pero también tienen un rol importante como células presentadoras. Dada la alta afinidad del reconocimiento antigénico por parte del BCR, los antígenos solubles pueden ser reconocidos e internalizados aún en muy bajas concentraciones. Existen diversas

poblaciones de linfocitos con particularidades fenotípicas y funcionales. Los linfocitos B que se encuentran en periferia expresan en superficie B220 y CD19.

Los linfocitos B generan diferentes respuestas humorales según estén en presencia de antígenos T-independientes o T-dependientes. La respuesta humoral resultante frente a los antígenos T- independientes (polisacáridos y lípidos) está compuesta de anticuerpos IgM con escasa afinidad⁴⁷ mientras que los antígenos T dependientes, de origen proteico, no pueden activar por sí mismos a los linfocitos B y precisan de la interacción con linfocitos T CD4 específicos para el mismo antígeno, dando lugar a la producción de anticuerpos de alta afinidad, con mayor capacidad de memoria⁴⁸.

El encuentro de los linfocitos B *naive* y los antígenos suele ocurrir en los folículos primarios donde confluyen los linfocitos B circulantes y los antígenos de circulación sanguínea o vía linfática. La unión del antígeno a los receptores de membrana además de activar a los linfocitos B, favorece la internalización de los complejos antígeno-BCR en vesículas endosómicas que son dirigidas a las rutas de procesamiento antigénico. De esta manera, se produce la presentación del antígeno en contexto MHCII⁴⁹ junto con la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 y la consecuente activación de linfocitos T.

Los linfocitos B activados pueden derivar en plasmoblastos⁵⁰ que luego derivan en células plasmáticas; éstas se encontrarán en el bazo⁵¹ o en la médula ósea⁵² desde donde se seguirán produciendo anticuerpos de manera continua.

Linfocitos B con función regulatoria

Dentro de las células B se ha identificado una población con actividad regulatoria, capaz de inhibir la respuesta inmune y provocar tolerancia al antígeno. La evidencia de la función regulatoria de los linfocitos B se encontró principalmente en modelos de trasplante de órganos^{53,54,55} y enfermedades autoinmunes^{56,57,58,59}, donde estas células inhiben las células TCD8+ antígeno - específicas, inducen anergia de células T e interfieren con la actividad de las CD4 y con la diferenciación TH1/TH2, principalmente a través de la producción de las citoquinas regulatorias TGF- β e IL-10. En particular un subset de células B con función regulatoria recientemente descrito (CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi}) sería responsable de gran parte de la secreción de IL-10, y se lo conoce como B10^{60,61}. Este tipo celular comprende el 1- 2% de las células B esplénicas de ratones naive y se encuentra también en ciertos NL⁶⁰.

En particular en cáncer, el rol de los linfocitos B no está definido. La progresión de ciertos cánceres humanos y murinos induce el aumento de linfocitos B, no sólo a nivel de órganos linfáticos sino dentro del propio tumor como parte del infiltrado linfocitario. Originalmente se los consideró un indicador pronóstico positivo, tanto por la potencial protección que otorgaría la producción de anticuerpos tumor- específicos como por la cooperación con las células T citotóxicas^{62,63,64,65}. Sin embargo, otra serie de estudios sugiere que pueden ejercer un rol inmunosupresor, generando tolerancia al tumor y contribuyendo a su escape. El primer antecedente en este sentido demostró que la presencia de células B durante el primado contra antígenos tumorales se relaciona con la baja inmunogenicidad del tumor⁶⁶; más adelante se demostró que diversos tumores exhiben menor crecimiento en animales deficientes en linfocitos B^{67,68,69}, e incluso que la presencia de células B es capaz de interferir con la protección mediada por inmunoterapia⁷⁰.

Linfocitos T

Los linfocitos T que emigran del timo son células maduras que expresan un único tipo de TCR, la molécula de CD4 o CD8, y que circulan por la sangre en estado de reposo (*naive*) hasta extravasarse en los órganos linfáticos secundarios; allí los linfocitos CD4 se activarán al reconocer antígenos en el contexto de MHCII y los linfocitos CD8 se activarán por el reconocimiento de péptidos presentados en contexto de MHC I.

El linfocito T a fin de activarse necesita percibir dos señales diferentes: el reconocimiento a través del TCR del péptido antigénico presentado por las moléculas de histocompatibilidad y el reconocimiento a través del CD28 de las moléculas coestimuladoras expresadas por la CPA (CD80 y CD86).

Linfocitos T CD8+

Las células T CD8 naïve expresan niveles bajos de CD44 y niveles altos de CD62L y del receptor de quemoquinas CCR7 que facilita su entrada a los NL. Allí, en un contexto de infección o de inflamación, se activan al contactar con las CD8 maduras con la participación de células *T helper*. Se producen la expansión clonal y la formación de células efectoras y de memoria. Durante la diferenciación a células efectoras,

disminuye la expresión de CD62L y CCR7 en membrana mientras que aumenta la expresión de CD44⁷¹ y las células adquieren dos funciones efectoras críticas: la capacidad de inducir la muerte celular de la célula blanco y de secretar citoquinas⁷². Los mecanismos de muerte celular, ambos conducentes a la apoptosis de la célula blanco, comprenden la liberación de moléculas preformadas de perforina y granzimas (mecanismo secretorio) o la vía de FAS/FASL. En cuanto a la secreción de citoquinas, la secreción de IFN- γ y TNF- α comienza rápidamente luego de la interacción con el complejo MHC- antígeno y contribuye con la respuesta inflamatoria local⁷³. En particular, el IFN- γ cumple un papel crucial en la activación de los macrófagos y en la promoción de la diferenciación de los linfocitos T CD4 vírgenes hacia su perfil Th1. Asimismo las células activadas producen quimiocinas inflamatorias, que contribuyen al reclutamiento de diferentes células inmunitarias en el tejido afectado.

Linfocitos T CD4+

Las células T CD4+ convencionales controlan la inmunidad adaptativa mediante la activación, de modo antígeno- específico, de otras células efectoras tales como células T citotóxicas CD8, células B y macrófagos. Debido al patrón de citoquinas que secretan y al tipo de respuestas en las que colaboran, se distinguen dos grandes grupos de células: Th1 (IL-2, IFN γ , TNF α) que inducen respuesta celular y Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)⁷⁴ que promueven la respuesta inmune humoral.

Por otro lado, existen poblaciones de T regulatorias que intervienen en la modulación negativa de la respuesta inmune, siendo su actividad esencial para el mantenimiento de la tolerancia inmunológica y la homeostasis del sistema inmune.

Células T regulatorias

El concepto de células T “supresoras” o “regulatorias” surge a comienzos de la década del '70⁷⁵, pero debido a la ausencia de marcadores específicos^{76,77} su existencia como linaje celular distinto al de las células T convencionales resultó controvertida hasta 1995, cuando Sakaguchi y col. describen una pequeña población de células T

CD4⁺CD25⁺ de ratón con una potente actividad supresora⁷⁸. Posteriormente, se han identificado numerosos subtipos de células T supresoras o regulatorias (CD4⁺CD25⁺⁷⁷, Tr1⁷⁹, Th3⁸⁰, NKT⁸¹, CD8⁺ CD28⁻⁸², CD8⁺CD122⁺ y CD4⁺CD8⁻⁸³), las mismas difieren en varios aspectos, incluyendo el origen, los mecanismos de supresión utilizados, los blancos de acción y la especificidad antigénica⁸³.

En particular, dentro de las CD4⁺ T reg podemos diferenciar dos tipos según su origen: las naturales (nTregs) de origen tímico y las inducidas (iTregs) originadas en periferia a partir de células T convencionales mediante estimulación antigénica bajo determinadas condiciones (IL-10, TGFβ). Las nTregs constituyen el 5-10 % de todas las células T CD4⁺ y un 5 % de los timocitos maduros CD4⁺CD8⁻. Están presentes en el ratón, en ausencia de cualquier tipo de afección y son importantes tanto en el mantenimiento de la autotolerancia inmunológica^{83,84} como en infecciones, tumores⁸⁵, trasplantes⁸⁶ y reacciones de injerto contra huésped⁸⁷. Una población con fenotipo y función similar ha sido identificada en humanos^{88,89}. En particular dentro de la población de iTreg podemos encontrar las inducidas por IL-10 (Tr1)^{90,91,92,93} y las inducidas por TGFβ (Th3)⁹⁴.

Como todas las células T CD4, las células Treg expresan en su superficie un receptor T (TCR) que permite el reconocimiento específico de péptidos antigénicos en el contexto de moléculas de MHC de clase II y para su activación requieren además una señal coestimuladora por parte de las CPAs⁹⁵. Asimismo las Treg expresan constitutivamente moléculas de superficie (CD25⁹⁶, CTLA-4⁹⁷, GITR⁹⁸ y LAG-3⁹⁹) que han sido descritas también en células activadas.

En el año 2003, se descubre el factor de transcripción Foxp3 como regulador crítico del desarrollo, función y homeostasis de las células regulatorias^{100,101} y es aún considerado el marcador más específico del linaje Treg en ratón. En humanos la búsqueda de marcadores específicos del linaje Treg aún continúa, siendo CD4⁺CD25^{high} la caracterización más aceptada¹⁰².

Los mecanismos de supresión ejercidos por las células Treg pueden agruparse bajo cuatro categorías:

1) liberación de citoquinas inhibitorias (IL-10, TGFβ, IL-35)^{103,104,105}

2) citólisis mediante la liberación de granzima A en humanos y de granzima B en ratón^{106,107}

- 3) interferencia con funciones metabólicas de las células T convencionales: privación de IL-2, activación del receptor de adenosina 2A, transferencia de AMPc a las células T convencionales^{108,104,105}
- 4) modulación de la maduración y función de las CD^s^{108,104,105} y de la inducción deIDO en las CD^s¹⁰⁹.

Cáncer y sistema inmune

El cáncer ha sido asociado con la inflamación desde 1863 cuando Virchow propuso que los tumores podían originarse a partir de sitios de inflamación crónica¹¹⁰. Si bien el desarrollo tumoral promueve un entorno pro- inflamatorio (citoquinas, factores de crecimiento, quimioquinas)¹¹¹, la inflamación también es necesaria para la activación de la respuesta antitumoral tanto innata como adaptativa. El sistema inmune ejerce tres roles fundamentales en la prevención del crecimiento de tumores: la supresión de la infección viral en aquellos tumores inducidos por virus, la regulación de los procesos inflamatorios y la identificación y destrucción de las lesiones pre-cancerosas y cancerosas.

El sistema inmune puede responder a las células cancerosas reaccionando frente a antígenos específicos de las mismas o frente a antígenos asociados al tumor (moléculas expresadas en forma diferente por las células tumorales y las células normales)¹¹².

En 1909, Paul Erlich¹¹³ propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune podría protegernos frente al cáncer, pero la comprobación de su teoría llegó años más tarde junto con el mejoramiento de las herramientas de estudio. En 1950, Burnet y Thomas postularon la **teoría de la inmunovigilancia**^{114,115}, proponiendo que el sistema inmune es capaz de detectar y eliminar las células transformadas antes de que puedan crecer e invadir nuevos tejidos. En aquella época su teoría ha sido desalentada al no hallarse diferencias en la incidencia de tumores cuando expusieron ratones atómicos a carcinógenos químicos. Alrededor de 1990, resurge la hipótesis de la inmunovigilancia al descubrirse que los ratones atómicos tienen células NK y poblaciones funcionales de células T de desarrollo extratímico. También en esa década se demostró que el IFN γ es clave para la protección frente a tumores transplantados o inducidos químicamente^{116,117} y espontáneos¹¹⁸. En esa misma época se describe la alta

incidencia de cáncer inducido por virus como el sarcoma de Kaposi en pacientes inmunocomprometidos^{119,120} y de cáncer espontáneo en pacientes que sufrieron trasplantes de órganos^{121,122}. Por lo tanto, a lo largo de los años, numerosas evidencias experimentales y clínicas demostraron que el sistema inmunitario es fundamental para prevenir, limitar y suprimir el crecimiento neoplásico.

Sobre la base de la hipótesis de la inmunovigilancia se propuso la teoría de la **inmunoedición de tumores**¹²³ definida por tres eventos claves: **eliminación, equilibrio y escape**. En este modelo la fase de eliminación se corresponde con el concepto original de inmunovigilancia, donde el tumor es detectado y destruido por diversos componentes del sistema inmune. Las células tumorales que no son eliminadas en esta fase proceden hacia una fase de equilibrio donde se establece un balance entre el tumor y el sistema inmune y ambos ejercen presión sobre el otro. Finalmente, el sistema inmune contribuye a la selección de las variantes tumorales que crecerán incontroladamente “escapando” al control inmunológico ya sea eludiendo el reconocimiento inmunitario o inhibiendo los mecanismos inductores o efectores de la respuesta inmunitaria antitumoral¹²⁴; en algunos casos la evasión es absoluta y el sistema inmune tiene escaso impacto sobre la progresión tumoral. Esta fase coincide con la aparición de manifestaciones clínicas asociadas al crecimiento y la progresión tumoral. Durante el escape, los tumores despliegan múltiples mecanismos inmunosupresores¹²⁵ por los cuales evitan su reconocimiento y eliminación (Figura A). Entre los más destacables se encuentran la falta de presentación de antígenos nuevos en superficie^{126,127}, la inducción de defectos en la maduración de CD8 al suprimir la producción de señales proinflamatorias o suprimir la expresión de CCR7 interfiriendo con su migración a los ganglios linfáticos¹²⁸. Asimismo pueden interferir con la acción de la célula efectora; se observaron trabajos en los que las células tumorales se mantienen irreconocibles para las células NK al no expresar ligandos para NKG2D¹²⁹ o bien evitan su eliminación mediada por células T al desarrollar insensibilidad a INF γ ¹³⁰. Aún cuando la presentación antigénica sea correcta, las células tumorales pueden evitar al sistema inmune aumentando la expresión de moléculas anti-apoptóticas (FLIP y BCL-XL), expresando receptores de muerte mutados (Fas, TRAIL)^{131,132} o inhibiendo directamente la actividad de células T a través de la expresión de ligandos supresores (PD-L1) o la producción de galectina¹³³. Además, pueden secretar citoquinas y moléculas que actúan generando un ambiente inmunosupresor entre las que podemos

destacar el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)¹³⁴ crítico para la angiogenesis e inhibidor de la función de las CD, la enzima IDO, que hemos descrito previamente en las pCDs, el TGFβ, que principalmente inhibe la activación de CD y la función de las células T y NK y la IL-10 que suprime la función de CD y conduce la respuesta T hacia un perfil Th2 menos efectivo contra las células malignas. Como ya se ha comentado, estas citoquinas también tienen la capacidad de inducir células Treg que a su vez inhibirán la actividad de los linfocitos T por distintos mecanismos¹³⁵. Además, los tumores pueden provocar la expansión de células mieloides supresoras (MDSCs) a través de la producción de GM-CSF, IL-1β, VEGF y PGE2¹³⁶, y reclutar pCDs y macrófagos que, mediante el catabolismo del triptofano y la secreción de TGFβ e IL-10 respectivamente, colaboran con la inhibición del sistema inmune y la consecuente progresión tumoral.

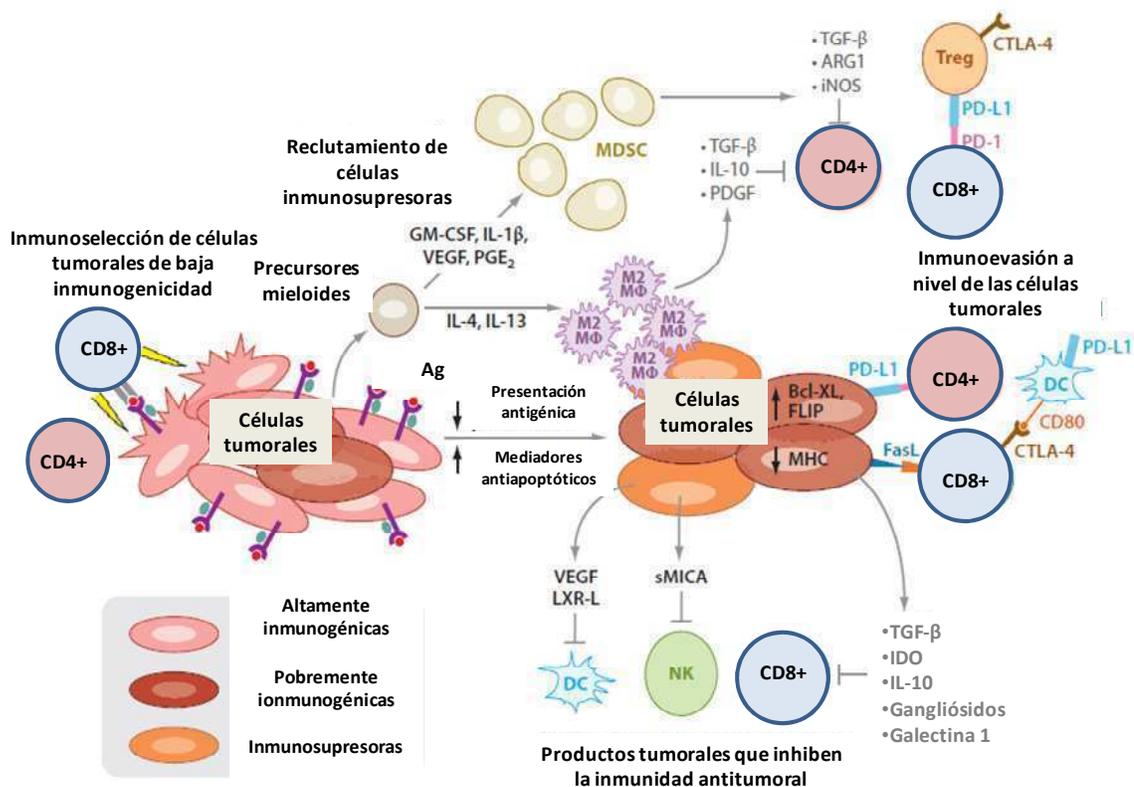


Figura A: Mecanismos de escape tumoral. El sistema inmune ejerce presión selectiva sobre los tumores mediante varios procesos. Como resultado las células tumorales inmunogénicas son eliminadas y quedan aquellas variantes que evaden los mecanismos de destrucción ejercidos por el sistema inmune. Con el tiempo, las células tumorales desarrollan distintos mecanismos de evasión del sistema inmune. Adaptado de Vesely et al¹³⁷.

Ganglio linfático drenante del tumor (NLDT)

Los ganglios linfáticos drenantes del tumor han sido históricamente considerados una barrera inmunológica a la diseminación del cáncer. Son el sitio donde ocurre el primer contacto entre los antígenos tumorales y el sistema inmune del portador, pero hoy también se sabe que presentan signos de inmunosupresión. Si bien los NL tienen funciones complejas, la más relevante en portadores de tumor es ser el sitio donde migran las CD con antígenos tumorales para presentárselos a las células T. Dependiendo del microambiente de ese ganglio es que la presentación antigénica puede conducir a la activación del sistema inmune o a una respuesta de tolerancia al antígeno¹³⁸. La naturaleza de las CPAs en los NLDT, inmunogénicas o tolerogénicas, es crítica al momento de establecer el curso de una respuesta inmune. Aún cuando los antígenos sean presentados por CPAs activadas, el hecho de que esté presente un número mínimo de CPAs tolerizantes resultará en tolerancia¹³⁹. La alteración del NLDT por la presencia del tumor es un proceso activo que comienza a los pocos días de la implantación y comprende algunos de los mecanismos de evasión ya comentados. Dentro de ellos, los más estudiados son la inducción de CD tolerogénicas y las células Treg; como ejemplos, se observó en pacientes la presencia de CD expresando PD-L1¹⁴⁰, CD que secretan TGF β ¹⁴¹, pCDs⁴⁶ y la acumulación de células Treg^{142,143,141}. Existe una relación de inducción recíproca entre estos tipos celulares: las CD tolerogénicas^{44,144} inducen Tregs y éstas, a través de la secreción de IL-10 y TGF- β , pueden inducir fenotipo tolerogénico en las CD¹⁴⁵.

Una vez que se ha creado un ambiente tolerogénico local, el próximo paso será la tolerancia a nivel sistémico, y ésta podría ser creada a partir del mismo ganglio drenante. Este proceso involucra la inducción de anergia en las células efectoras en el NLDT y la activación o expansión de células regulatorias que migrarán desde el ganglio drenante llevando la tolerancia al resto del organismo¹³⁹.

Tratamientos del cáncer

En la actualidad existen tres tratamientos convencionales contra el cáncer: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. Los dos primeros cumplen su objetivo terapéutico cuando las células tumorales se encuentran puntualmente localizadas. Por el contrario, cuando éstas se han diseminado desde su lugar de origen, estos métodos van perdiendo eficacia por lo que se requiere de un procedimiento que destruya las células cancerosas donde sea que se encuentren. Es aquí donde se recurre a la quimioterapia. No obstante los procedimientos de esta práctica son, en mayor o menor medida, tóxicos para las células normales limitándose sus aplicaciones terapéuticas¹⁴⁶. Por otro lado, basándose en la relación entre el sistema inmune y el cáncer otro tipo de terapias, las inmunoterapias, están siendo estudiadas y algunas ya empleadas en la clínica con distintos resultados.

Terapias inmunológicas

El objetivo de una inmunoterapia es inducir la respuesta inmune frente al tumor intentando sobrepasar el escape tumoral o mejorar la respuesta ya existente. En las últimas décadas se han realizado grandes avances en el conocimiento de los componentes que son relevantes durante una respuesta inmune antitumoral y de los mecanismos de escape inmunológico, los cuales son herramientas indispensables para el desarrollo de inmunoterapias efectivas.

Si bien la selección de la población de pacientes a quienes aplicar una inmunoterapia determinada, la dosis biológica y el esquema de administración óptima son cuestiones difíciles de estandarizar, se han obtenido resultados promisorios en la aplicación de algunas inmunoterapias. Un esquema temporal de los hitos más relevantes de la relación entre sistema inmune y cáncer desde 1863 hasta hoy y de la aprobación de algunas inmunoterapias para uso clínico pueden verse en la Figura B.

Conocer las causas del cáncer permite abordajes distintos de tratamiento terapéutico e incluso preventivo. En el caso de los cánceres inducidos por virus (por ejemplo: papiloma humano, Hepatitis B y C, Epstein Barr) que son aproximadamente el 15% de

todos los cánceres diagnosticados¹⁴⁷, en algunos casos puede pensarse en realizar vacunas dirigidas contra antígenos virales. En este sentido, se han desarrollado vacunas preventivas frente a dos serotipos del virus del papiloma humano (HPV-16 y HPV-18) a administrarse en mujeres que no son sexualmente activas¹⁴⁸. Estas vacunas inducen una respuesta humoral frente a estos serotipos pero suelen fallar durante una infección crónica de HPV donde ocurre integración genómica de genes virales codificando para oncoproteínas (E6 y E7). Se desarrollaron también vacunas terapéuticas en las cuales E6 y E7 son administradas junto con adyuvante de Freund incompleto obteniéndose 50 % de erradicación del tumor en mujeres con neoplasia premaligna¹⁴⁹. Otro tipo de vacunas se basan en el inóculo de virus atenuados, como el herpes simple tipo I modificado genéticamente para producir el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) en forma intratumoral en pacientes con melanoma y carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, protocolo que se encuentra en fase III¹⁵⁰. El virus infecta todas las células pero se multiplica selectivamente en las cancerosas conduciendo a su lisis con la consecuente liberación de antígenos tumorales. Si bien los protocolos mencionados han sido efectivos, muchos otros ensayos no lo fueron¹⁵¹

Otro de los blancos atacados por las inmunoterapias es la modulación de citoquinas y el bloqueo de moléculas involucradas en inmunosupresión. En particular el antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxico (CTLA-4) es uno de los reguladores cruciales en la inducción y mantenimiento de la tolerancia¹⁵² y está presente en todas las células T incluso en las regulatorias Foxp3+. El bloqueo de CTLA-4 con anticuerpos monoclonales produjo el rechazo de tumores establecidos en un modelo murino de melanoma. Se han desarrollado anticuerpos monoclonales contra CTLA-4 humanos pero sólo se han obtenido hasta el momento un 10 % de respuesta positiva y efectos colaterales relacionados con la disrupción de la tolerancia ejercida por CTLA-4 (colitis, dermatitis, hepatitis)^{153,154}. Aparte de CTLA-4, existen numerosas moléculas que pueden ser blanco de bloqueo y son claves en la regulación de la respuesta inmune (PD1, PDL1, B7H3). En la misma dirección, también se ha buscado la eliminación de las células Treg y hasta el momento ha sido aprobado el uso de anti-CD25 (receptor de IL-2). Sin embargo, éste tiene la limitación de que si bien en humanos el receptor de IL-2 es expresado en mayor medida por las células Treg¹⁵⁵ también es expresado por las células T activadas, lo que puede ser la causa de los resultados equívocos.

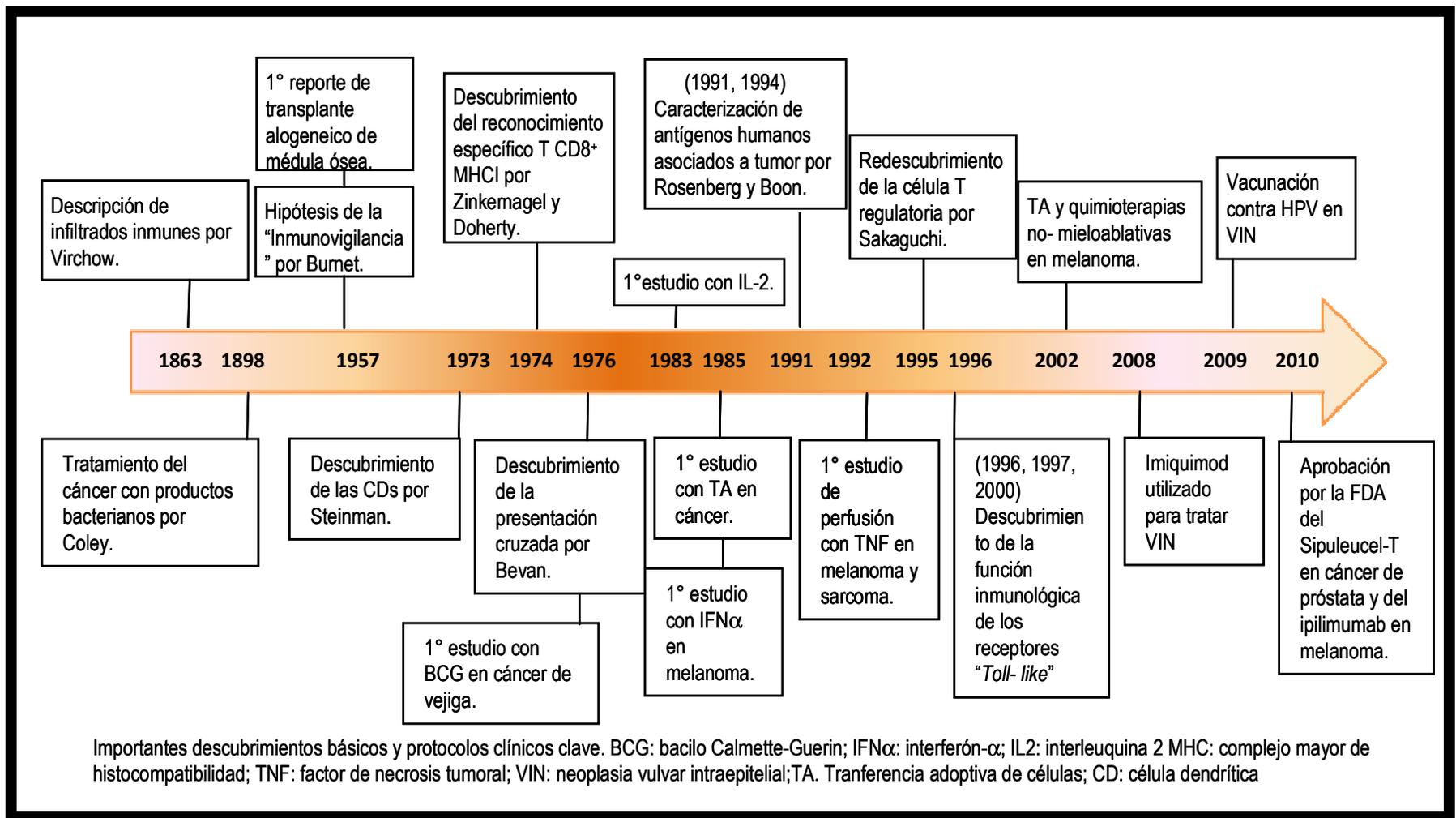


Figura B: Relación entre sistema inmune y cáncer. Se muestran los sucesos más relevantes en los estudios de la relación entre sistema inmune y cáncer desde 1863 hasta la actualidad. Adaptado de Lesterhuis et al¹⁵⁶.

Otro de los abordajes que ha sufrido un mayor desarrollo en los últimos años es el uso de la transferencia adoptiva de células inmunes. Existen numerosos estudios en los que se busca incrementar la respuesta del portador frente al tumor mediante la transferencia adoptiva de células. Algunas metodologías buscan mejorar la presentación antigénica al realizar transferencia de células dendríticas expuestas *ex vivo* a antígenos tumorales¹⁵⁷ mientras otras se centran en la transferencia de células efectoras como T CD4 y CD8^{158,159}; un tercer abordaje incluye la transferencia de células genéticamente modificadas para que expresen un TCR anti-tumoral de alta afinidad. Estos protocolos son más efectivos al combinarse con protocolos que lleven a la linfopenia en el receptor¹⁶⁰. En relación a esto, hoy se sabe que la quimioterapia convencional es útil para acompañar una terapia inmunológica al modular la respuesta inmune. Su efecto, según los agentes quimioterapéuticos y las dosis utilizadas, se basa en que genera muerte celular siendo fuente de antígenos tumorales¹⁶¹, produce linfopenia siendo el sistema inmune más receptivo a romper la tolerancia^{162,163} y se produce una disminución transitoria del número de células T regulatorias^{164,165}. Uno de los agentes quimioterapéuticos utilizados como complemento de las inmunoterapias es la ciclofosfamida. Es administrado como compuesto inactivo y luego de su activación mediante el sistema de oxidasa microsomal hepático forma un aldehído que se descompone en el plasma y en los tejidos periféricos para formar acroleína y un metabolito alquilante. La ciclofosfamida ejerce distinto efecto si es administrada en altas o bajas dosis. En altas dosis conduce a la reducción del tamaño tumoral por acción citotóxica junto a la depresión del sistema inmune, mientras que en dosis menores a 200 mg/kg de peso, aumenta la eficacia de diversas inmunoterapias^{157,166}. Los mecanismos de acción inmunomoduladora de la ciclofosfamida involucran cambios en las poblaciones de linfocitos B, T y, en particular, Treg (Figura C). Consecuentemente produce modificaciones en el perfil de citoquinas secretadas (disminución en la secreción de TGFβ e IL-10¹⁶⁷ y un aumento en la secreción de IL-2 e IFNγ)¹⁶⁸. Por otro lado, se ha demostrado que provoca una disminución en la expresión de galectina-1, involucrada en el potencial metastásico de muchos tumores y una modulación de los niveles de Bcl-2.¹⁶⁹

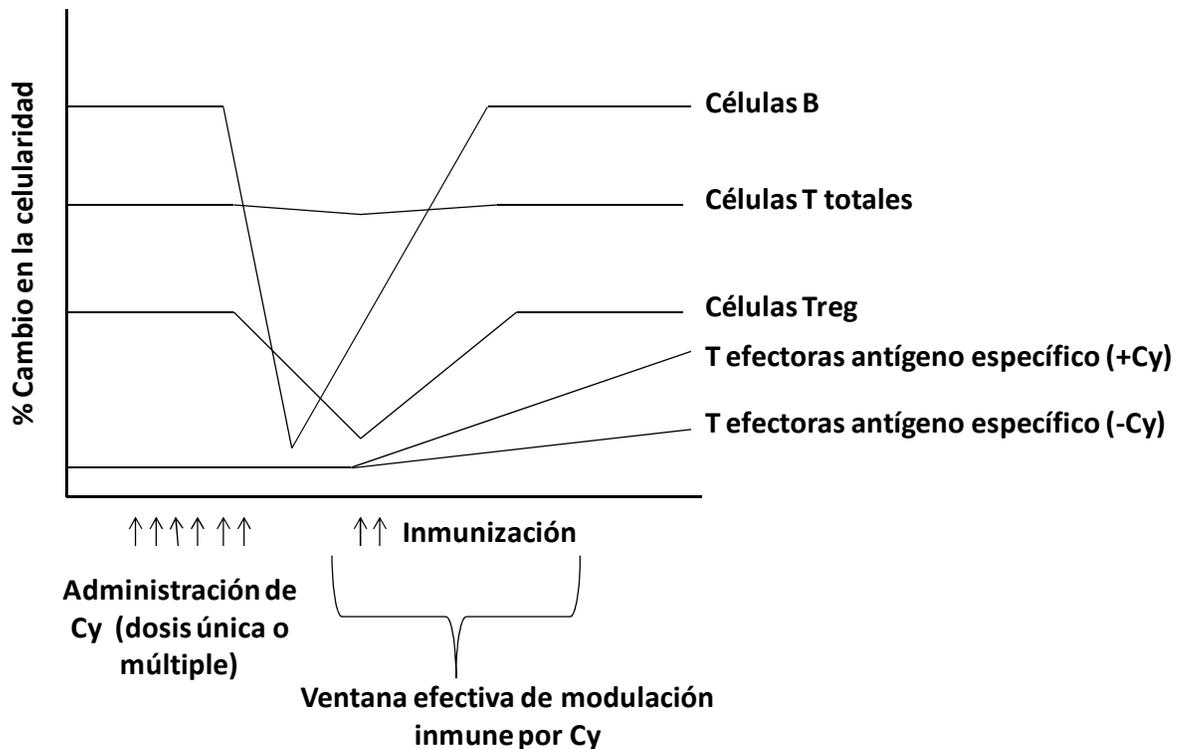


Figura C: Cambios en las poblaciones de linfocitos luego de la administración de Cy en bajas dosis. La administración de una única dosis o dosis repetidas de Cy depleciona rápidamente de células B periféricas (24 horas) y posteriormente se observa una disminución de células regulatorias CD4+CD25+Foxp3+ obteniéndose un máximo de depleción entre los dos y siete días posteriores a la última administración de Cy. Luego de una a dos semanas se recupera el número de células B y T presentes en los tejidos linfoides. Los protocolos de inmunización administrados durante “la ventana de modulación” del sistema inmune generan una mayor expansión de células T efectoras antígeno específico. Adaptado de Brode et al¹⁷⁰.

Tumor MCC

El tumor MCC es un fibrosarcoma murino inducido por el carcinógeno 3-metilcolantreno en ratones de la cepa Balb/c y mantenido por pasajes singeneicos. Inoculado en forma subcutánea no genera metástasis y presenta la característica de cambiar de un estado de inmunogenicidad inicial a un estado de ignorancia por parte del sistema inmune en un lapso corto de tiempo. Cuando el tumor es pequeño se comporta como inmunogénico y luego el sistema inmune del huésped se torna tolerante y ya no se detectan evidencias de respuesta antitumoral¹⁷¹. Por ello es un sistema ideal para

estudiar los mecanismos que llevan al establecimiento de la tolerancia, habitual en pacientes con cáncer. Se ha probado que el desarrollo del MCC se acompaña de neutrofilia e inflamación (TNF- α , IL-1 β , IL-6, CRP y SAA)¹⁷² cuya modulación revertiría parte de los signos de tolerancia inmunológica^{173,174}. Además, el modelo exhibe resistencia concomitante por la cual un portador de MCC retarda o inhibe el crecimiento de un implante secundario del mismo tumor, lo que podría representar clínicamente al control que ejerce un tumor primario sobre sus metástasis. El fenómeno de resistencia concomitante se observa en portadores de MCC con volúmenes tumorales menores a 500 mm³ o mayores a 2000 mm³ ^{175,171}. En el primer caso es un fenómeno tumor - específico que se da en la mayoría de los tumores inmunogénicos y está asociado a una respuesta T anti-tumoral. Mientras, el fenómeno observado en tumores más grandes no tendría relación con una respuesta inmune, es un fenómeno timo - independiente y correlaciona con un factor sérico que inhibe *in vivo* e *in vitro* la proliferación de las células tumorales. Este factor ha sido aislado y caracterizado como una mezcla de m-tirosina y o-tirosina en relación 1,4:1; se demostró que el mismo es capaz de inhibir la proliferación *in vitro* de células MCC en manera dosis dependiente y de retardar *in vivo* el crecimiento tumoral¹⁷⁶.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Se han utilizado ratones machos de las cepas BALB/c y C57BL/6 de 2-3 meses de edad, criados en el bioterio del Instituto de Investigaciones Hematológicas de Buenos Aires según las recomendaciones de la Guía para el cuidado y uso de animales de Laboratorio, del National Health Institute (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals).

Tumor MCC: Es un fibrosarcoma inducido en un ratón de la cepa BALB/c por la administración de metilcolantreno; se mantiene por pasajes singeneicos s.c. (10^6 células MCC viables) en ratones machos de 2 meses de edad. Los estudios sobre el sistema inmunológico del tumor se realizaron en 2 estadios sucesivos del crecimiento tumoral: INM (**Fase Inmunogénica** o de tumor establecido; corresponde a un volumen tumoral de $100\text{--}400\text{ mm}^3$) y TOL (**Fase Tolerogénica**, o tumor avanzado, volumen $800\text{--}1200\text{ mm}^3$). En ciertos experimentos se ha incluido un tiempo inicial correspondiente a las 48 horas post inoculo tumoral (**NP: tumor No Palpable**). Por las características de crecimiento del MCC, los ganglios proximales y distales se mantienen libres de células tumorales durante todo su desarrollo. Los diámetros tumorales fueron medidos con calibre y el volumen tumoral se calculó según la fórmula de Attia y Weiss: Volumen tumoral = $0,4 (a \times b^2)$, donde a y b son los diámetros mayor y menor respectivamente. Los estudios realizados se acompañaron con un estudio histológico del tumor.

Identificación del ganglio linfático drenante del tumor (NLDT): El tumor implantado en el flanco puede eventualmente drenar a los ganglios linfáticos (NL) inguinal, poplíteo y axilar. Para determinarlo en nuestro sistema, se aplicó una inyección intratumoral de colorante¹⁷⁷ (azul de metileno) y 50 minutos más tarde se observó la tinción a nivel de los distintos NL. En los experimentos se utilizó como control al NL inguinal contralateral, al cual denominamos nNLDT, y no mostró tinción.

Obtención de suspensiones celulares: los NLs, el bazo o el tumor se extrajeron estérilmente, se disgregaron mecánicamente en PBS, primero con tijeras y luego a través de una malla metálica. Para el aislamiento de células mononucleares a partir de

sangre periférica, bazo o tumor, se utilizó un gradiente de ficoll hypaque (δ 1,099 g/cm³).

Medio completo (MC): Se utilizó en todos los experimentos RPMI1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Natocor, Argentina) 1% de L-glutamina, 1% de antibiótico (penicilina / estreptomina / anfotericina B) y 2-mercaptoetanol; Gibco (1/1000)

Células y condiciones de cultivo celular: Las suspensiones celulares se cultivaron en MC y se mantuvieron en estufa gaseada (5% CO₂) a 37°C.

Extracto acelar de MCC (EA_{MCC}): Se realizó un homogenato de 1x10⁶ células MCC/ml y se lo sometió a sucesivos ciclos de congelado y descongelado. El EA fue utilizado para las técnicas de citotoxicidad in vivo y como estímulo en los dosajes de citoquinas; en este último caso la suspensión fue previamente sonicada (Branson Digital Sonifier).

Ensayo de fagocitosis de FITC DEXTRAN¹⁷⁸: Las suspensiones celulares obtenidas a partir de los NLs se incubaron con FITC- dextrán (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en una concentración final de 100 µg/ml durante 50 minutos a 37°C o bien a 0°C los controles. Luego se lavaron con buffer PBS frío suplementado con suero fetal bovino (1%) y NaN₃ (0,01%) y se marcaron con anti-CD11c-PE. Se detectaron las células CD11c⁺Fitc⁺ por citometría de flujo.

Ensayo de proliferación alogeneica: Se realizó un cultivo mixto de células de ganglio de ratones de la cepa C57 (células *target*) y células provenientes de los NLDT o nNLDT de ratones portadores de MCC previamente tratadas con mitomicina C (efectoras), en distintas relaciones E:T. El cultivo se mantuvo en estufa durante 96 hs y en las últimas 18 hs se realizó un pulso de ³H- timidina. Paralelamente se realizó el ensayo en presencia de un anticuerpo neutralizante de IL-10 (5 µg/ml- BD Pharmingen). Luego las células se cosecharon y se midió la radioactividad mediante contador de centelleo líquido.

Ensayo de sensibilidad por contacto: Se utilizó una solución 1% de FITC (Sigma) en una solución 1:1 dibutilftalato-acetona (vehículo) para todas las topitaciones. Para poner a punto la técnica en nuestro modelo, se topicaron los ratones en uno de los ganglios inguinales y se observó si había migración de células que hubiesen captado el antígeno hacia el ganglio contralateral. Luego se realizaron dos esquemas de topicación diferentes: 1) se topicaron los animales en el área de piel ubicada sobre el NLDT y el nNLDT y luego de 24 horas se extrajeron los ganglios y se analizó por citometría de flujo la presencia de las poblaciones CD4⁺, CD11c⁺FITC⁺, CD19⁺FITC⁺ y CD11c⁺CD19⁺FITC⁺. 2) se topicaron los ratones en el área de piel ubicada sobre el NLDT ó sobre el nNLDT y luego de 6 días se topicó la oreja ipsilateral y 48 horas más tarde se midieron los cambios en el grosor de la oreja como indicador de reacción de hipersensibilidad por contacto¹⁷⁹. En todos los experimentos, como control, se realizó el mismo esquema de topitaciones pero utilizando solamente el vehículo. En particular en el segundo esquema de topicación se realizó también como control la primer topicación con vehículo y la segunda topicación con antígeno y viceversa.

Citometría de flujo: Las células de NL (1×10^6) fueron incubadas con los anticuerpos correspondientes en las concentraciones adecuadas. Se utilizaron los siguientes anticuerpos y sus controles de isotipo (Pharmingen, San Diego, CA): FITC- ó PE- anti-CD8a (clon 53-6.7), FITC- anti-CD80 (clon 16-10A1), FITC- anti-CD40 (clon HM40-3), FITC- anti-I-Ad (clon AMS-32.1), FITC- o PE- anti-CD11c (clon HL3), FITC- anti-CD4 (clon H129.19), FITC-, PE-Cy5.5 ó PE- anti-CD19 (clon 1D3), PE- anti-IFN- γ , PE- anti-IL-10, PE-Cy5.5 anti-CD45R/B220 (clon RA3-6B2), PE-Cy5.5 anti-CD25 (clon PC61), PE-Cy5.5 anti-CD44 (clon IM7) y FITC- anti-H-2K^d (clon SF1.1). Las células se analizaron usando un citómetro FACS (BD Biosciences) y el software Winmdi. Para la detección de células T regulatorias se utilizó PE- anti-Foxp3 y su correspondiente kit de marcación (e-Bioscience). Para la detección de citoquinas intracelulares se utilizaron los anticuerpos ya mencionados y el buffer de permeabilización correspondiente (Pharmingen).

ELISA: La presencia de citoquinas en sangre periférica, y en sobrenadante de cultivo de NL y de células MCC se evaluó mediante ELISA (kits comerciales de e-Bioscience). Las células de NL ($2-5 \times 10^6$ células/ml) fueron expuestas previamente a EA_{MCC} (1:1)

durante 24 horas para el dosaje de TGF- β e IFN- γ ó 72 horas para el dosaje de IL-10 ó IL-12.

Ensayo de citotoxicidad in vitro (JAM test)¹⁸⁰: La citotoxicidad se evaluó por la lisis específica de células MCC. Las mismas se marcaron con ³H- timidina. Como células efectoras se utilizaron células de NL (1×10^6), células que se utilizarían para la transferencia adoptiva (1×10^6) y linfocitos aislados del infiltrado tumoral (1×10^5). Las células MCC marcadas en todos los ensayos fueron $2,5 \times 10^4$. Luego del co-cultivo por 8 horas, se midió la liberación de ³H- timidina como medida de lisis específica; % = $100 \times (S - E)/S$, siendo S muerte espontánea y E muerte experimental. Como control se utilizaron fibroblastos normales.

Ensayo de citotoxicidad in vivo: Se utilizó una modificación de una técnica descrita previamente¹⁸¹. Se aislaron esplenocitos y células de NL de ratones naive (libres de tumor) y se dividieron en dos grupos; uno de ellos se pulsó con EA_{MCC} y se cultivó por 18 horas a 37° C (células pulsadas), mientras que el otro se cultivó en MC. Las células se lavaron y marcaron con 5,6-carboxifluorescein diacetato succinimidil éster (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) 10 μ mol/L para células pulsadas (M2) y 1 μ mol/L para células no pulsadas (M1). Ambas poblaciones se mezclaron en cantidades iguales y se inyectaron i.v. 1×10^7 células en ratones portadores y en ratones naive (control). Se sacrificaron los ratones a distintos tiempos y se estudió la presencia de células marcadas con CFSE en bazo. El porcentaje de lisis específica se determinó según: % Lisis específica = $(1 - [M2_{\text{experimental}}/M1_{\text{experimental}} / M2_{\text{control}}/M1_{\text{control}}]) \times 100$.

Actividad inhibitoria de células T regulatorias¹⁸²: Se aislaron, mediante el uso de *cell sorter* (FACSARIAII), células CD4⁻, CD4⁺CD25⁺(T-reg) y CD4⁺CD25⁻ (células efectoras - T-eff) a partir de una suspensión de NL de ratones normales, portadores de MCC en fase INM o portadores tratados con ciclofosfamida. Las células CD4⁻ se irradiaron (3300 rad) y sembraron en placas de 96 wells (10^5 células/well) junto a las células efectoras (10^4 células/well) con o sin el agregado de células T regulatorias (10^4 células/well). Todo el ensayo se realizó en MC con el agregado de 1 μ g/ml de anti-CD3 soluble y 1 μ g/ml de anti-CD28 soluble, estos últimos como estímulos de proliferación. A los 4 días se agregó 1 mCi de ³H-timidina y se observó el nivel de proliferación por incorporación de timidina.

Extirpación del NLDT (LNx)

Se realizó una pequeña incisión en la zona ventral cercana al ganglio y se extirpó en forma estéril el ganglio inguinal drenante del tumor dejando las estructuras cercanas conservadas.

Tratamiento con ciclofosfamida y LNx: los ratones portadores de MCC en fase IMM fueron tratados con una única dosis baja de ciclofosfamida (Cy)¹⁵⁷, según protocolos previos. Se inyectaron 50 mg/kg peso de Cy i.p. en ratones portadores. Cuatro días después, se efectuó la extirpación de NLDT (linfadenectomía -LNx) de los portadores y las células provenientes del ganglio extirpado se cultivaron como se describe luego. Al día 9 post-Cy, las células cultivadas se inocularon por vía endovenosa en el ratón donante. Como controles se utilizaron ratones no tratados y tratados parcialmente. El volumen tumoral y la sobrevida se registraron diariamente.

Cultivo de linfocitos de NLDT¹⁸³: las células provenientes de NLDT (2×10^6 /ml) se cultivaron en medio completo en placas de 24 wells con anti-CD3 (1,2 μ g/ml) durante 48 hs y luego en medio fresco con el agregado de IL-2 (5 U/ml) en placas de 6 wells durante tres días (1×10^5 células/ml). Las células fueron luego resuspendidas en PBS para la transferencia adoptiva o para su análisis por citometría de flujo y en medio completo para el ensayo de JAM test.

Transferencia adoptiva: las células de NLDT de cada portador, luego de ser cultivadas, se reinocularon en el mismo ratón donador ($3-5 \times 10^6$ de células) por vía endovenosa.

Localización de células inoculadas durante la TA. Las células utilizadas para la TA fueron previamente marcadas con CFSE. Los portadores fueron sacrificados a los 7 días posteriores a la TA y se analizaron por citometría de flujo las suspensiones celulares de bazo, NL y tumor.

Análisis estadístico de los datos. Para analizar la significancia de los resultados se utilizaron distintos test estadísticos. Las diferencias en el fenotipo de las células, en

los niveles de citoquinas y en la reacción de hipersensibilidad por contacto fueron evaluadas mediante test de Student. Las curvas de crecimiento tumoral fueron comparadas mediante ANOVA de un factor y el test de comparación múltiple de Turkey. Las curvas de sobrevida fueron analizadas mediante log-rank test. Las diferencias en el ensayo JAM test fueron analizadas mediante un ANOVA de dos factores y el test de comparación múltiple de Bonferroni. En el ensayo de proliferación alogeneica, el desvío estándar fue calculado mediante la propagación de errores de la relación Tumoral/Normal. Todos los estadísticos se interpretaron en curva de dos colas y $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; comparando ratón normal vs portador salvo que se indique lo contrario).

RESULTADOS

1. Estudio del sistema inmune del portador.

Comenzamos nuestro estudio determinando las distintas etapas en las que realizaríamos el análisis del sistema inmune del portador. Basándonos en estudios previos sobre la inmunogenicidad del tumor a lo largo de su desarrollo establecimos 3 etapas:

- NP o tumor no palpable (48 hs post inóculo tumoral),
- INM o fase de inmunogenicidad (100-400 mm³) y
- TOL o fase tolerogénica (800-1200 mm³).

Luego, analizamos hacia que ganglios linfáticos (NL) drenaba el tumor inicialmente mediante el inóculo intratumoral de colorante vital. Observamos que tanto el ganglio inguinal como, más tardíamente, el axilar fueron teñidos con esta técnica. Realizamos la mayoría de nuestros estudios en los ganglios linfáticos drenante del tumor (NLDT) inguinales por ser más simple su extracción. Como contraparte utilizamos los ganglios linfáticos inguinales contralaterales o distales (nNLDT).

1.1 Estudio de las poblaciones celulares presentes en los NLDT y nNLDT durante el crecimiento tumoral.

Como se muestra en la figura 1, la presencia del tumor induce el aumento del número de células totales del NLDT durante todo su desarrollo (fases NP, INM y TOL) mientras que en el nNLDT no se observan cambios hasta TOL donde el número de células totales disminuye significativamente respecto de lo hallado en ratones controles (Normal).

Al analizar cada una de las poblaciones celulares, observamos en NLDT un aumento significativo en el número de células CD11c⁺ (células dendríticas - CDs), linfocitos T CD8⁺, linfocitos T CD4⁺ y un incremento muy marcado de linfocitos B. En nNLDT, no hallamos variaciones hasta TOL donde cada una de las poblaciones se encuentra por debajo de los valores normales, a excepción de los linfocitos B que se encuentran significativamente aumentados.

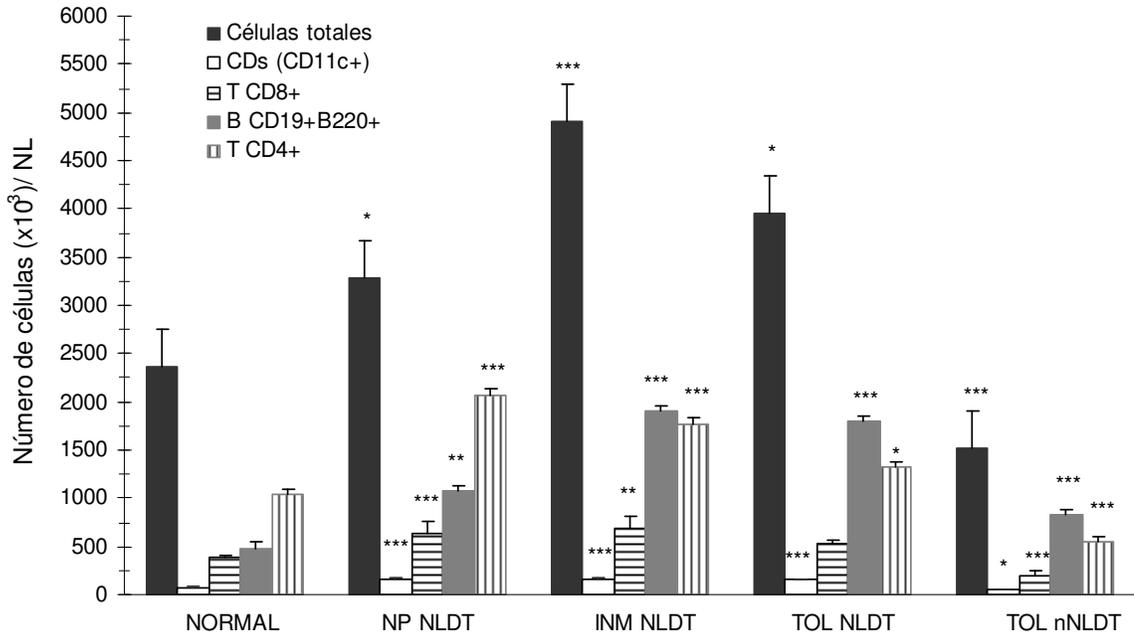


Figura 1: Número de células totales, dendríticas, linfocitos T CD8 , linfocitos B y linfocitos T CD4 encontrados en los ganglios inguinales de ratones normales y de ratones portadores de MCC durante el crecimiento tumoral. Se aislaron células de NLDT y nNLDT de ratones portadores en distintos estadios y se contó el número de células totales (n = 9 - 24 ratones por grupo). Se determinaron por citometría de flujo las proporciones de los distintos tipos celulares presentes. Se muestra la media del número de células \pm SD de un experimento representativo (n = 4 ratones por grupo).

1.1.1 Células presentadoras de antígeno (CPA)

A) Cambios en el fenotipo

La reacción del sistema inmune frente al crecimiento tumoral dependerá de la presencia de antígenos tumorales. Para que se desarrolle una efectiva respuesta inmune debe desarrollarse previamente una efectiva presentación antigénica por parte de las células presentadoras de antígeno.

Analizamos el fenotipo de las CPAs en las sucesivas fases del crecimiento tumoral (Figura 2A-B). En NP, observamos un aumento de las moléculas coestimuladoras

(CD40 y CD80 en las CDs y CD40 en los linfocitos B) sólo a nivel del NLDT, indicando una activación de las CPAs, cercana al sitio de implantación del tumor.

En INM y TOL, cuando el tumor ya se encuentra establecido, detectamos un aumento en la expresión de MHCII que no se acompaña de diferencias en la expresión de moléculas coestimuladoras. No observamos diferencias significativas en la expresión de MHC I durante todo el crecimiento tumoral (no se muestra).

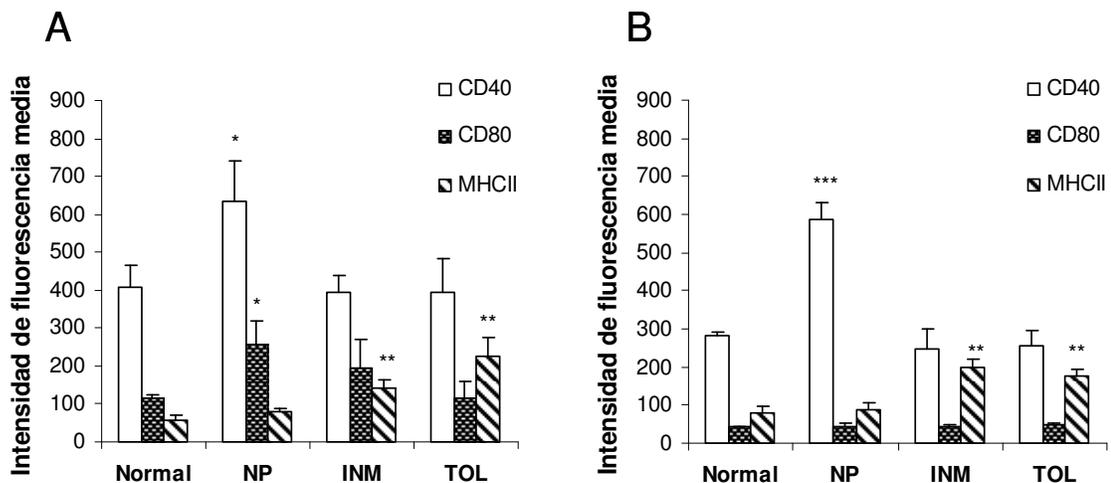


Figura 2: Intensidad de fluorescencia media de las moléculas MHCII, CD40 y CD80 presentes en A) CDs y B) Linfocitos B presentes en los NLDT. Las barras muestran la media \pm SD de un experimento representativo (n = 3 – 5).

Se ha descrito que el aumento en la expresión de MHCII en ausencia de aumentos en la expresión de CD40 y CD80 es característico de CDs inmaduras o supresoras¹⁸⁴. Entre las CDs con fenotipo supresor descritas en ratones y particularmente en ganglio, se encuentran las células plasmacitoides (pCDs) que coexpresan marcadores de linaje B (CD11c⁺B220⁺CD19⁺)⁴⁴. Evaluamos la presencia de estas células potencialmente tolerogénicas en nuestro sistema y hallamos que su proporción se encuentra aumentada en INM y TOL en ambos ganglios (Figura 3).

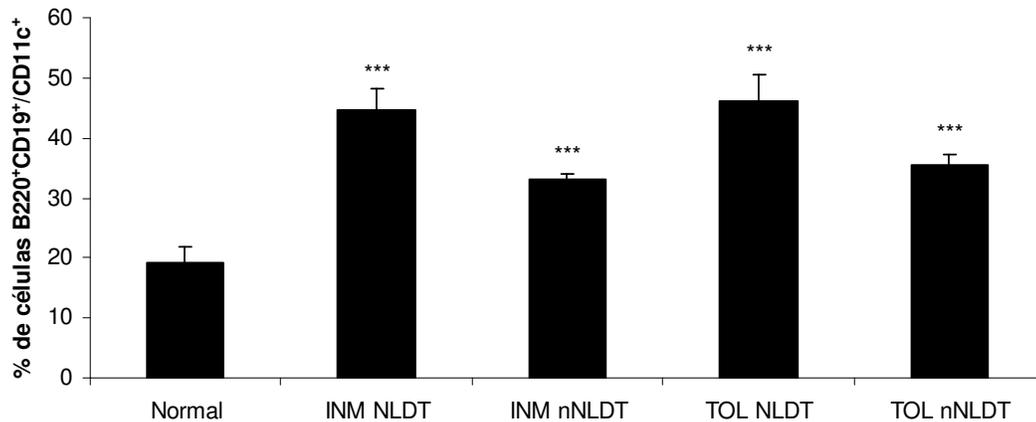


Figura 3: Proporción de células plasmacitoides (B220+CD19+CD11c+) halladas en los LN de ratones normales y de portadores en el desarrollo tumoral. Se aislaron células de NLDT y nNLDT de ratones portadores en distintos estadios y de ratones normales. Se determinaron por citometría de flujo el porcentaje de células B220⁺CD19⁺ dentro de la población de CDs. Las barras muestran la media \pm SD de un experimento representativo (n = 4 ratones / grupo).

B) Cambios en la funcionalidad

El estudio de la funcionalidad de las células presentadoras de antígeno ha sido abordado mediante 3 tipos de ensayos:

- i. Estudio de la capacidad fagocítica de las células de ganglio.
- ii. Estudio de la capacidad de las CPAs presentes en ganglio de inducir proliferación alogeneica.
- iii. Estudio de la capacidad de las células de Langerhans de captar un antígeno en superficie, migrar a los ganglios linfáticos y generar una respuesta T.

i. Ensayo de fagocitosis de Fitc Dextrán

La actividad endocítica de las células dendríticas esta asociada a su rol posterior como célula presentadora de antígeno. Las células inmaduras tienen la capacidad de fagocitar moléculas solubles como Fitc-Dextran, internalizar y procesar al antígeno.

Luego de un estímulo se diferencian en células maduras que expresan MHCII y moléculas coestimuladoras en la membrana celular.

Al estudiar la capacidad fagocítica de las células CD11c+ presentes en los ganglios inguinales, observamos en NP una mayor proporción de células que captan Dextrán-Fitc tanto en ganglio drenante como distal. Cuando el tumor se encuentra avanzado (TOL) el aumento de la proporción de estas células ocurre solo a nivel del NLDT (Figura 4).

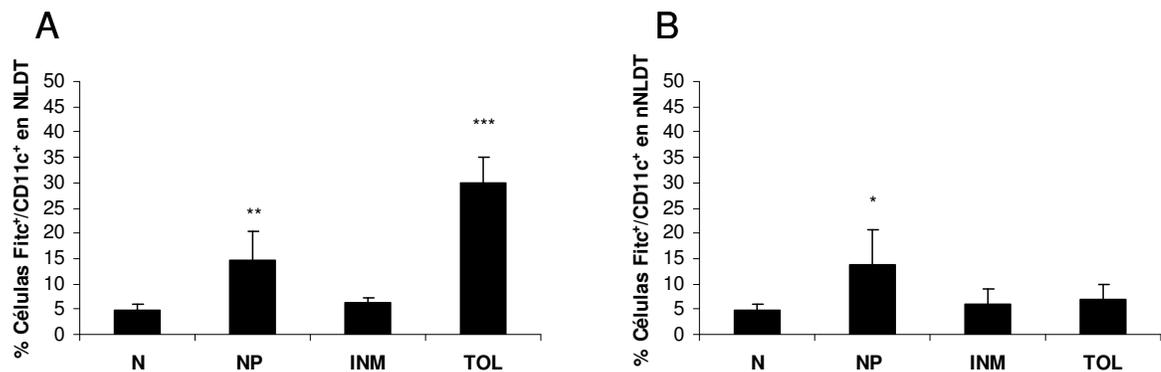


Figura 4: Ensayo de fagocitosis: Las barras muestran el porcentaje de las células CD11c+ de los ganglios drenante (A) y distal (B) que fagocitaron Fitc- Dextran de un experimento representativo (n = 3 - 4 ratones / grupo).

ii. Ensayo de inducción de la proliferación alogeneica

Estudiamos la capacidad de células de NLs de ratones portadores de MCC de inducir proliferación alogeneica. Como células target utilizamos células de ganglio de la cepa C57. Observamos que las células provenientes de los NLDT ó nNLDT en estadios INM y TOL inducen menor proliferación alogeneica que aquellas células obtenidas de ratones normales. Notoriamente la menor inducción de proliferación ocurre a pesar de que las CPA presentan alta expresión de MHCII, sugiriendo la existencia de algún factor inhibitorio o tipo celular interfiriendo en la proliferación. Como la producción de IL-10 es uno de los mecanismos inhibitorios habituales utilizados por células B y CDs en portadores de tumor^{185,55,186}, repetimos el ensayo bloqueando la acción de esta citoquina. En estas condiciones se produjo la reversión de la inhibición, y la proliferación alcanzó los valores normales (Figura 5).

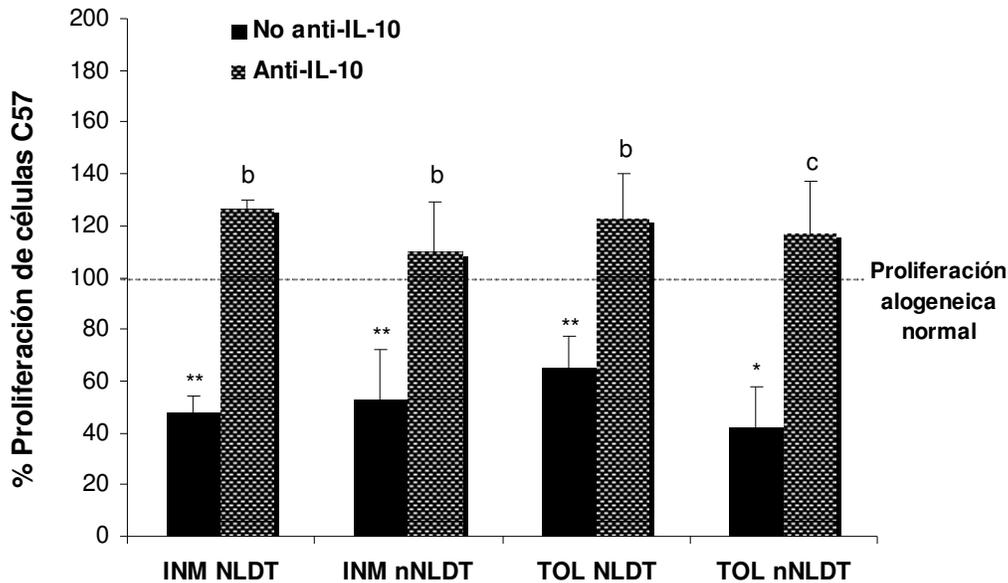


Figura 5: Ensayo de proliferación alogeneica. Las barras muestran la proliferación de las células C57BL/6 (cpm) obtenida en presencia de células de ganglio de ratones portadores de tumor en los distintos estadios. El 100 % de proliferación se asignó a la proliferación obtenida en presencia de células de ratones normales. Las barras negras y grises representan la proliferación de las células C57 en ausencia o presencia del anticuerpo neutralizante de IL-10, respectivamente (^bp<0,01 y ^cp<0,001 barra negra vs barra gris. * p<0,05 células de ganglio de portadores vs células de ratón normal).

iii. Ensayo de captación de antígeno y migración – Reacción de hipersensibilidad por contacto.

Este método ha sido previamente propuesto como una forma de estudiar el efecto de la presencia del tumor sobre la función de las APC¹⁸⁷.

Para poner a punto la técnica, confirmamos que al topicar la piel sobre un flanco, no se observa migración de células marcadas dentro del ganglio del flanco contralateral (Figura 6). Esto nos permitió realizar el experimento topicando en ambos flancos (cerca y lejos del tumor) simultáneamente.

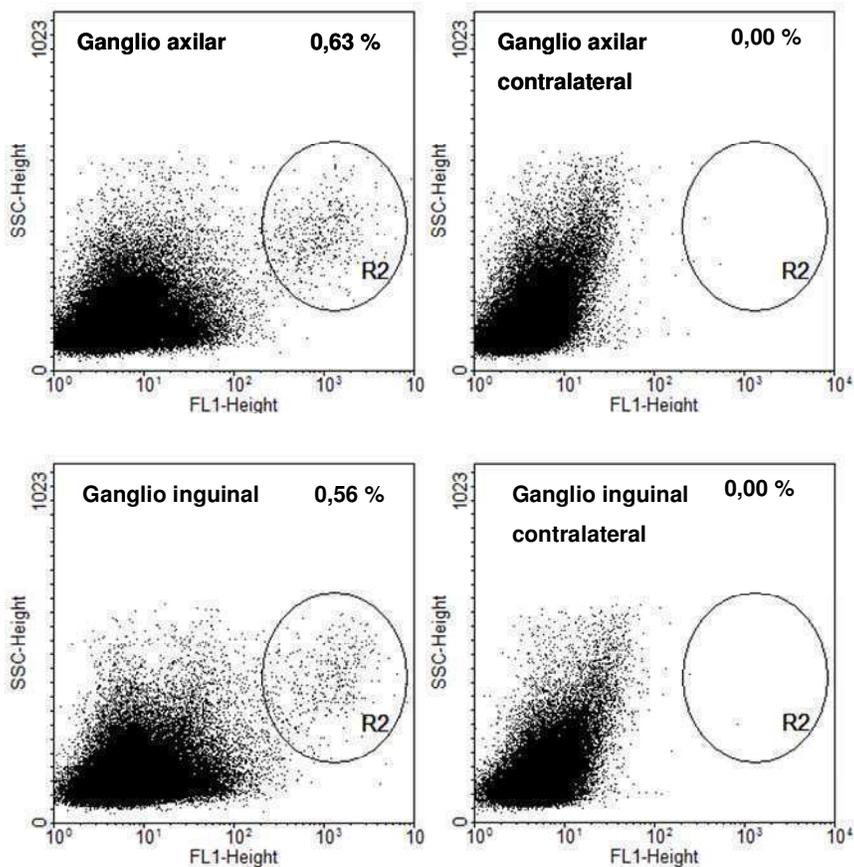


Figura 6: Ensayo preliminar de la técnica en nuestro modelo. Se realizó la topicación con DBF-Fitc sobre uno de los laterales de los animales y se analizó a las 24 horas la presencia de células Fitc⁺ en los ganglios axilares e inguinales del lado del tóxico y del lado contralateral.

Al topicar los ratones portadores de tumor MCC en el flanco en el que se encuentra el tumor y en la zona contralateral, se observa un aumento en el número de células de los ganglios correspondientes, y en particular, un aumento en la llegada de CDs Fitc⁺ y linfocitos B Fitc⁺, es decir que estas células captaron el antígeno en superficie y migraron al ganglio correspondiente (Figura 7). Este fenómeno ocurre tanto en las fases de INM como TOL indicando que la cercanía del tumor o el estadio en que este se encuentra, no afecta particularmente a estas dos funciones de las CPAs. Sin embargo, cabe destacar que dentro de las CDs que adquirieron FITC en INM y TOL, un elevado porcentaje corresponde a CDs que expresan B220, es decir con posible fenotipo tolerizante (no se muestra). Finalmente, observamos en las fases INM y TOL

un aumento del número de linfocitos T CD4+ (Figura 8), importantes para generar una reacción inmune.

En una segunda instancia, analizamos la capacidad de generar una respuesta de hipersensibilidad por contacto en los animales portadores de tumor. Realizamos un protocolo similar al anterior pero esta vez topicamos sobre el ganglio drenante o distal al tumor en animales separados. Seis días después se topicó la superficie de la oreja y se registraron los cambios producidos en su diámetro, como medida de respuesta al antígeno, a las 48 hs. La reacción desencadenada en el ratón portador durante la fase INM fue menor a la observada en el animal control cuando la topicación se realizó sobre el NLDT. En cambio, la topicación sobre el ganglio distal produce una reacción comparable al control. En el estadio avanzado la inhibición de la reacción se encuentra tanto al topicar en la zona del NLDT como del nNLDT (Figura 9). Estos resultados sugieren que la cercanía del tumor resulta en la inhibición de alguno de los pasos de montaje de la respuesta inmune y que, a medida que el tumor progresa, la inhibición se torna sistémica.

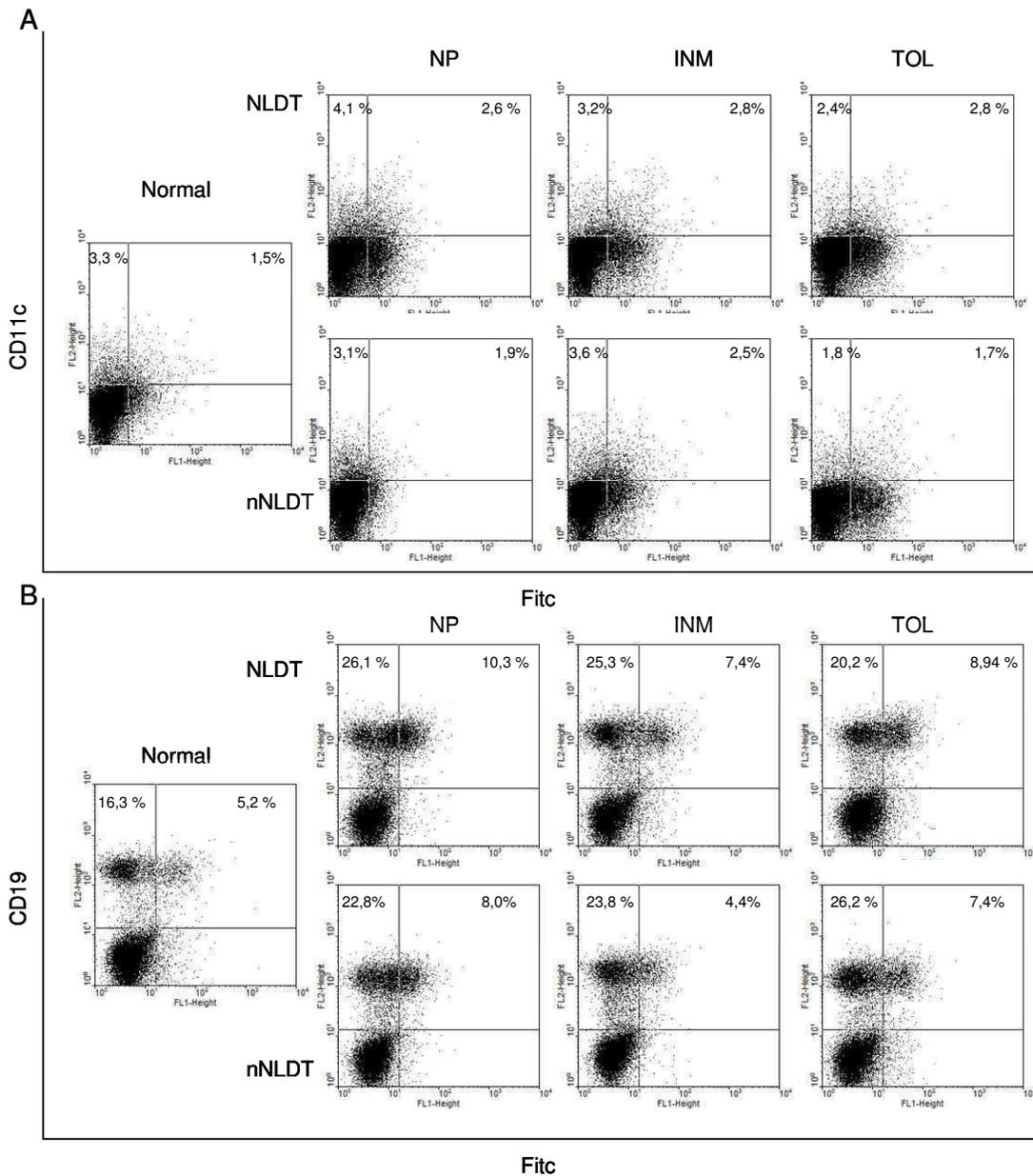


Figura 7: Células CD11c+Fitc+ y CD19+FITC+ encontradas en los ganglios luego de la topicación con DBF-Fitc. Los ratones se topicaron con una solución de DBF-Fitc en ambos flancos y los ganglios inguinales próximos al área del tópicico fueron analizados a las 24 horas. A-B) Dot plots representativos, se muestran porcentajes de cada uno de los cuadrantes.

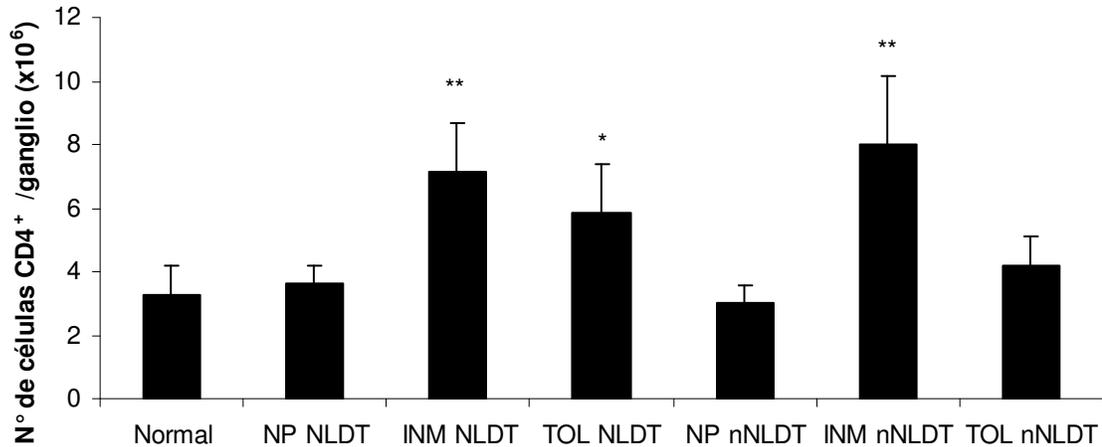


Figura 8: Número de células CD4+ encontradas en los ganglios luego de la topicación con DBF-Fitc. Los ratones se topicaron con una solución de DBF-Fitc en ambos flancos y los ganglios inguinales fueron analizados a las 24 horas. Las barras indican la media \pm SD de un experimento representativo (n = 3-5 ratones por grupo. *vs Normal).

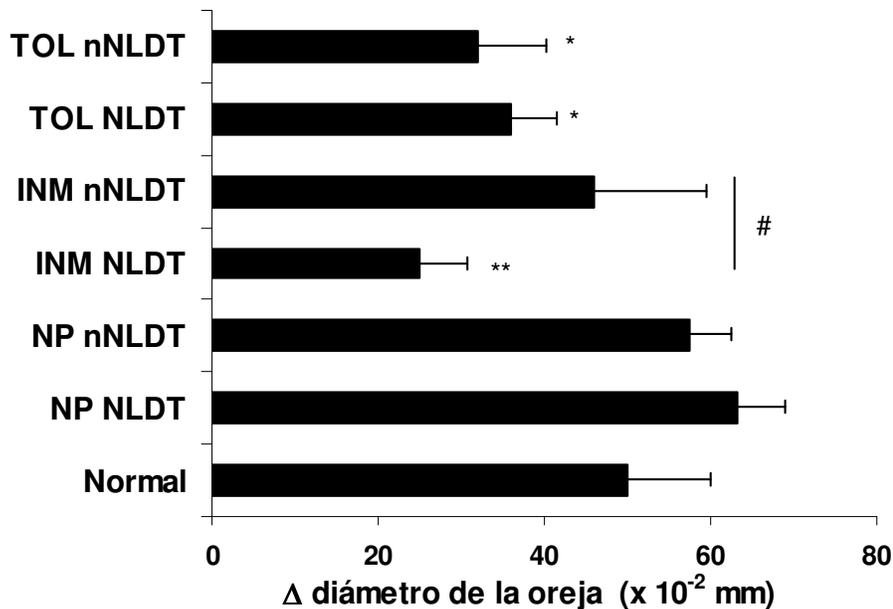


Figura 9: Reacción de hipersensibilidad por contacto. Luego de 6 días del tóxico inicial, se topica sobre la oreja. El grosor de la oreja fue medido con calibre antes y después (48 horas) del segundo tóxico. Los valores representan la media del cambio en el grosor \pm SD de un experimento reproducible (n = 3 – 5 ratones por grupo; *p<0,05 INM_{NLDT} vs INM_{nNLDT})

Conclusión parcial

Los resultados hasta aquí sugieren que el crecimiento del MCC induce la disfunción de las CPAs (linfocitos B y CD8); la misma se evidencia por la expresión de marcadores de inmadurez y la inhibición de inducción de respuesta T. Esta inhibición sería más temprana en las cercanías del tumor y luego, sistémica. La producción de IL-10 sería uno de los mecanismos responsables.

1.1.2 Linfocitos T

Analizamos el fenotipo y función de las células T CD4+ y CD8+ en los tres estadios del crecimiento tumoral presentes tanto en ganglio drenante del tumor como en el ganglio distal.

A) Cambios en el fenotipo

Dentro de la población de células CD4+, observamos un aumento en la proporción de células activadas (CD25+Foxp3-) en las fases de NP e INM dentro de ambos ganglios. Por el contrario, en TOL sólo se observan aumentos en la proporción de células CD4+CD25+Foxp3+ (Treg) y de células CD4+CD25-Foxp3+ descritas como reservorio de células Treg¹⁸⁸ o Treg en división¹⁸⁹ (Figura 10).

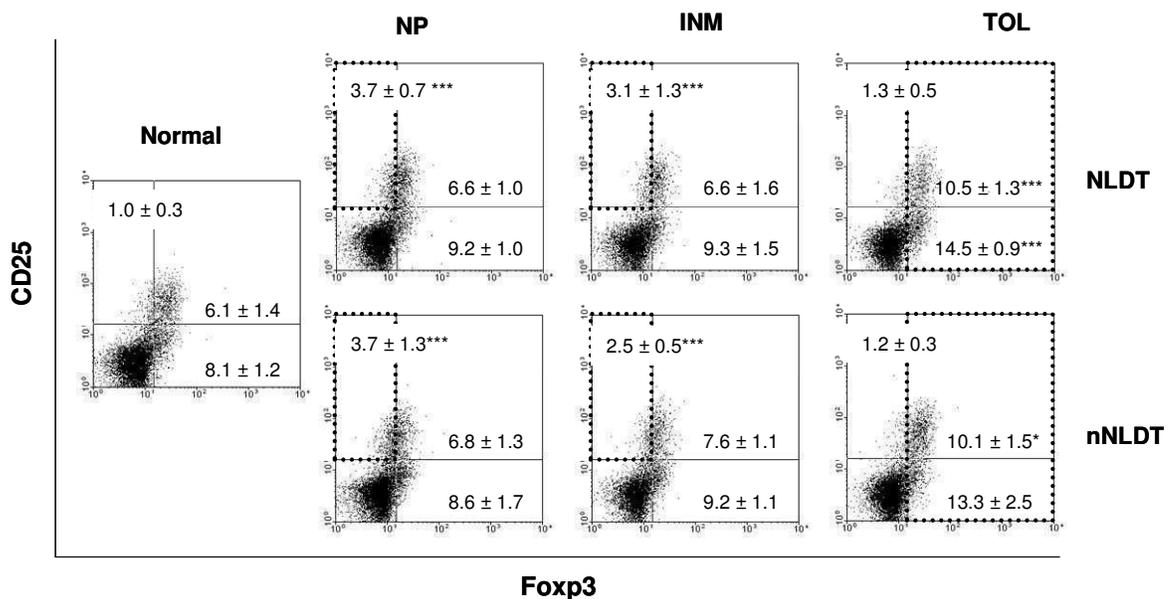


Figura 10: Fenotipo de los linfocitos T CD4+ presentes en los ganglios. Se analizó por citometría de flujo la presencia de células activadas y regulatorias en los ganglios de ratones portadores de tumor y normales. Se muestran los dot plots representativos de un experimento reproducible. Los valores corresponden a las proporciones de cada subpoblación dentro de las células CD4+ (n = 3 – 5 ratones por grupo).

Dentro de la población T CD8+, se produce un aumento en el número de células expresando CD25 sugiriendo activación en las fases NP e INM sólo a nivel del ganglio

drenante (Figura 11). Asimismo hallamos aumentos en la expresión de CD44 en las fases INM y TOL reflejando la presencia de células que ya han tenido contacto con el antígeno (IFM CD44 en NLDT: N: 245 ± 30 NP: 267 ± 33 INM: $417 \pm 26^{**}$ TOL: $455 \pm 41^{**}$, $n = 3$ ratones por grupo). La expresión de Foxp3 en células CD8 fue negativa en todos los estadíos.

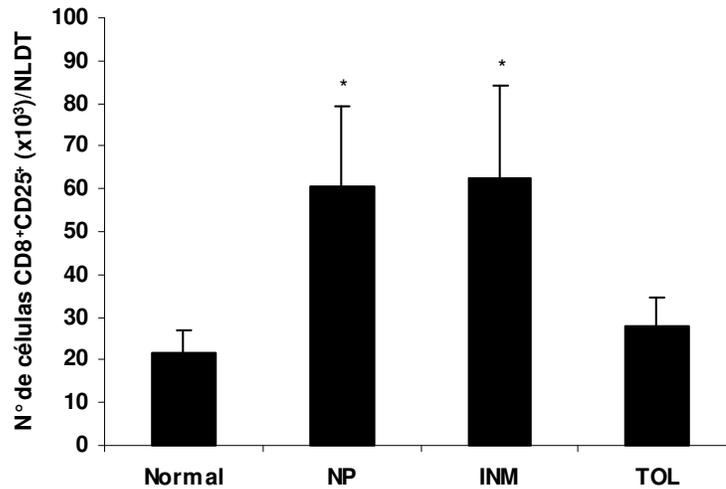


Figura 11: Número de células CD8+CD25+ en ganglio drenante. Se analizó por citometría de flujo la presencia de células CD8+ activadas en los ganglios de ratones portadores y normales. Las barras indican la media \pm SD del número de células CD8+CD25+ de un experimento reproducible ($n = 3$ ratones por grupo).

B) Cambios en la funcionalidad de linfocitos T

i. Citotoxicidad

La capacidad citotóxica contra células del tumor MCC se analizó mediante dos técnicas. En primer lugar estudiamos la citotoxicidad inducida por células aisladas de NLDT y nNLDT sobre cultivos de MCC. Observamos que las células de los NL de portadores en todas las fases presentan mayor actividad citotóxica que aquellas de un ratón normal (Figura 12).

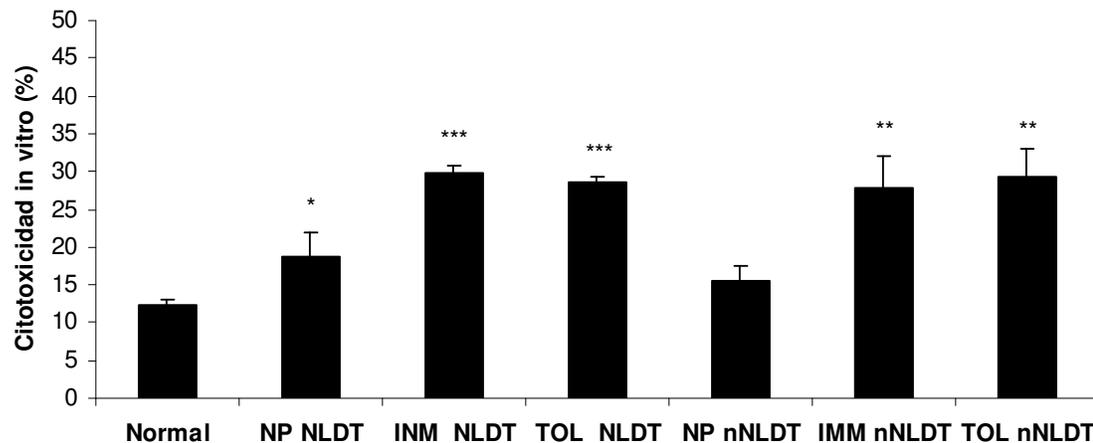


Figura 12: Citotoxicidad anti-MCC *in vitro*. Se extrajeron NLDT y nNLDT de ratones portadores en los distintos estadios y de ratones normales y se evaluó la citotoxicidad específica frente a células MCC previamente marcadas con timidina tritiada. Las barras indican la media del porcentaje de citotoxicidad específica \pm SD de un experimento representativo (n = 3 ratones por grupo).

Por otro lado, realizamos un ensayo de citotoxicidad *in vivo* donde células esplénicas de ratones normales se pre-cultivaron en presencia o ausencia de antígeno tumoral. Luego, se marcaron diferencialmente y se inocularon en ratones portadores y controles (no portadores e inmunizados -control positivo-). Sólo se observó una pequeña actividad citotóxica en NP (Figura 13).

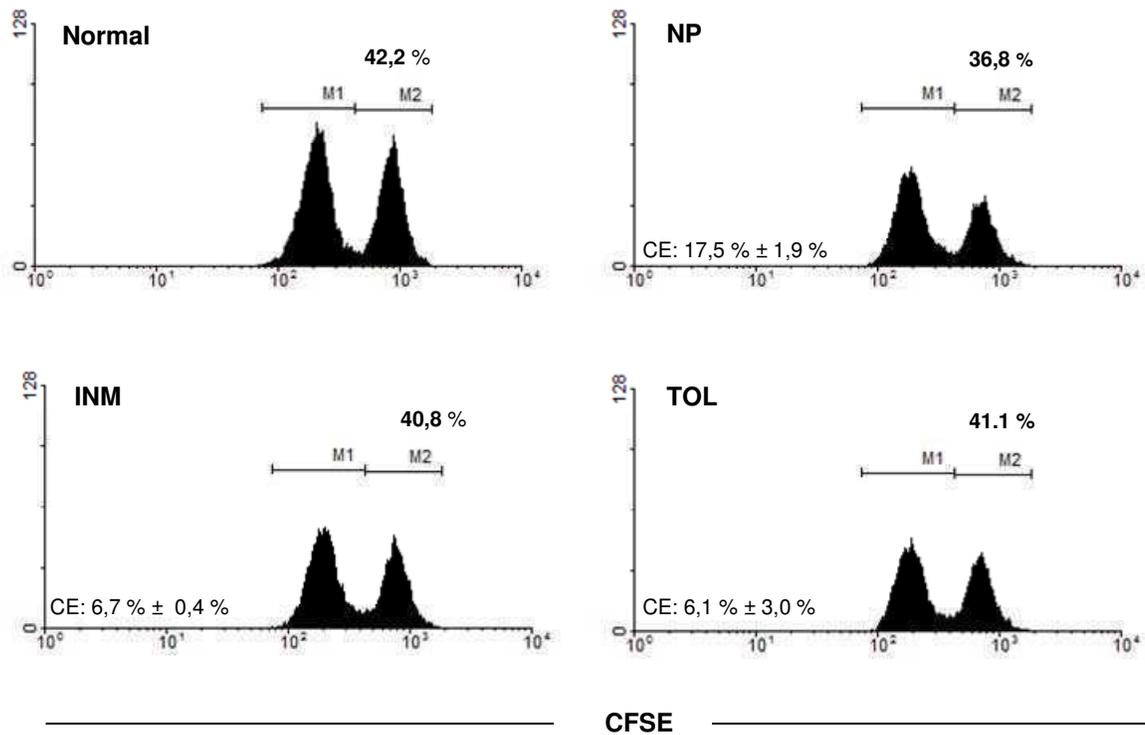


Figura 13: Citotoxicidad anti-MCC *in vivo*. Se inocularon los ratones con una mezcla de células esplénicas marcadas diferencialmente con CFSE (pulsadas “CFSE^{hi} – M2” y no pulsadas “CFSE^{low} – M1” con antígeno tumoral). A las 48 horas se analizó por citometría de flujo la presencia de células CFSE⁺ en bazo. Los histogramas representativos muestran las frecuencias relativas de ambas poblaciones (CE: citotoxicidad específica n = 3 ratones por grupo).

ii. Capacidad inhibitoria de las células T regulatorias

La inhibición de la función y proliferación de las células T efectoras por parte de las células T regulatorias (Treg) constituye uno de los mecanismos más descritos de escape tumoral. Dado que en nuestro sistema detectamos un aumento en el número de células Treg con el crecimiento tumoral, analizamos su capacidad de inhibir la proliferación. Para ello, aislamos células CD4⁺CD25⁺ y evaluamos su efecto inhibitorio sobre la proliferación de células CD4⁺CD25⁻ en presencia de anti-CD3 e IL-2. Observamos una muy notable inhibición de la proliferación tanto en las células aisladas de NLDT (Figura 14) como de nNLDT.

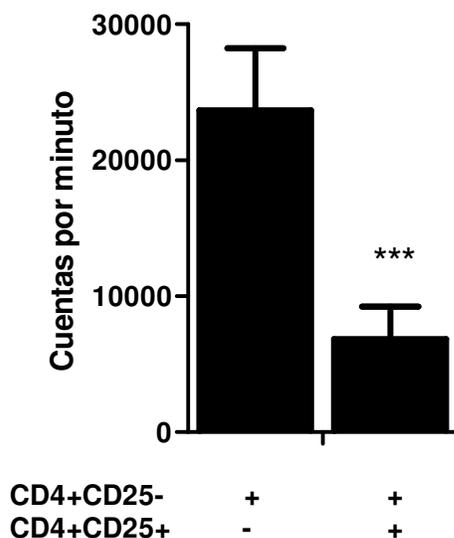


Figura 14: Capacidad inhibitoria de las células Treg. Se aislaron células CD4+CD25- y CD4+CD25+ a partir de la suspensión celular del NLDT en INM. Las barras muestran la actividad inhibitoria de las células CD4+CD25+ sobre la proliferación de CD4+CD25- estimuladas con anti-CD3 y anti-CD28. Se muestra un experimento representativo (n = 6). Similares resultados se obtuvieron para nNLDT.

1.2 Patrón de citoquinas

La combinación de citoquinas secretadas por distintas poblaciones celulares determinará el tipo de respuesta, en nuestro caso, pro-tumoral o anti-tumoral. Para terminar de comprender los cambios inmunológicos que se producen en los portadores de MCC dosamos por ELISA: IL-10, IFN γ , IL-12 y TGF β en sobrenadante de cultivo de tumor, sobrenadante de cultivo de linfocitos aislados de NLDT y nNLDT y en suero de portadores. Asimismo analizamos, mediante citometría de flujo, la presencia de IL-10 e IFN γ intracelular en linfocitos T, B y CDs. Respecto de las citoquinas inmunoestimuladoras, no detectamos IL-12 ni IFN γ en los sueros de los ratones portadores en ninguno de los estadios, ni en los sobrenadantes de cultivo de NLDT estimulado con extracto acelular MCC, ni en sobrenadante de cultivo primario de MCC. Respecto a las citoquinas inmunosupresoras, el tumor secreta TGF β (1988 \pm 604 pg/ml); también hallamos TGF β en suero de ratones portadores de tumor en estadios

INM y TOL (2883 ± 536 y 2838 ± 610 pg/ml, respectivamente). Por otra parte, las células de NLDT y nNLDT estimuladas con extracto acelular de MCC producen IL-10 (Normal 235.3 ± 25 ; INM_{NLDT} , $367.2 \pm 45^{***}$; INM_{nNLDT} $354 \pm 41^{***}$; TOL_{NLDT} $367.2 \pm 17^{***}$; TOL_{nNLDT} $310.7 \pm 12^{**}$ pg/ml IL-10); idénticos resultados se obtuvieron al dosar IL-10 por RT-PCR.

Por otro lado analizamos la presencia de IL-10 e IFN γ en distintos tipos celulares (Figura 15 A). No hallamos IL-10 en Tregs ni en CD8. En cambio los linfocitos B presentes en ambos NL mostraron un marcado aumento en la expresión intracelular de IL-10, durante INM y TOL (Figura 15 B). Ello sugiere que la población responsable de la producción de IL-10 en nuestro sistema serían las células B. Observamos un aumento en el número de células T CD4+ y TCD8+ que expresan IFN γ durante INM en ambos ganglios, sugiriendo una posible actividad citotóxica que involucre células CD8 efectoras y CD4 helper tanto distalmente como en la cercanía del tumor.

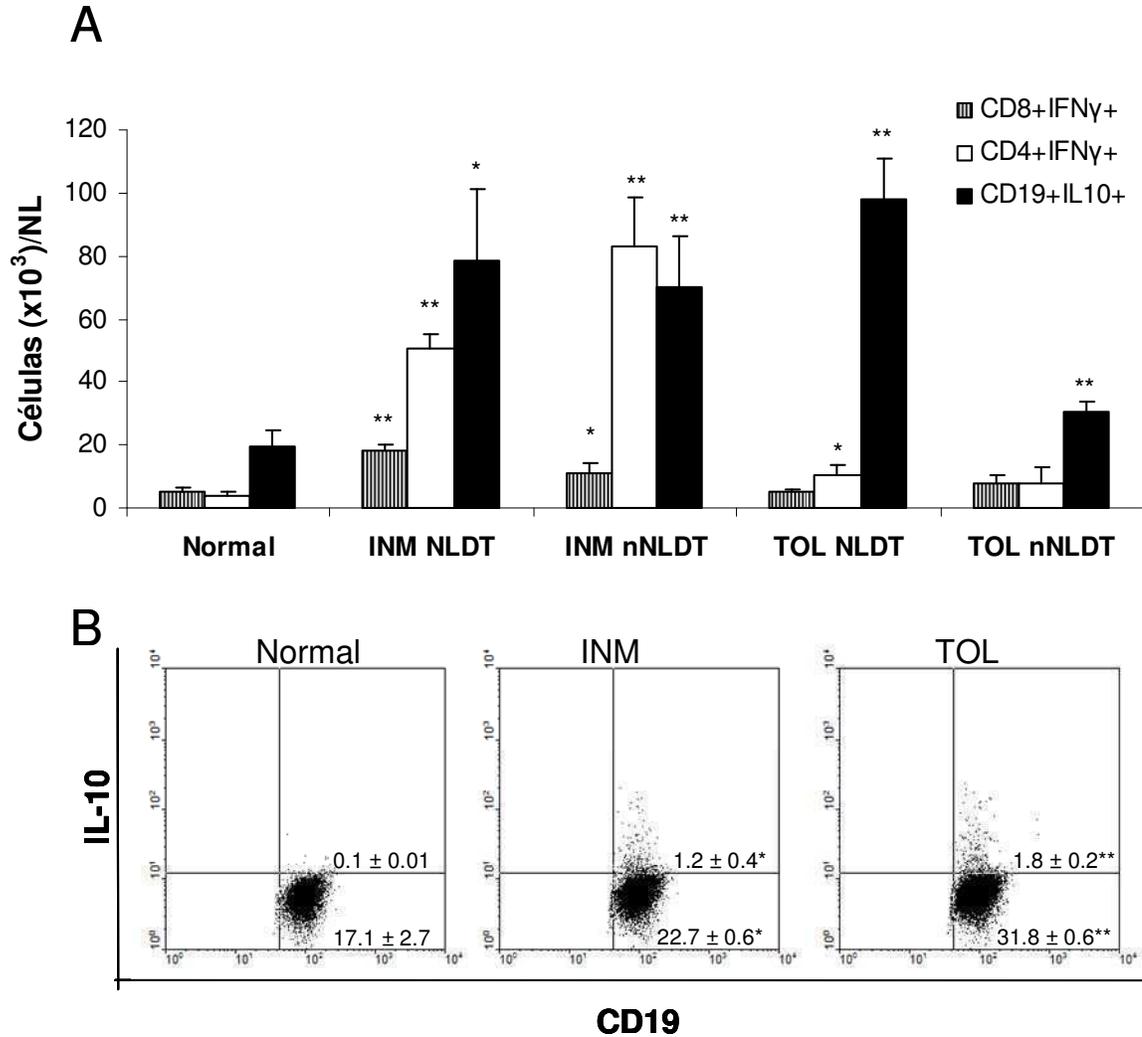


Figura 15: Expresión intracelular de citoquinas en las células de ganglio linfático. Se analizó por citometría de flujo la presencia intracelular de IFN γ e IL-10 en linfocitos T CD4, T CD8 y B. A) Se muestra un experimento representativo indicando el número de células CD4 y CD8 expresando IFN γ y de células B expresando IL-10 (n = 3 – 5). B) Se muestran Dot plots de la marcación de IL-10 en células B. Se indican porcentajes de células en ganglio total.

Conclusión parcial

La presencia del tumor induce cambios a nivel de las poblaciones inmunes presentes en los NL. Dichos cambios son detectables inicialmente en forma local y más tardíamente en forma sistémica. Consisten en una activación temprana de células CD4 y CD8 que coexiste con la presencia de células dendríticas inmaduras y plasmocitoides. Un aumento de células B productoras de IL-10, células T regulatorias, la inhibición de la proliferación alogeneica mediada por IL-10, la imposibilidad de generar una respuesta de hipersensibilidad por contacto y el TGF β secretado principalmente por el tumor completan el panorama de tolerancia que se va generando durante el crecimiento del tumor MCC.

2- Elaboración de una terapia inmunológica

Luego de conocer el sistema inmune de los portadores analizamos si era factible inhibir el crecimiento tumoral modulando el sistema inmune para provocar un desbalance ya sea aumentando el número de células activadas como restringiendo el componente regulatorio presente en el portador. Como ya se ha expuesto, los NLDT son considerados el lugar central donde se origina la tolerancia y de hecho en nuestro sistema hallamos que allí es efectivamente donde se comienzan a observar la mayoría de los signos inmunosupresores que rápidamente son encontrados también a nivel de los ganglios distales. Como en la fase de INM aún hallamos signos de activación inmune fuera de NLDT, evaluamos la utilidad de extirpar el NLDT en dicha fase para eliminar un incipiente foco de inmunosupresión.

2.1 Extirpación de NLDT (LNx)

Realizamos la extirpación del NLDT durante las fases INM ó TOL. Contrariamente a lo que esperábamos, la linfadenectomía (LNx) realizada en INM indujo una marcada exacerbación del crecimiento tumoral, sugiriendo que elementos antitumorales importantes para limitar el crecimiento podrían haber sido eliminados con la LNx (Figura 16). Al efectuar el mismo procedimiento en ratones con tumor avanzado (TOL), no se alteró el crecimiento tumoral.

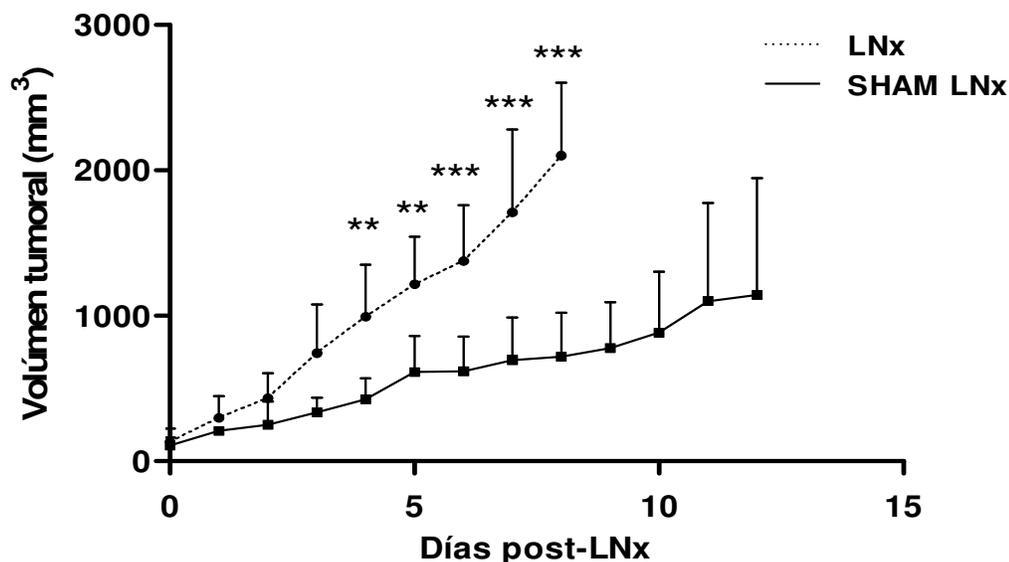


Figura 16: Efecto de la ablación del ganglio drenante sobre el crecimiento tumoral. Ratones portadores de tumor en INM fueron operados y se les extrajo el ganglio drenante. El volumen tumoral fue registrado diariamente. Los ratones fueron sacrificados al alcanzar un volumen de 2500 mm³. Se muestra un experimento representativo (n = 7 – 9, *LNx vs *Sham* operados).

2.2 Terapia combinada: Ciclofosfamida (Cy) + LNx + Transferencia adoptiva (TA).

Luego de los resultados hallados al realizar la linfadenectomía era claro que las células del ganglio drenante son necesarias para restringir el crecimiento del tumor MCC. Pensamos en restituir dichas células efectoras a través de su transferencia adoptiva, cultivándolas previamente con anti-CD3 e IL-2, un procedimiento que *ex vivo* aumenta la proporción de células citotóxicas¹⁹³. Además con el fin de disminuir los elementos inmunosupresores presentes en el portador y dado su conocido efecto negativo sobre las células Treg^{194,164} se administró una dosis baja de ciclofosfamida (Cy) cuatro días antes de realizar la linfadenectomía.

Al aplicar este protocolo observamos que un 63% de los ratones portadores tratados presentaron una completa regresión del tumor. No se observaron recurrencias y los animales quedaron inmunizados de modo que rechazaron subsecuentes desafíos del

tumor MCC. Más aún, los tumores que no regresionaron mostraron un menor crecimiento que aquellos del grupo no tratado (Figura 17). Además, el tratamiento completo indujo un aumento significativo de la sobrevida (Figura 18). Como controles, se utilizaron animales portadores de tumor MCC sin tratar y parcialmente tratados (Cy, LNx, Cy + LNx, LNx + TA). En ninguno de dichos grupos se observó regresión tumoral y sólo en el grupo Cy + LN se halló un aumento en la tasa de sobrevida.

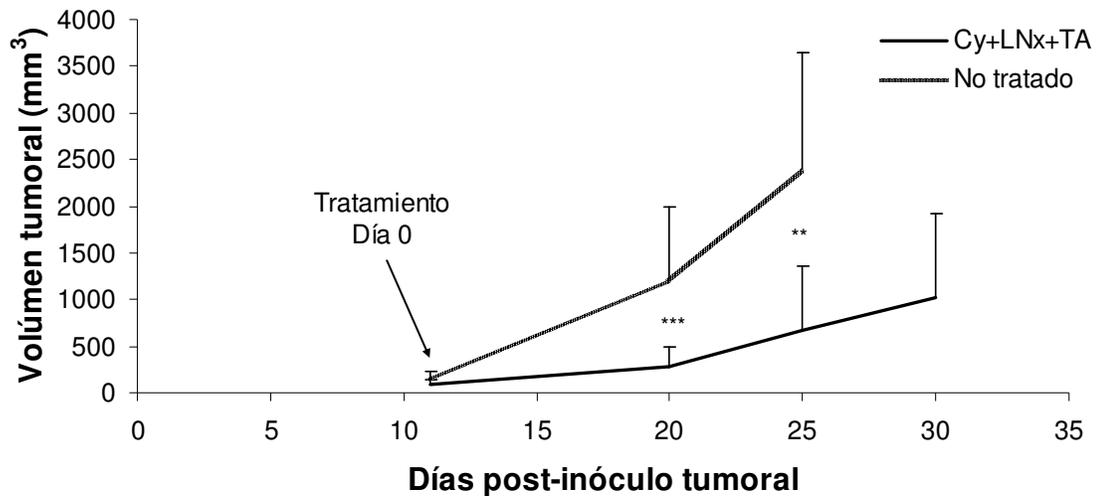


Figura 17: Curva de crecimiento tumoral. Se administró ciclofosfamida (Día 0 de tratamiento). Las células del ganglio se cultivaron con anti-CD3 e IL-2 y se las re-inoculó e.v. en los portadores linfadenectomizados. Se muestra un experimento representativo.

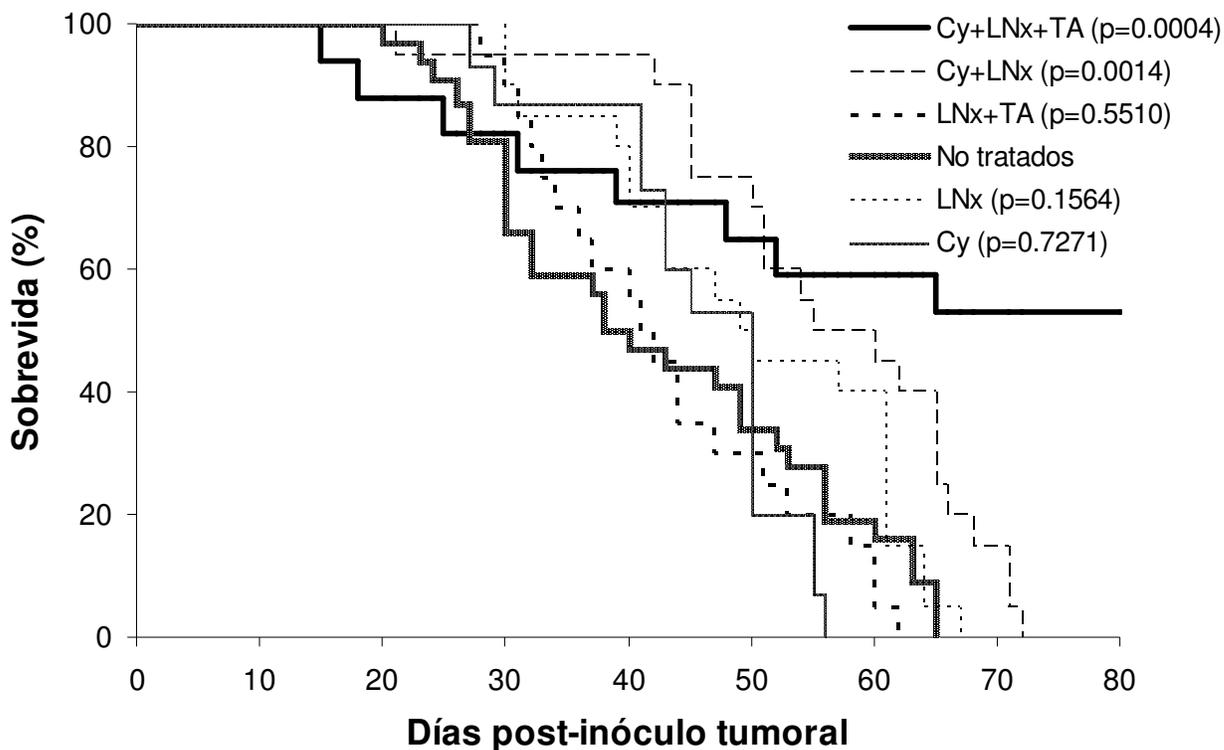


Figura 18: Curva de supervivencia tumoral. La supervivencia de los ratones tratados completamente, parcialmente tratados y no tratados se ha registrado durante 80 días (15-32 animales por grupo, los números en el gráfico indica la significancia estadística vs el grupo no tratado).

2.3 Mecanismos involucrados en la regresión tumoral inducida por la inmunoterapia

2.3.1 Efecto sobre la fórmula leucocitaria

Los ratones portadores de MCC poseen una fórmula leucocitaria invertida en comparación a lo que se encuentra en ratones normales (Tabla 1 - Día 0). En los ratones tratados observamos que, en aquellos que respondieron al tratamiento positivamente, la fórmula leucocitaria va tendiendo a la hallada en ratones normales (Tabla 1 - Día 25). La administración de ciclofosfamida, en las dosis utilizadas, induce

un cambio transitorio en la fórmula leucocitaria de un portador aproximándola a la hallada en ratones normales (Tabla 1 - Día 6).

		Normal	Portadores (Día 0: 11 días p.i)			
			No tratados	Tratados		CY
				Responden	No responden	
Día 0	Linfocitos	75 ± 9.9	33.5 ± 4.9	36.5 ± 7.8	31.0 ± 9.9	33.7 ± 7.9
	Neutrofilos	21.5 ± 7.8	64.5 ± 4.9	63.5 ± 7.8	69.0 ± 9.9	66.2 ± 7.9
	Monocitos	3.5 ± 2.1	2.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Día 6	Linfocitos		24.0 ± 2.8	42.0 ± 9.9	23.5 ± 16.3	63.9 ± 9.6
	Neutrofilos		72.0 ± 1.4	54.0 ± 8.5	69.0 ± 25.4	33.6 ± 9.9
	Monocitos		4.0 ± 1.4	4.0 ± 1.4	2.5 ± 2.1	3.1 ± 3.2
Día 14	Linfocitos	64.3 ± 3.2	23.2 ± 3.9	49.9 ± 23.5	21.9 ± 11.4	27.6 ± 8.7
	Neutrofilos	33.6 ± 4.3	74.1 ± 3.7	46.7 ± 23.4	73.7 ± 7.6	64.1 ± 10.7
	Monocitos	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.2	3.3 ± 0.1	4.4 ± 3.8	2.7 ± 2.7
Día 25	Linfocitos		Muertos	53.3 ± 0.7	27.2 ± 8.5	16.8 ± 4.5
	Neutrofilos			42.3 ± 0.35	70.3 ± 9.3	81.1 ± 2.5
	Monocitos			3.5 ± 0.9	2.0 ± 0.3	2.1 ± 1.9

Tabla 1: Fórmula leucocitaria. Se realizó el seguimiento de los cambios producidos en la fórmula leucocitaria durante el tratamiento, se realizaron extendidos de sangre y se les realizó tinción de May Grünwald – Giemsa.

2.3.2 Efecto del tratamiento sobre el patrón de citoquinas

Analizamos si el éxito del tratamiento se veía reflejado en el nivel de citoquinas detectado en suero. Si bien no hallamos valores detectables de IFN γ , IL-12 e IL-10, que tampoco habían sido detectados en ratones portadores no tratados, los niveles de TGF β se encuentran disminuidos en aquellos ratones cuyo tumor se encuentra en regresión (Figura 19). Probablemente la mejor explicación a estos resultados sea la disminución del volumen tumoral que como ya hemos descrito es la mayor fuente, si no la única, de secreción de esta citoquina en nuestro sistema.

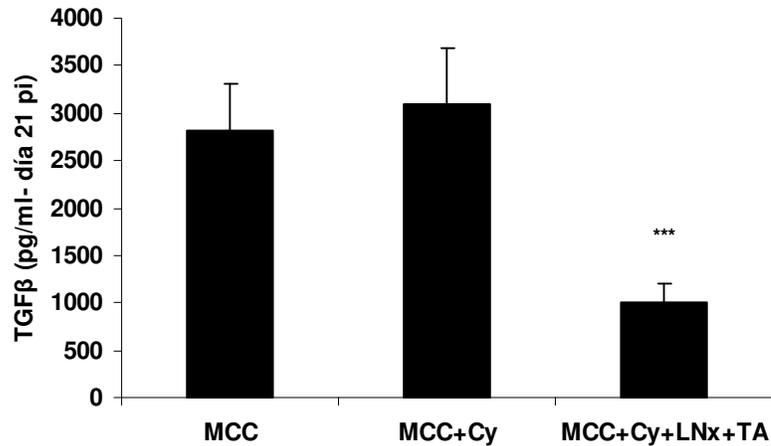


Figura 19: Dosaje de TGFβ. Se dosó por ELISA la concentración de TGFβ presente en suero de ratones portadores, tratados con ciclofosfamida o tratados completamente (n = 6 ratones por grupo).

2.3.3 Efecto de la administración de Cy *in vivo*

Para ver que mecanismos operaban en el tratamiento evaluamos los efectos de administrar *in vivo* 50 mg/kg de Cy sobre el número de células potencialmente supresoras en nuestro sistema, B y Treg, presentes en el ganglio contralateral. A los 4 días (momento en que se realiza la LNx) observamos una disminución en el número total de células B, B expresando IL10 y Treg. La disminución en el día 9 (momento de la TA) ya es significativa (Figura 20). Aún más, las células Treg aisladas de ratones tratados con ciclofosfamida no son capaces de inhibir proliferación de células CD4+CD25- (no se muestra).

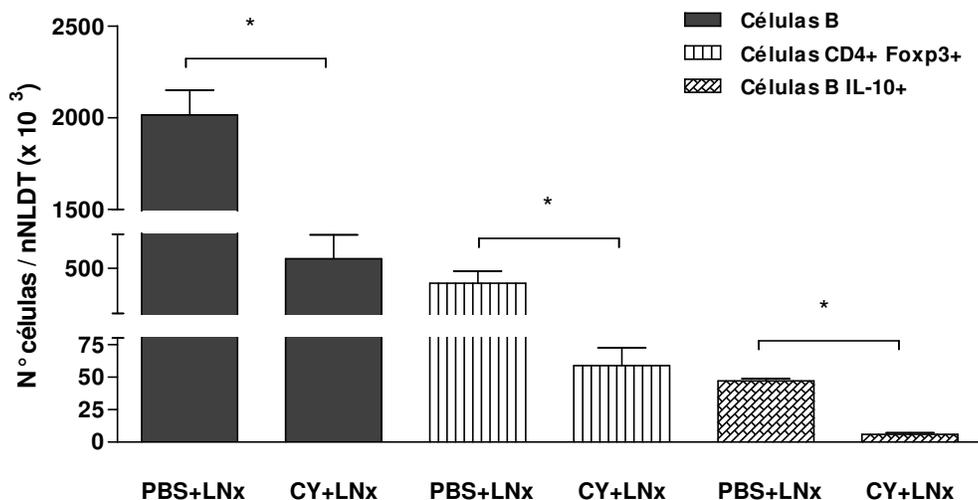


Figura 20: Efecto de la ciclofosfamida sobre las células de nNLDT. Al día 9 del tratamiento se analizaron las poblaciones B IL10+ y Tregs halladas en el ganglio distal. Las barras indican la media del número de células \pm SD de un experimento representativo (n = 4 – 6 ratones por grupo).

2.3.4 Efecto del cultivo con anti-CD3 e IL-2 sobre las células de NLDT

A) Composición celular

Analizamos el efecto de anti-CD3 e IL-2 en el cultivo de células de NLDT. Mientras que las células de ganglios de ratones tratados con ciclofosfamida (4 días luego de la administración) eran mayoritariamente linfocitos B, CD4 y CD8, la exposición ex vivo a anti-CD3 e IL-2 aumentó la proporción de células CD4 y CD8 y disminuyó marcadamente el número de células B (Figura 21 A). Además el cultivo aumentó la proporción de células T expresando IFN- γ (Figura 21 B).

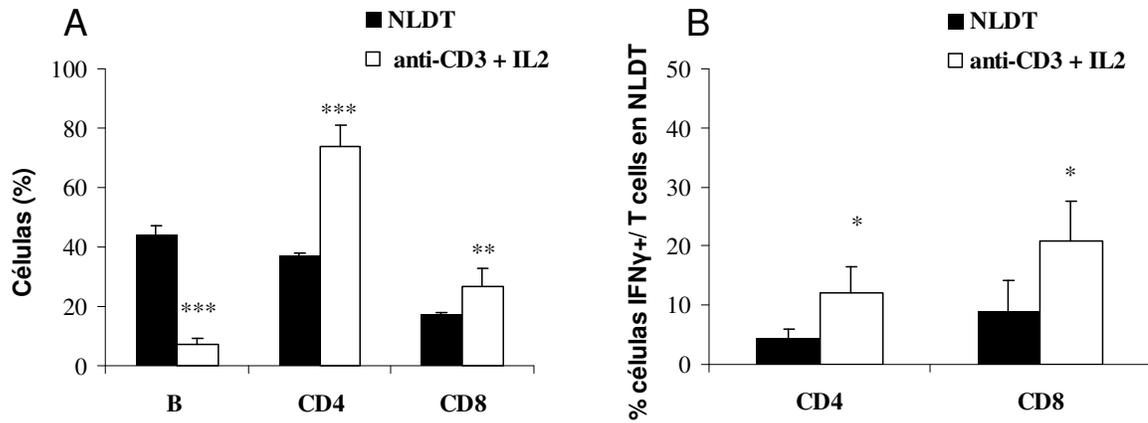


Figura 21: Efecto del cultivo de células de ganglio drenante del tumor en presencia de anti-CD3 e IL-2. Se extrajeron los NLDT de ratones portadores tratados con ciclofosfamida y las células fueron cultivadas en presencia de anti-CD3 e IL-2. Se analizó por citometría de flujo la composición de dichas células antes y después del cultivo. Las barras indican la media \pm SD del porcentaje de células de un experimento representativo (n = 6).

B) Capacidad citotóxica

Las células provenientes del NLDT de ratones tratados con Cy mostraron mayor capacidad citotóxica que aquellas células provenientes del NLDT de ratones controles (ratones naive o portadores de tumor que recibieron PBS). A su vez, el cultivo con anti-CD3 e IL-2 aumentó la actividad citotóxica de las células provenientes de ratones portadores que han recibido PBS pero no modificó la ya elevada actividad citotóxica de células de ratones tratados con ciclofosfamida (Figura 22).

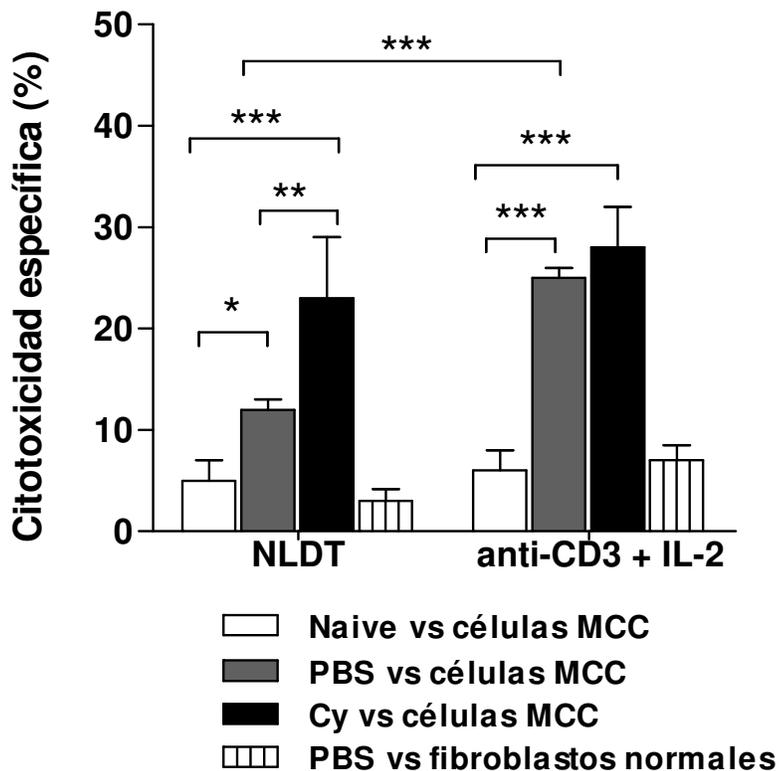


Figura 22: Citotoxicidad anti-MCC de células cultivadas o no con anti-CD3 e IL-2. Se extrajeron células del ganglio drenante de ratones portadores tratados con ciclofosfamida o PBS y de ratones normales. Se evaluó la citotoxicidad específica, de estas células y de células cultivadas con anti-CD3 e IL-2, frente a células MCC. Las barras indican la media del porcentaje de citotoxicidad específica \pm SD de un experimento representativo (n = 3 ratones por grupo).

2.3.5 Localización de las células provenientes de la transferencia adoptiva.

Las células transferidas deben llegar al tumor a cumplir su acción citotóxica o bien a los órganos linfáticos secundarios a favorecer una respuesta inmune tumoral, probablemente mediante la secreción de citoquinas. Por lo tanto, nos era de particular interés conocer el destino y viabilidad de las células transferidas. Luego del cultivo en presencia de anti-CD3 e IL2, las células del NLDT fueron marcadas con CFSE y posteriormente siguiendo el protocolo habitual de tratamiento, las inoculamos en forma

endovenosa en los portadores. A los 7 días hallamos estas células en el bazo, en el ganglio inguinal distal y en el tumor de los ratones tratados (Figura 23).

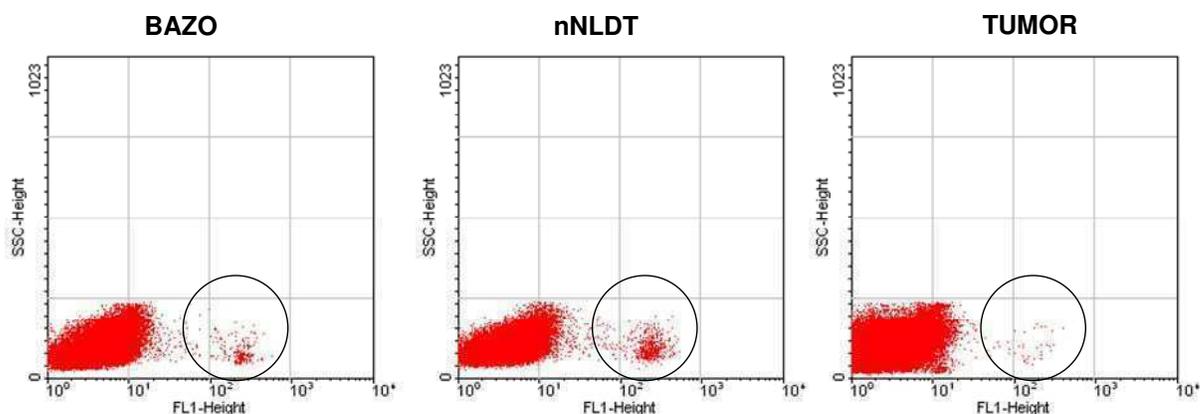


Figura 23: Localización de las células de NLDT luego de la transferencia adoptiva. Se procedió con el protocolo normal de tratamiento. Previamente a la transferencia adoptiva se marcaron las células con CFSE. A los 7 días de la transferencia se detectaron las células en bazo, NL y tumor mediante citometría de flujo. Se muestran Dot plots representativos.

2.3.6 Citotoxicidad anti-MCC en linfocitos de infiltrado tumoral

Como uno de los parámetros de la acción de la inmunoterapia, estudiamos la citotoxicidad específica anti-MCC de linfocitos aislados del infiltrado tumoral. El control utilizado fue un grupo de ratones portadores con volumen tumoral similar al del grupo de ratones tratados que se hallaban en regresión. Observamos que aquellos linfocitos provenientes del infiltrado tumoral de ratones tratados poseen mayor citotoxicidad contra células MCC que aquellos linfocitos que provienen de infiltrado tumoral de ratones portadores no tratados (Figura 24).

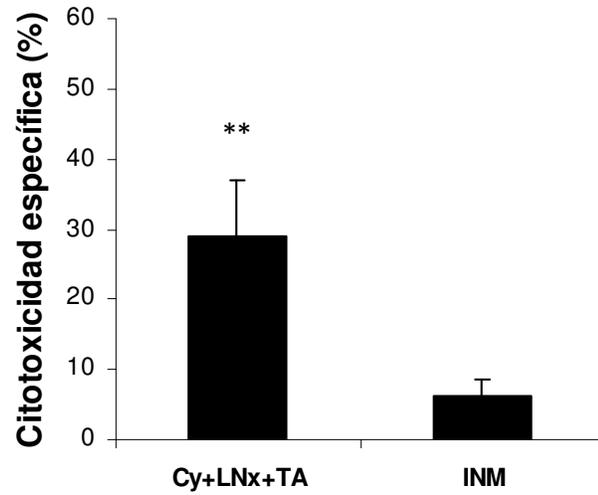


Figura 24: Citotoxicidad anti-MCC *in vitro*. Se aislaron linfocitos del infiltrado tumoral de ratones portadores que recibieron el tratamiento y presentan regresión tumoral y linfocitos de infiltrado tumoral de tumores no tratados de similar volumen. Se evaluó la citotoxicidad específica frente a células MCC. Las barras indican la media del porcentaje de citotoxicidad específica \pm SD de un experimento representativo (n = 5 ratones por grupo).

2.3.7 Cambios histológicos inducidos por el tratamiento

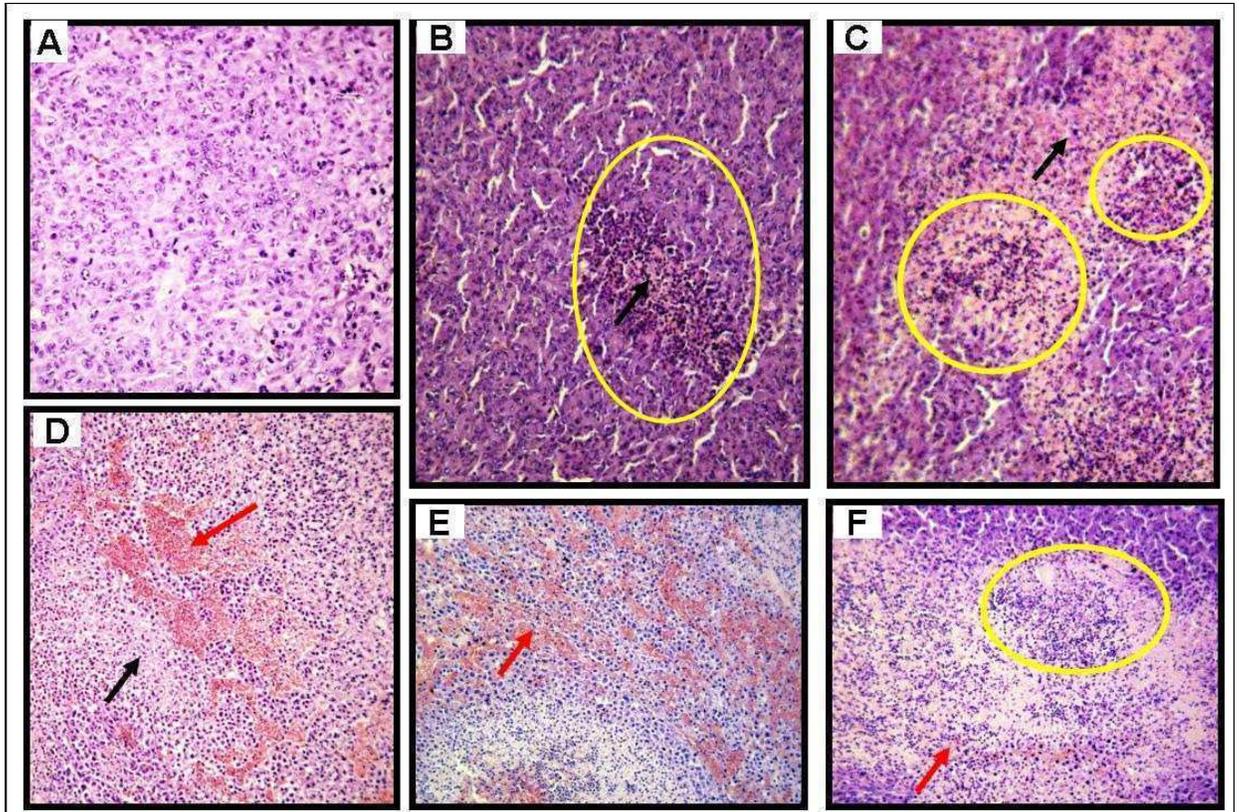


Figura 25: Cortes histológicos del tumor MCC. Tinción Hematoxilina–Eosina. A: Tumor 15 días post- inóculo tumoral (25x). B-F) Tumor 26 días post-inoculo tumoral: B-C) Tratamiento completo a partir del día 11 p.i. (25x). D) No tratado -10x. E) LNx en día 15 p.i. - 25x. F) Cy en día 11 p.i. - 25x. Los óvalos indican infiltrado linfocitario, las flechas rojas indican vasos sanguíneos y las flechas negras zonas necróticas.

El tumor MCC inoculado en forma subcutánea presenta estructura conservada con numerosas figuras mitóticas, muy escaso infiltrado linfocitario y pocas células polimorfonucleares (PMN) (Figura 25 A). En tumores más avanzados se observan áreas necróticas con presencia de vasos congestivos y mayor cantidad de PMN (Figura 25 D). En los tumores de ratones portadores que han sido tratados con la inmunoterapia completa encontramos imágenes incipientes (Figura 25 B) e imágenes más avanzadas (Figura 25 C) de focos de infiltrado linfocitario muy marcados con

zonas necróticas en sus centros, presencia de PMN y una vasculatura conservada. En los tumores provenientes de aquellos ratones portadores a los que se les extirpó el ganglio drenante, observamos la presencia de vasos sanguíneos dilatados y congestivos, escaso infiltrado linfocitario, pocos PMN y escasas zonas necróticas (Figura 25 E). En los portadores tratados con ciclofosfamida, hallamos un tumor conservado con presencia de infiltrado linfocitario tumoral y PMN. Se observa vasculatura conservada y áreas de necrosis (Figura 25 F).

Conclusión parcial

El intento inicial de frenar el crecimiento tumoral eliminando el ganglio linfático drenante como medio de eliminar un sitio de generación de inmunosupresión no arrojó el resultado esperado; por el contrario, exacerbó el crecimiento tumoral. Al suplementar la linfadenectomía con la transferencia adoptiva de las células citotóxicas del ganglio drenante, conjuntamente con la depleción con cilofosfamida de Tregs y B in vivo, se obtuvo un alto grado de protección. Los principales mecanismos involucrados en la regresión inducida por esta inmunoterapia serían la disminución in vivo de células inmunosupresoras (Treg y B), el aumento de la citotoxicidad anti-MCC tanto de las células del NLDT al ser cultivadas con anti-CD3 e IL-2 como de las células del infiltrado linfocitario y por último la disminución de TGF β .

DISCUSIÓN

En individuos normales, la progresión tumoral puede reflejar una falla en la respuesta inmune innata o adaptativa. Muchos tipos de cáncer desencadenan mecanismos supresores que no sólo interfieren con la respuesta antitumoral endógena sino que también disminuyen la eficacia de los tratamientos inmunoterapéuticos (IT). Con el fin de revertir la inmunosupresión asociada al tumor y aumentar el éxito de las IT es necesario un conocimiento profundo de la interacción entre el sistema inmune y el tejido maligno.

El modelo experimental utilizado en este trabajo es un tumor murino, MCC, el cual evoluciona desde un estado de fuerte inmunogenicidad en la fase temprana de crecimiento a una condición no inmunogénica una vez que el tumor se encuentra avanzado¹⁷¹. Inicialmente el MCC genera una potente respuesta antitumoral sistémica (fase inmunogénica o INM), a pesar de la cual el tumor crece, y que progresivamente disminuye estableciéndose un estado de tolerancia inmunológica (fase tolerogénica o TOL)^{195,174}. Si bien este proceso es habitual en la evolución de tumores tanto experimentales como humanos, aún se desconocen importantes aspectos referidos a los mecanismos celulares y moleculares responsables del cambio en la inmunogenicidad de un tumor.

Durante esta tesis, analizamos los cambios inducidos por el tumor sobre las principales poblaciones de células inmunes tanto a nivel de los ganglios drenantes (NLDT) como distales del tumor (nNLDT). Encontramos que la implantación del tumor (fase NP) indujo una activación celular transitoria evidenciada por la expresión de marcadores fenotípicos de activación, principalmente en los ganglios proximales; luego, una vez que el tumor está establecido, en INM y TOL, predominan en ambos ganglios signos de inmunosupresión. Las evidencias encontradas se discuten a continuación.

Las células presentadoras de antígeno (CPAs) y en particular las CDs son elementos importantes en la respuesta antitumoral. La presencia de MHCII en la membrana de las CDs permite activar y modular la respuesta de células T CD4. La implantación del MCC indujo a nivel del NLDT y nNLDT la activación fenotípica de las CPAs (aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras), mientras que más adelante en INM y TOL, las CPAs aumentan la expresión de MHCII sin variaciones en la expresión de las moléculas coestimuladoras, fenotipo característico de CPA inmaduras y/o tolerizantes¹⁸⁴. Dado que una de las características de las CDs inmaduras es que presentan una alta capacidad de captación antigénica, la cual disminuye con la

maduración, evaluamos la capacidad fagocítica de las CD8 en nuestro sistema. Encontramos un incremento en los estadios NP y TOL. La presencia de estas células en ambos estadios podría tener significados distintos: a las 48 horas del inóculo tumoral y tras la señal de su presencia podría darse una mayor salida de las CD8 desde médula ósea y su recirculación en busca de antígenos explicaría su presencia en los ganglios. Cuando el tumor está avanzado, la maduración de las CD8 podría verse impedida por algún factor secretado por el mismo tumor o por la acción de otras células como las Treg.

Además, hallamos células dendríticas con fenotipo plasmocitoide (pCDs) tanto en INM como en TOL. Estas células caracterizadas por expresar CD11c+B220+CD19+ están involucradas en la inhibición de la respuesta T^{46,196}. Tanto las CD8 inmaduras¹⁴¹ como las pCDs son capaces de generar tolerancia a ciertos tumores a través de, entre otros mecanismos, la inducción de T-reg^{197,44}. Si bien no analizamos la correlación directa de estas CPA con la inducción de Treg, la capacidad inhibitoria que las Tregs exhiben a partir de INM podría deberse en parte a la presencia de pCDs.

Otras células que son responsables concretas de la respuesta inmune frente al tumor son los linfocitos T CD8. En pacientes se detectó la presencia de células T CD8 específicas para antígenos del tumor, sugiriendo la existencia de una respuesta inicial¹⁹⁸. Se ha demostrado que la proliferación *in vitro* de estas células es dependiente de la presentación antigénica y la presencia de moléculas coestimuladoras, siendo necesaria una tercera señal dada por citoquinas inflamatorias para su activación total. En algunos casos esta señal es dada por parte de las células T CD4 helper a través de la secreción de IL-12¹⁹⁹. En nuestro modelo, hallamos un aumento en el número de células T CD8 activadas en NP y en INM. Si bien no detectamos IL-12 en sobrenadante de ganglios ni cambios en MHC I en las CD8 a lo largo de todo el desarrollo tumoral, no podemos afirmar que no exista presentación cruzada. De hecho, en INM y TOL observamos aumento de la expresión de CD44 en membrana de linfocitos T CD8, indicando que estas células han tenido contacto con el antígeno. En cuanto a la función citotóxica de las T CD8, obtuvimos resultados diferentes en los ensayos de citotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. En el ensayo *in vitro* observamos que las células de los ganglios tienen la capacidad de ser citotóxicas frente al MCC; el ensayo *in vivo* demostró que esta citotoxicidad en el animal no es detectable, con la excepción de la fase NP. Las diferencias encontradas en ambas mediciones podrían explicarse por las diferentes metodologías empleadas. Mientras que el ensayo de citotoxicidad *in vitro*

demuestra la capacidad citotóxica de las células que están presentes en los ganglios pero aisladas de todo contexto sistémico, el ensayo *in vivo* indica la actividad citotóxica que se está produciendo en el portador con todos los componentes que definen su estadio. La citotoxicidad detectada tempranamente (NP) era esperable dado que todavía no se encuentra establecida la inmunosupresión.

Otra evidencia de inmunosupresión asociada al crecimiento del MCC la constituye la presencia de Treg en los NL. El hallazgo de esta población tanto en pacientes²⁰⁰ como en ratones fue correlacionado con mal pronóstico¹⁶⁴. En efecto, las Treg tienen la capacidad de interferir con la maduración y función de las CD4 y con la actividad de las células T⁴¹. En nuestro modelo, observamos la presencia de células Treg funcionales durante INM y TOL; durante INM en coexistencia con un aumento de linfocitos T CD4 activados mientras que en TOL las células T activadas disminuyeron. Más aún, al evaluar su funcionalidad, observamos que las Treg de ambos estadios fueron capaces de inhibir la proliferación T.

Por otro lado, y contrariamente a lo esperado por los altos niveles de MHCII detectados en las CPAs, las células de los NL de portadores de MCC en las fases INM y TOL fueron capaces de inhibir la proliferación alogeneica y dicha inhibición estaría mediada por IL-10. Esta citoquina ha sido ampliamente descrita y asociada a fenómenos de inmunosupresión. Entre sus efectos podemos destacar la inhibición de la maduración y migración de las CD4, la disminución de la expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las CPAs²⁰¹ y la inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias en monocitos y macrófagos²⁰². La IL10 puede ser expresada por distintos tipos celulares entre ellos, macrófagos, CD4, Treg y linfocitos B. En particular, en nuestro modelo la producción de IL-10 parece estar asociada principalmente a los linfocitos B. Recientemente, tanto en humanos²⁰³ como en animales^{204,55} se ha documentado la existencia de un subtipo de linfocitos B que tendrían un rol regulatorio en la progresión tumoral, que se distingue fenotípicamente por expresar CD19^{hi}CD5⁺CD1d^{hi} y actúa principalmente a través de IL-10²⁰⁵.

El ensayo funcional que más información nos brindó sobre la posibilidad de respuesta a nivel de los ganglios de un portador de MCC, tanto espacial como temporalmente, fue la generación de una reacción de hipersensibilidad por contacto. Las células de

Langerhans son células derivadas de médula ósea que pertenecen a la familia de las CD8. Se ha descrito²⁰⁶ que luego de la aplicación tópica de un antígeno estas células migran a los ganglios que drenan el sitio del tópico y estimulan una respuesta T CD4 (fase de sensibilización). El uso de FITC como antígeno permite detectar fácilmente en los ganglios a las células que han captado el antígeno. A los 6 días, al topicar una segunda vez (fase de desarrollo), se produce el reclutamiento de células T específicas para ese antígeno, las que secretan citoquinas como IFN- γ e IL-2 en las primeras 12 a 24 horas, y se genera un edema con un infiltrado linfocitario y polimorfonuclear. Más tarde, a las 48 horas predominan las células mononucleares. En nuestro caso, topicamos a los animales (fase de sensibilización) y observamos que, en respuesta al antígeno, llegan a los ganglios, tanto drenante como distal al tumor, tres tipos de células que captaron Fitc: CD8, linfocitos B y pCD8. La presencia de células B que endociten el antígeno en este tipo de ensayos ha sido ya documentada, sin embargo su rol sería el de inhibir la respuesta de hipersensibilidad por contacto²⁰⁷.

Para estudiar lo que ocurría durante la fase de desarrollo, se procedió a topicar a un grupo de ratones sobre el mismo flanco del tumor, y a otro grupo sobre el flanco contralateral. A los 6 días se realizó la segunda topicación en la oreja ipsilateral y se registraron las diferencias en su diámetro. En INM, la respuesta se encontró inhibida cuando la topicación inicial se realizó sobre NLDT; en TOL, la inhibición ocurrió cuando el tópico inicial se realizó tanto sobre el NLDT como sobre el nNLDT. Esto sugiere que en los portadores de MCC los fenómenos de inmunosupresión son generados más tempranamente en cercanías del tumor pero que después llegan a tener carácter sistémico.

En coincidencia con esto, el análisis de citoquinas indicó que mientras en INM los ganglios presentan células B IL-10 y células T CD4 y T CD8 expresando IFN- γ , es decir que existen simultáneamente elementos potencialmente supresores e inmunoestimuladores, en TOL predomina dentro de los NL un ambiente inmunosupresor, con células B IL-10 y escasas células CD4 IFN- γ . Cabe destacar que hemos detectado TGF β en el sobrenadante de cultivo de tumor y en sueros de portadores en los estadios INM y TOL. Esta citoquina tiene efecto inhibitorio de la respuesta inmune ya sea unida a la superficie celular, como fue descrito para células Treg, o siendo secretada en forma soluble como es el caso de varios tumores^{208,209}. Entre sus mecanismos se destacan la inhibición de las células T CD4 y la promoción de las células Treg²¹⁰.

Los resultados hasta acá sugieren fuertemente que la inmunosupresión ocurre más temprana y marcadamente en los ganglios drenantes del tumor MCC que en los ganglios distales. A su vez, el número de células que componen al NLDT es de dos a tres veces mayor que aquel de los NL distales. Nos propusimos entonces extirpar el NLDT durante la fase INM como medio de eliminar un foco incipiente de supresión inmunológica y permitir la manifestación de la inmunidad anti- MCC. Contrariamente a lo esperado, la linfadenectomía durante INM resultó en una marcada exacerbación del crecimiento del MCC. El resultado sugiere que la ablación del NL proximal al tumor, además de eliminar células regulatorias, estaría quitando aquellas células importantes para el desarrollo de la respuesta antitumoral, como lo son las células T CD4 IFN γ + y T CD8 IFN γ +

Es importante mencionar que aún cuando la linfadenectomía proximal constituye una práctica habitual en clínica, ya sea para diagnosticar el estadio tumoral como para evitar el riesgo de probables metástasis (linfadenectomía profiláctica), la conveniencia de este procedimiento es cuestionada por varios hechos. En primer lugar, existen cruces linfáticos y venosos a través de los que la diseminación podría tener lugar, aún en ausencia de los NL²¹¹. En segundo lugar, el NLDT podría ser un sitio privilegiado para el primado contra antígenos tumorales²¹², o bien constituir una efectiva barrera contra la diseminación dado que contiene células efectoras^{213,214}. Por último, ciertos antecedentes clínicos y experimentales indican que la LNx no siempre mejora el pronóstico de la enfermedad²¹⁵; más aún, en algunos casos disminuyó la eficacia de protocolos inmunoterapéuticos²¹⁶. En este contexto, algunos autores proponen que sería beneficioso conservar la integridad del sistema inmune evitando la extracción de los LN no comprometidos.

Buscamos entonces restituir las células efectoras extirpadas durante la LNx a través de la transferencia adoptiva de células del NL extirpado, previamente expandidas y estimuladas ex vivo. Ha sido reportado que es posible obtener una cantidad alta de células citotóxicas tumor- específicas a partir del cultivo de células provenientes del NLDT con anti-CD3 e IL-2^{217,218}. La aplicación de esta estrategia arrojó resultados positivos cuando la combinamos con la disminución in vivo de las células regulatorias por ciclofosfamida (Cy). Es conocido que la Cy en dosis bajas disminuye tanto el número como la actividad de las Treg^{219,220,221,164} favoreciendo de este modo la respuesta antitumoral y la eficacia de algunas inmunoterapias^{222,223}. Un trabajo reporta

asimismo que disminuye la cantidad de células B¹⁷⁰; células que en nuestro modelo también contribuirían a la inmunosupresión. Considerando estos antecedentes, realizamos la transferencia adoptiva de células provenientes del NLDT extirpado en el ratón donante tratado con ciclofosfamida. Esta terapia combinada produjo un aumento en la supervivencia de los animales portadores, 63% de remisión de los tumores ya establecidos y un menor crecimiento de los tumores que no regresaron. Cabe destacar que ninguno de los tratamientos parciales (Cy, LNx, Cy + LNx, LNx+ TA) realizados indujeron la regresión del tumor, indicando que tanto la restitución de las células que habían sido primadas in vivo contra el tumor como la eliminación de las células regulatorias presentes en el portador eran necesarias para el éxito terapéutico.

El estudio de los mecanismos desencadenados por la inmunoterapia (Cy+LNx+TA) nos permitió establecer algunos hechos que estarían asociados directamente con la regresión tumoral obtenida. En primer término, la administración de 50mg/kg de Cy indujo la depleción in vivo de Treg y células B; más aún, inhibió la función supresora de aquellas Treg remanentes. En segundo lugar, el cultivo de las células obtenidas del NLDT en presencia de anti- CD3 e IL-2 aumentó notablemente la proporción de células T CD4 y T CD8 y estimuló la producción de INF- γ y la capacidad citotóxica de dichas células. En tercer lugar, el tratamiento indujo una disminución en la concentración de TGF β en sangre, que como ya hemos descrito tiene un rol central en articular la inmunosupresión imperante en un portador de tumor. Esta disminución puede ser atribuida a la disminución del volumen tumoral. En cuarto lugar, las células transferidas fueron encontradas en ganglio, bazo y tumor, al menos hasta 7 días después; en ganglio y bazo probablemente actúen a través de la secreción de citoquinas; dentro del tumor, en cambio, tendrían un rol directo sobre las células tumorales, como lo sugieren nuestros resultados de citotoxicidad in vitro y la importante infiltración linfocitaria que se observa en el tumor en regresión.

Esta tesis remarca la importancia de conocer el estado inmunológico del portador a fin de desarrollar un diseño terapéutico eficaz cuando se busca la eliminación inmunológica del tumor. A su vez, refuerza el concepto de que una terapia inmunológica eficaz tiene que involucrar la eliminación de los elementos inmunosupresores de la respuesta anti-tumoral a la vez que debe aumentar las

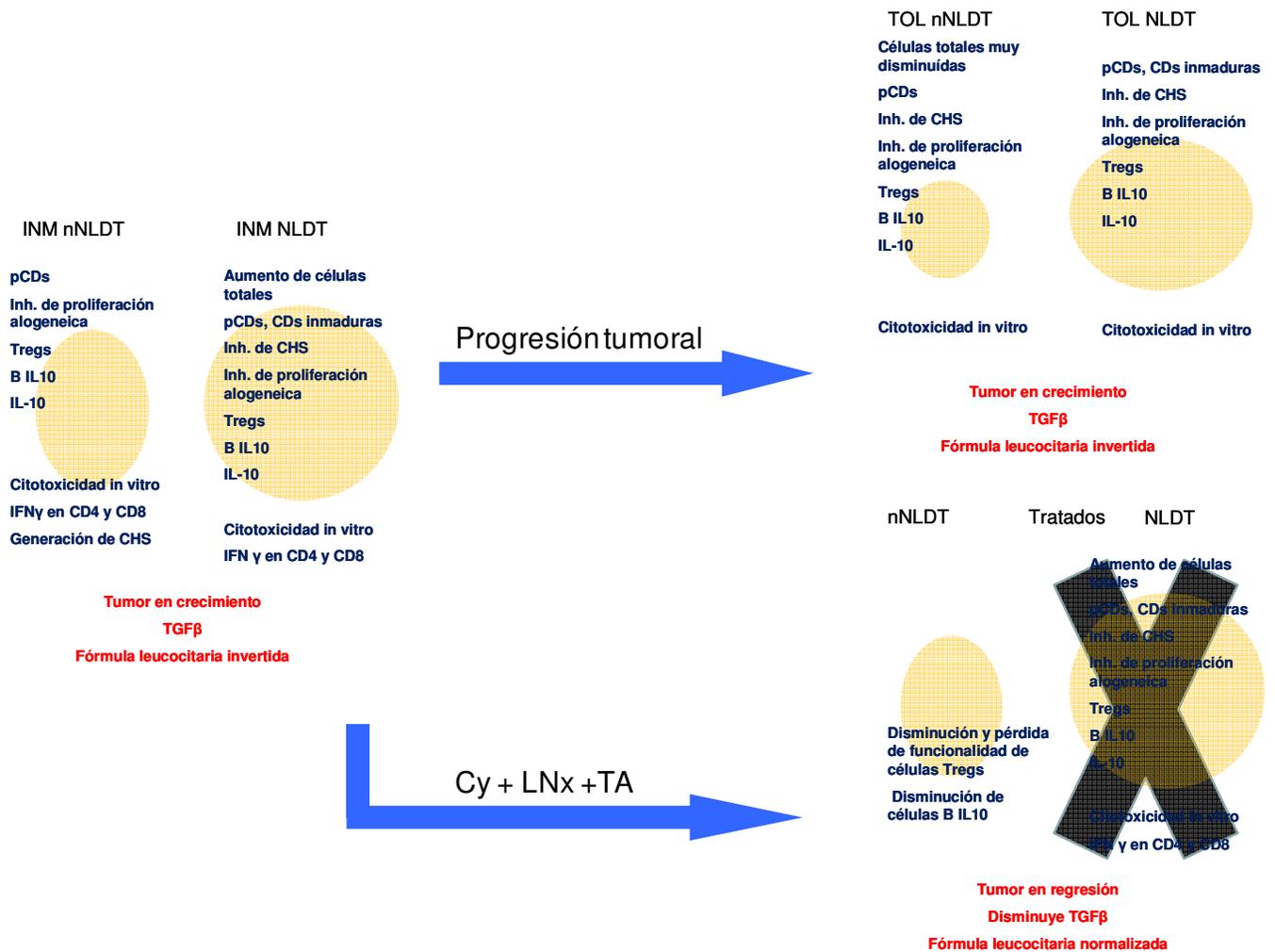
células efectoras. De este modo, conocer el efecto de los agentes quimioterapéuticos que ya han sido aprobados para su uso clínico sobre las distintas poblaciones celulares permitirá avanzar más en el diseño de inmunoterapias. Es importante destacar la importancia de trabajar con ciertas “ventanas” de disminución de células regulatorias, las que se definirán en cada caso individual y que permitirán bajar la dosis de quimioterapéuticos y sus efectos adversos. En particular, en nuestro modelo, la Cy nos permitió al disminuir las células B IL10 y Treg, contrarrestar el entorno inmunosupresor al que transferimos las células citotóxicas propiciando probablemente su actividad.

Asimismo, demostramos que un procedimiento como la extirpación del NLDT puede alterar importantes mecanismos antitumorales endógenos, probablemente a causa de la disrupción de la integridad del sistema inmune; sugerimos que la estrategia terapéutica de restituir células citotóxicas autólogas junto con la depleción de linfocitos B y T-reg por Cy, podría no sólo contrarrestar el impacto negativo de la LNx, sino además aumentar la inmunidad antitumoral e inducir remisión.

Conclusión

A modo de conclusión nos pareció más claro el siguiente esquema. Allí se puede observar como la **presencia del tumor MCC induce cambios a nivel de las poblaciones inmunes presentes en los NL** y se puede apreciar la importancia de la temporalidad y el conocimiento del sistema inmune del portador al momento de efectuar una inmunoterapia.

En particular, se muestra la situación inmunológica de los portadores de tumor MCC en la fase de INM que puede progresar hacia la observada para portadores en la fase TOL ó bien, mediante la inmunoterapia, llegar a la hallada en ratones tratados.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- ¹ Bonfil D y Scharovsky G, *Oncología Molecular y Celular*. Ed Dunken, p40 (2003).
- ² Cairns J. El problema del Cáncer. *Investigación y Ciencia* 1:88 (1976).
- ³ Cairns J. *Cancer: Science and Society*. WS Freeman & Co, San Francisco, USA (1978).
- ⁴ American Cancer Society. *Cancer Facts and Figures 2010*. Atlanta, GA: American Cancer Society (2010).
- ⁵ Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006*, National Cancer Institute, Bethesda (2009).
- ⁶ Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5):646 (2011).
- ⁷ Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22: 329 (2004).
- ⁸ Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD. Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*. 90:1 (2006).
- ⁹ 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. Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat. Immunol* 2:1144 (2001).
- ¹⁰ Quah, B. J. and H. C. O'Neill. Maturation of function in dendritic cells for tolerance and Immunity. *J Cell Mol. Med*. 9:643 (2005).
- ¹¹ Banchereau, J. and R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245 (1998).
- ¹² Banchereau, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol*. 18:767 (2000).
- ¹³ Ardavin, C. Origin, precursors and differentiation of mouse dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol*. 3:582 (2003).
- ¹⁴ Shortman, K. and Y. J. Liu. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol*. 2:151 (2002).
- ¹⁵ Steinman, R. M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol*. 9:271 (1991).
- ¹⁶ Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med*. 182:389 (1995).
- ¹⁷ Steinman, R. M., S. Turley, I. Mellman, and K. Inaba. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med*. 191:411 (2000).

-
- ¹⁸ Adams, S., D. W. O'Neill, and N. Bhardwaj. Recent Advances in dendritic cell biology. *J. Clin. Immunol.* 25:177 (2005).
- ¹⁹ Matzinger, P. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301(2002).
- ²⁰ Skoberne, M., A. S. Beignon, and N. Bhardwaj. Danger signals: a time and space continuum. *Trends Mol. Med.* 10:251 (2004).
- ²¹ Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20:621 (2002).
- ²² Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, Wyszocka M, Trinchieri G, Murphy M, O'Garra A. Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.*154:5071 (1995).
- ²³ O'Garra A, Hosken N, Macatonia S, Wenner CA, Murphy K. The role of macrophage- and dendritic cell-derived IL12 in Th1 phenotype development. *Res.Immunol.* 146:466. (1995).
- ²⁴ Foti M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. A central role for tissue resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol.* 25:650. (2004).
- ²⁵ Iwasaki A, Kelsall BL. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp. Med.* 190:229 (1999).
- ²⁶ Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, He B, Schaffer A, Casali P, Cerutti A. DCs induce CD40-independent Immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat. Immunol.* 3:822 (2002).
- ²⁷ Wilson NS, El-Sukkari D, Villadangos JA. Dendritic cells constitutively present self antigens in their immature state in vivo and regulate antigen presentation by controlling the rates of MHC class II synthesis and endocytosis. *Blood* 103:2187 (2004).
- ²⁸ Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol* 21:685 (2003).
- ²⁹ Wakkach, A., N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, F. Cottrez, H. Groux. Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity.* 18:605 (2003).
- ³⁰ Cederbom L, Hall H, Ivars F. CD4+CD25+ regulatory T cells downregulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur. J Immunol* 30:1538 (2000).
- ³¹ Misra, N., J. Bayry, S. Lacroix-Desmazes, M. D. Kazatchkine, and S. V. Kaveri. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 172:4676 (2004).
- ³² Serra, P. A. Amrani, J. Yamanouchi, B. Han, S. Thiessen, T. Utsugi, J. Verdaguer, and P. Santamaria. CD40 ligation releases Immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity.* 19:877 (2003).

-
- ³³ Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J. V. Ravetch, R.M. Steinman, and M. C. Nussenzweig. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp. Med.* 194:769 (2001).
- ³⁴ Hawiger, D., R. F. Masilamani, E. Bettelli, V. K. Kuchroo, and M. C. Nussenzweig. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity.* 20:695 (2004).
- ³⁵ Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp. Med.* 196:1627 (2002).
- ³⁶ Baxter, A. G. and P. D. Hodgkin. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat. Rev. Immunol* 2:439 (2002).
- ³⁷ Chen, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol* 4:336 (2004).
- ³⁸ Levings, M. K., S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, and M. G. Roncarolo. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood* 105:1162 (2005).
- ³⁹ Jonuleit, H., E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, and A. H. Enk. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192:1213 (2000).
- ⁴⁰ Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp. Med.* 198:235 (2003).
- ⁴¹ Fehervari, Z. and S. Sakaguchi. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int. Immunol.* 16:1769 (2004).
- ⁴² Brinster, C. and E. M. Shevach. Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function. *J. Immunol.* 175:7332 (2005).
- ⁴³ Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 1;176(11):6752 (2006).
- ⁴⁴ Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, Azuma M, Blazar BR, Mellor AL, Munn DH. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest.* 117 (9):2570 (2007).

-
- ⁴⁵ Munn, D. H., M. D. Sharma, J. R. Lee, K. G. Jhaver, T. S. Johnson, D. B. Keskin, B. Marshall, P. Chandler, S. J. Antonia, R. Burgess, C. L. Slingluff, Jr., and A. L. Mellor. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297:1867 (2002).
- ⁴⁶ Munn, D. H., M. D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J. R. Lee, S. J. Antonia, J. L. Messina, P. Chandler, P. A. Koni, and A. L. Mellor. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin. Invest* 114:280 (2004).
- ⁴⁷ Mond JJ, Lees A, Snapper CM. T cell independent antigen type 2. *Ann Rev Immunol* 13: 665 (1995).
- ⁴⁸ Lanzavecchia A. Pillars article: Antigen-specific interaction between T and B cells. *J Immunol.* 1;179(11):7206 (2007).
- ⁴⁹ Batista FD, Iber D, Neuberger MS. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature* 411:489 (2001).
- ⁵⁰ Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ. CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol.* 22:307 (2004).
- ⁵¹ Ho F, Lortan JE, MacLennan IC, Khan M. Distinct short- lived and long -lived antibody-producing cell populations *Eur J Immunol* 16 :1297 (1986).
- ⁵² Minges Wols The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity *J Immunol* 169: 4213 (2002).
- ⁵³ Kirk AD, Turgeon NA, Iwakoshi NN. B cells and transplantation tolerance. *Nat Rev Nephrol* 6(10):584 (2010).
- ⁵⁴ Zarkhin V, Chalasani G, Sarwal MM. The yin and yang of B cells in graft rejection and tolerance. *Transplant Rev* 24(2):67 (2010).
- ⁵⁵ Matsumura Y, Byrne SN, Nghiem DX, Miyahara Y, Ullrich SE. A role for inflammatory mediators in the induction of immunoregulatory B cells. *J Immunol* 177 (7): 4810 (2006).
- ⁵⁶ Mauri C, Gray D, Mushtaq N, Londei M. Prevention of arthritis by IL10 producing B cells *J Exp Med* 197: 489 (2003).
- ⁵⁷ Ahuja A, Shupe J, Dunn R, Kashgarian M, Kehry MR, Shlomchik MJ. Depletion of B cells in murine lupus: efficacy and resistance. *J Immunol* 179:3351 (2007).
- ⁵⁸ Mizoguchi A., Bhan A.. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 176: 705 (2006).
- ⁵⁹ Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Regulatory B cells in autoimmune diseases: how do they work? *Ann N Y Acad Sci.* 1173:260 (2009).
- ⁶⁰ Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1d^{hi}CD5^b phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 28:639 (2008).

-
- ⁶¹ Matsushita T, Tedder TF . Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol Biol.* 677:99 (2011).
- ⁶² Lores B, García-Estevez JM, Arias C. Lymph nodes and human tumors. *Int J Mol Med* 1(4):729 (1998).
- ⁶³ Nelson B. CD20+B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol.*185(9):4977 (2010).
- ⁶⁴ DiLillo, D.J. & T.F. Tedder. B cells are required for T cell activation during tumor immunity. *J. Immunol.* 182: Abstract 88.27 (2009).
- ⁶⁵ DiLillo DJ, Yanaba K, Tedder TF., B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *J Immunol* 184:4006 (2010).
- ⁶⁶ Qin Z, Richter G, Schüler T, Ibe S, Cao X, Blankenstein T. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med.* 4(5):627 (1998).
- ⁶⁷ Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor immunity. *Cancer Res*; 66(15): 7741 (2006).
- ⁶⁸ Shah S, Divekar AA, Hilchey SP, Cho HM, Newman CL, Shin SU, Nechustan H, Challita-Eid PM, Segal BM, Yi KH, Rosenblatt JD. Increased rejection of primary tumors in mice lacking B cells: inhibition of anti-tumor CTL and TH1 cytokine responses by B cells. *Int. J. Cancer* 117: 574 (2005).
- ⁶⁹ Tadmor T, Zhang Y, Cho HM, Podack ER, Rosenblatt JD. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol Immunother.* 60(5):609 (2011).
- ⁷⁰ Watt V, Ronchese F, Ritchie D. Resting B cells suppress tumor Immunity via an MHC class-II dependent mechanism. *J Immunother*; 30(3): 323 (2007).
- ⁷¹ Oehen S Brduscha-Riem K Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol.* 161(10):5338. (1998).
- ⁷² Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol*; 26:389 (2008).
- ⁷³ Slifka MK, Whitton JL. Antigen-specific regulation of T cell-mediated cytokine production. *Immunity*;12:451 (2000).
- ⁷⁴ Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties *Annu Rev Immunol.*;7:145 (1989).
- ⁷⁵ Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18:723 (1970).
- ⁷⁶ Moller G. Do suppressor T cells exist? *Scand J Immunol* 27:247 (1988).

-
- ⁷⁷ Sakaguchi S, Wing K, Miyara M. Regulatory T cells – a brief history and perspective. *Eur J Immunol*;37 (Suppl. 1):S116–23. (2007).
- ⁷⁸ Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. and Toda, M., Immunologic tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25): breakdown of a single mechanism of selftolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155: 1151 (1995).
- ⁷⁹ Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J. E. de Vries, and M. G. Roncarolo. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737(1997).
- ⁸⁰ Chen, Y., V. K. Kuchroo, J. Inobe, D. A. Hafler, and H. L. Weiner. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237 (1994).
- ⁸¹ Godfrey, D. I., and M. Kronenberg. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114:1379. (2004).
- ⁸² Jiang, S., S. Tugulea, G. Pennesi, Z. Liu, A. Mulder, S. Lederman, P. Harris, R. Cortesini, N. Suci-Foca. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum Immunol* 59:690. (1998).
- ⁸³ Shevach, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 25:195 (2006).
- ⁸⁴ Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 18:423 (2000).
- ⁸⁵ Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Immunol.* 169(5):2756 (2002).
- ⁸⁶ Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol.* 3(3):199 (2003).
- ⁸⁷ Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163:5211 (1999).
- ⁸⁸ Dieckmann, D., H. Plottner, S. Berchtold, T. Berger, and G. Schuler. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* 193:1303 (2001).
- ⁸⁹ Jonuleit, H., E. Schmitt, M. Stassen, A. Tuettenberg, J. Knop, and A. H. Enk. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* 193:1285 (2001).

-
- ⁹⁰ Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, and P. Puccetti. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206 (2003).
- ⁹¹ Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 16:1769 (2004).
- ⁹² Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737 (1997).
- ⁹³ Vieira PL, Christensen JR, Minaee S, O'Neill EJ, Barrat FJ, Boonstra A, Barthlott T, Stockinger B, Wraith DC, O'Garra A IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 172:5986 (2004).
- ⁹⁴ Weiner HL Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207 (2001).
- ⁹⁵ Wing, K., E. Suri-Payer, A. Rudin. CD4+CD25+-regulatory T cells from mouse to man. *Scand J Immunol* 62:1 (2005).
- ⁹⁶ Robb RJ, Munck A, Smith KA. T cell growth factor receptors. Quantitation, specificity, and biological relevance. *J Exp Med* 154:1455 (1981).
- ⁹⁷ Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1: 405 (1994).
- ⁹⁸ Nocentini G, Giunchi L, Ronchetti S, Krausz LT, Bartoli A, Moraca R, Migliorati G, Riccardi C. A new member of the tumor necrosis factor / nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:6216 (1997).
- ⁹⁹ Triebel F, Jitsukawa S, Baixeras E, Roman-Roman S, Genevee C, Viegas-Pequignot E, Hercend T. LAG-3, a novel lymphocyte activation gene closely related to CD4. *J Exp Med* 171:1393 (1990).
- ¹⁰⁰ Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057 (2003).
- ¹⁰¹ Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol* 4:330 (2003).
- ¹⁰² Baecher-Allan, C., J. A. Brown, G. J. Freeman, and D. A. Hafler. CD4+CD25high Regulatory Cells in Human Peripheral Blood. *J Immunol* 167:1245 (2001).
- ¹⁰³ Vignali DA, Collison LW, Workman CJ How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8:523 (2008).
- ¹⁰⁴ Tang Q, Bluestone JA .The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 9:239 (2008).

-
- ¹⁰⁵ Sojka DK, Huang YH, Fowell DJ Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 124:13 (2008).
- ¹⁰⁶ Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* 174:1783 (2005).
- ¹⁰⁷ Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, Ley TJ Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* 27:635 (2007).
- ¹⁰⁸ Chen ML, Pittet MJ, Gorelik L, Flavell RA, Weissleder R, von BH, Khazaie K Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:419 (2005).
- ¹⁰⁹ Mellor AL, Munn DH IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 4:762 (2004).
- ¹¹⁰ Balkwill F, Mantovani A, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357: 539 (2001).
- ¹¹¹ Coussens L Werb Z Inflammation and cancer *Nature* 420:860 (2002).
- ¹¹² Graziano DF, Finn OJ. Tumor antigens and tumor antigen discovery *Cancer Treat Res.* 123:89 (2005).
- ¹¹³ P. Ehrlich, Ueber den jetzigen Stand der Karzinom-forschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1 pp. 273 (1909).
- ¹¹⁴ Burnet F M. Cancer – a biological approach. *Br Med J* 1:841 (1957).
- ¹¹⁵ Thomas I. Delayed hypersensitivity in health and disease. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states, Lawrence H (ed) Horber Harper: new York 529 (1959).
- ¹¹⁶ Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. *Immunity.* 1(6):447 (1994).
- ¹¹⁷ Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. *Proc Natl Acad Sci USA.* Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. 95(13):7556 (1998).
- ¹¹⁸ Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med.* 196(1):129 (2002).
- ¹¹⁹ Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer.* 2(5):373-82. (2002)
- ¹²⁰ Biggar RJ, Chaturvedi AK, Goedert JJ, Engels EA; HIV/AIDS Cancer Match Study. AIDS-related cancer and severity of immunosuppression in persons with AIDS. *J Natl Cancer Inst.* 99(12):962 (2007).
- ¹²¹ Sheil AG. Cancer after transplantation. *World J Surg.* 10(3):389 (1986).

-
- ¹²² Penn I. Occurrence of cancers in immunosuppressed organ transplant recipients. *Clin Transpl.* 147 (1998).
- ¹²³ Dunn G, Bruce A, Ikeda H, Old L, Schreiber R. Cancer Immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunol* 3: 991 (2002).
- ¹²⁴ Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD. Adaptive Immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450: 903 (2007).
- ¹²⁵ Zou W, Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Rev Cancer* 5, 263 (2005).
- ¹²⁶ Khong HT, Wang QJ, Rosenberg SA. Identification of multiple antigens recognized by tumor infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *J. Immunother.* 27:184 (2004).
- ¹²⁷ Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A. Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int. J. Cancer* 66:470 (1996).
- ¹²⁸ Villablanca EJ, Raccosta L, Zhou D, Fontana R, Maggioni D, et al. Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. *Nat. Med.* 16:98 (2010).
- ¹²⁹ Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat. Immunol.* 9:1065 (2008).
- ¹³⁰ Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Res.* 65:3447 (2005).
- ¹³¹ Hinz S, Trauzold A, Boenicke L, Sandberg C, Beckmann S, et al. Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene* 19:5477 (2000).
- ¹³² Takahashi H, Feuerhake F, Kutok JL, Monti S, Dal Cin P. FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clin. Cancer Res.* 12:3265 (2006).
- ¹³³ Salatino M, Croci DO, Bianco GA, Illarregui JM, Toscano MA, Rabinovich GA. Galectin-1 as a potential therapeutic target in autoimmune disorders and cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 8(1):45 (2008).
- ¹³⁴ Gabrilovich DI, Ishida T, Nadaf S, Ohm JE, Carbone DP. Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. *Clin. Cancer Res.* 5:2963 (1999).
- ¹³⁵ Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr. Opin. Immunol.*

16:157 (2004).

¹³⁶ Movahedi K, Williams M, Van den Bossche J, Van den Bergh R, Gysemans C, Beschin A, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111:4233 (2008).

¹³⁷ Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol.* 29:235 (2011).

¹³⁸ Cochran AJ, Huang RR, Lee J, Itakura E, Leong SP, Essner R. Tumour-induced immune modulation of sentinel lymph nodes. *Nat Rev Immunol.* 6(9):659 (2006).

¹³⁹ Munn DH, Mellor AL. The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. *Immunol Rev.* 213:146 (2006).

¹⁴⁰ Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L, Zou W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med.* 9(5):562 (2003).

¹⁴¹ Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E, Kroemer G, Martin F, Chauffert B, Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med.* 202(7):919 (2005).

¹⁴² Zhou G, Levitsky HI. Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance. *J Immunol*;178:2155 (2007).

¹⁴³ Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C. Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol* 178:2883 (2007).

¹⁴⁴ Tang Q, Bluestone JA Plasmacytoid DCs and T(reg) cells: casual acquaintance or monogamous relationship? *Nat Immunol.* 7(6):551 (2006).

¹⁴⁵ Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol.* 22(7):394 (2001).

¹⁴⁶ Bailar JC 3rd, Gornik HL. Cancer undefeated. *N Engl J Med.* 336(22):1569 (1997).

¹⁴⁷ Moore PS, Chang Y. Why do viruses cause cancer? Highlights of the first century of human tumour virology. *Nat Rev Cancer.* (12):878 (2010).

¹⁴⁸ Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, Tang GW, Ferris DG, Steben M, Bryan J, Taddeo FJ, Railkar R, Esser MT, Sings HL, Nelson M, Boslego J, Sattler C, Barr E, Koutsky LA; Females United to Unilaterally Reduce Endo/Ectocervical Disease (FUTURE) I Investigators. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *N Engl J Med.* 356(19):1928 (2007).

-
- ¹⁴⁹ Kenter GG, Welters MJ, Valentijn AR, Lowik MJ, Berends-van der Meer DM, Vloon AP, Essahsah F, Fathers LM, Offringa R, Drijfhout JW, Wafelman AR, Oostendorp J, Fleuren GJ, van der Burg SH, Melief CJ. Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med.* 361(19):1838 (2009).
- ¹⁵⁰ Kaufman HL, Kim DW, DeRaffele G, Mitcham J, Coffin RS, Kim-Schulze S. Local and distant immunity induced by intralesional vaccination with an oncolytic herpes virus encoding GM-CSF in patients with stage IIIc and IV melanoma. *Ann Surg Oncol.* 17(3):718 (2010).
- ¹⁵¹ Dougan M, Dranoff G. Immune therapy for cancer. *Annu Rev Immunol.* 27:83 (2009).
- ¹⁵² Peggs KS, Quezada SA, Chambers CA, Korman AJ, Allison JP. Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med.* 206(8):1717 (2009).
- ¹⁵³ Ribas A, Camacho LH, Lopez-Berestein G, Pavlov D, Bulanagui CA, Millham R, Comin-Anduix B, Reuben JM, Seja E, Parker CA, Sharma A, Glaspy JA, Gomez-Navarro J. Antitumor activity in melanoma and anti-self responses in a phase I trial with the anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 monoclonal antibody CP-675,206. *J Clin Oncol.* 23(35):8968 (2005).
- ¹⁵⁴ Weber JS, O'Day S, Urba W, Powderly J, Nichol G, Yellin M, Snively J, Hersh Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma *E.J Clin Oncol.* 26(36):5950 (2008).
- ¹⁵⁵ Rech AJ, Vonderheide RH. Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1174:99 (2009).
- ¹⁵⁶ Lesterhuis WJ, Haanen JB, Punt CJ., Cancer immunotherapy-revisited, *Nature Reviews*, vol 10 591 (2011).
- ¹⁵⁷ Liu JY, Wu Y, Zhang XS, Yang JL, Li HL, Mao YQ, Wang Y, Cheng X, Li YQ, Xia JC, Masucci M, Zeng YX. Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother.* 56(10):1597 (2007).
- ¹⁵⁸ Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, Wunderlich J, Restifo NP, Thomasian A, Downey SG, Smith FO, Klapper J, Morton K, Laurencot C, White DE, Rosenberg SA. Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol* 26 : 5233 (2008).
- ¹⁵⁹ Muranski P, Restifo NP. Adoptive immunotherapy of cancer using CD4+ T cells *Curr Opin Immunol:* 21:200 (2009).
- ¹⁶⁰ Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA, Restifo NP. Removal of homeostatic

cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med* 202: 907 (2005).

¹⁶¹ van der Most RG, Currie A, Robinson BW, Lake RA. Cranking the immunologic engine with chemotherapy: using context to drive tumor antigen cross-presentation towards useful antitumor immunity. *Cancer Res.* 66(2):601 (2006).

¹⁶² Klebanoff CA, Khong HT, Antony PA, Palmer DC, Restifo NP. Sinks, suppressors and antigen presenters: how lymphodepletion enhances T cell-mediated tumor immunotherapy. *Trends Immunol.* 26(2):111 (2005).

¹⁶³ Maine GN, Mulé JJ. Making room for T cells. *J Clin Invest.* Jul;110(2):157 (2002).

¹⁶⁴ Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 34(2):336 (2004).

¹⁶⁵ Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. *Blood.* 105(7):2862 (2005).

¹⁶⁶ Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 47(1):1. (1998).

¹⁶⁷ Matar P, Rozados VR, González AD, Dlugovitzky DG, Bonfil RD, Scharovsky OG. Mechanism of antimetastatic immunopotential by low-dose cyclophosphamide. 36(8):1060 (2000).

¹⁶⁸ Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky GO. Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunol Immunother.* 50(11):588 (2002).

¹⁶⁹ Rabinovich GA, Rubinstein N, Matar P, Rozados V, Gervasoni S, Scharovsky GO. The antimetastatic effect of a single low dose of cyclophosphamide involves modulation of galectin-1 and Bcl-2 expression. *Cancer Immunol Immunother.* 50(11):597 (2002).

¹⁷⁰ Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev Immunol.* 28(2):109 (2008).

¹⁷¹ Franco M, Bustuoabad OD, di Gianni PD, Goldman A, Pasqualini CD, Ruggiero RA. A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours. *Br J Cancer.* 74(2):178 (1996).

¹⁷² Bruzzo J, Chiarella P, Fernández G, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Cancer experimental e inflamación sistémica en un modelo murino. *Medicina (B Aires).*67: 469 (2007).

-
- ¹⁷³ Chiarella P, Vulcano M, Laborde E, Vermeulen M, Bruzzo J, Rearte B, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Reversion of the Immunological eclipse and therapeutic vaccination against cancer in an experimental model. *Medicina (B Aires)*. 67:44 (2007).
- ¹⁷⁴ Chiarella P, Vulcano M, Bruzzo J, Vermeulen M, Vanzulli S, Maglioco A, Camerano G, Palacios V, Fernández G, Brando RF, Isturiz MA, Dran GI, Bustuoabad OD, Ruggiero RA. Anti-inflammatory pretreatment enables an efficient dendritic cell-based immunotherapy against established tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 57(5):701 (2008).
- ¹⁷⁵ Franco M et al , Two different types of concomitant resistance induced by murine tumors: Morphological aspects and intrinsic mechanisms, *Oncology reports* 7: 1053 (2000).
- ¹⁷⁶ Ruggiero RA, Bruzzo Juan, Chiarella P, di Gianni P, Isturiz MA, Linskens S, Speziale N, Meiss R, Bustuoabad OD, Pasqualini Christiane D. Tyrosine isomers mediate the classical phenomenon of concomitant tumor resistance. *Cancer Research* en prensa.
- ¹⁷⁷ Chin CS, Bear HD. Sentinel node mapping identifies vaccine-draining lymph nodes with tumor-specific immunological activity. *Ann Surg Oncol*. 9(1):94-103 (2002).
- ¹⁷⁸ Vermeulen M, Giordano M, Trevani AS, Sedlik C, Gamberale R, Fernández-Calotti P, Salamone G, Raiden S, Sanjurjo J, Geffner JR. Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. *J Immunol* 172:3196 (2004).
- ¹⁷⁹ Ishida T, Oyama T, Carbone DP, Gabilovich DI. Defective function of Langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol*. 161(9):4842 (1998).
- ¹⁸⁰ Matzinger P. The JAM test. A simple assay for DNA fragmentation and cell death. *J Immunol Methods*. 145(1-2):185 (1991).
- ¹⁸¹ Dercamp C, Chemin K, Caux C, Trinchieri G, Vicari AP. Distinct and overlapping roles of interleukin-10 and CD25+ regulatory T cells in the inhibition of antitumor CD8 T-cell responses. *Cancer Res*. Sep 15;65(18):8479 (2005).
- ¹⁸² George JF, Braun A, Brusko TM, Joseph R, Bolisetty S, Wasserfall CH, Atkinson MA, Agarwal A, Kapturczak MH. Suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells is dependent on expression of heme oxygenase-1 in antigen-presenting cells. *Am J Pathol* 173(1):154 (2008).
- ¹⁸³ Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother*. 25(3):207 (2002).
- ¹⁸⁴ Kim R, Emi M, Tanabe K Functional roles of immature dendritic cells in impaired immunity to solid tumors and their targeted strategies for provoking tumor immunity. *Clin Exp Immunol* 146:189 (2006).
- ¹⁸⁵ Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D Inhibitory effects of B cells on antitumor Immunity. *Cancer Res* 66(15):7741 (2006).

-
- ¹⁸⁶ Matsumura Y, Kobayashi T, Ichiyama K, Yoshida R, Hashimoto M, Takimoto T, Tanaka K, Chinen T, Shichita T, Wyss-Coray T, Sato K, Yoshimura A. Selective expansion of foxp3-positive regulatory T cells and immunosuppression by suppressors of cytokine signaling 3-deficient dendritic cells. *J Immunol* 179(4):2170 (2007).
- ¹⁸⁷ Ishida T, Oyama T, Carbone T, Gabrilovich DI. Defective function of langerhans cells in tumor-bearing animals is the result of defective maturation from hemopoietic progenitors. *J Immunol* 161:4842 (1998).
- ¹⁸⁸ Zelenay S, Lopes-Carvalho T, Caramalho I, Moraes-Fontes MF, Rebelo M, Demengeot J. Foxp3+ CD25-CD4 T cells constitute a reservoir of committed regulatory cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion. *PNAS* 102:4091 (2005).
- ¹⁸⁹ Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 22:329 (2005).
- ¹⁹³ Yoshizawa H, Chang AE, Shu S. Specific adoptive immunotherapy mediated by tumor-draining lymph node cells sequentially activated with anti-CD3 and IL-2. *J Immunol* 147:729 (1991).
- ¹⁹⁴ Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4+CD25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low dose cyclophosphamide. *Blood* 105:2862 (2005).
- ¹⁹⁵ Bustuoabad OD, Ruggiero RA, Di Gianni PD, Lombardi G, Beli C, Camerano GV, Dran GI, Schere-Levy C, Costa H, Isturiz MA, Narvaiz M, van Rooijen N, Bustuoabad VA, Meiss RP. Tumor transition zone: a new putative morphological and functional hallmark of tumor aggressiveness. *Oncol Res* 15:169 (2005).
- ¹⁹⁶ Munn DH, Mellor AL. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J Clin Invest*. 117(5):1147 (2007).
- ¹⁹⁷ Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol* 16(1):3 (2006).
- ¹⁹⁸ Valmori D, Scheibenbogen C, Dutoit V, Nagorsen D, Asemissen AM, Rubio-Godoy V, Rimoldi D, Guillaume P, Romero P, Schadendorf D, Lipp M, Dietrich PY, Thiel E, Cerottini JC, Liénard D, Keilholz U. Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity. *Cancer Res*. 62(6):1743 (2002).
- ¹⁹⁹ Curtsinger JM, Schmidt CS, Mondino A, Lins DC, Kedl RM, Jenkins MK, Mescher MF. Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*. 162(6):3256 (1999).
- ²⁰⁰ Curiel TJ. Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol*. Apr;20(2):241 (2008).

-
- ²⁰¹ Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev.* 55(2):241(2003).
- ²⁰² Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 147(11):3815. (1991).
- ²⁰³ Di Girolamo V, Laguens RP, Coronato S, Salas M, Spinelli O, Portiansky E, Laguens G. Quantitative and functional study of breast cancer axillary lymph nodes and those draining other human malignant tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 19(2):155 (2000).
- ²⁰⁴ Inoue S, Leitner WW, Golding B, Scott D. Inhibitory effects of B cells on antitumor Immunity. *Cancer Res* 66(15):7741 (2006).
- ²⁰⁵ Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM, Poe JC, Fujimoto M, Tedder TF. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity.* 28(5):639 (2008).
- ²⁰⁶ Macatonia SE, Knight SC, Edwards AJ, Griffiths S, Fryer P. Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies. *J Exp Med.* 166(6):1654 (1987).
- ²⁰⁷ Watanabe R, Fujimoto M, Ishiura N, Kuwano Y, Nakashima H, Yazawa N, Okochi H, Sato S, Tedder TF, Tamaki K. CD19 expression in B cells is important for suppression of contact hypersensitivity. *Am J Pathol.* 171(2):560 (2007).
- ²⁰⁸ Conrad CT, Ernst NR, Dummer W, Bröcker EB, Becker JC. Differential expression of transforming growth factor beta 1 and interleukin 10 in progressing and regressing areas of primary melanoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 18(2):225 (1999).
- ²⁰⁹ Amoils KD, Bezwoda WR. TGF-beta 1 mRNA expression in clinical breast cancer and its relationship to ER mRNA expression. *Breast Cancer Res Treat.* 42(2):95. (1997).
- ²¹⁰ Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol.* 2(1):46 (2002).
- ²¹¹ Cady B. Lymph node metastases: indicators, but not governors, of survival. *Arch Surg* 119:1067 (1984).
- ²¹² Hiura T, Kagamu H, Miur S, Ishida A, Tanaka H, Tanaka J, Gejyo F, Yshizawa H. Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol* 175:5058 (2005).
- ²¹³ Lores B, Garcia-Estevez JM, Arias C. Lymph nodes and human tumors. *Int J Mol Med* 1(4):729 (1998).
- ²¹⁴ Abe R, Taneichi N. Lymphatic metastasis in experimental cecal cancer: effectiveness of lymph nodes as barriers to the spread of tumor cells. *Arch Surg* 104:95 (1972).
- ²¹⁵ Veronesi U, Adamus J, Bandiera DC, Brennhovd IO, Caceres E, Cascinelli N, Claudio F, Ikonopisov RL, Javorskj V, Kirov S, Kulakowski A, Lacoub J, Lejeune F, Mechl Z, Morabito A,

Rode I, Sergeev S, van Slooten E, Szczygiel K, Trapeznikov NN. Inefficacy of immediate node dissection in stage 1 melanoma of the limbs. *N Engl J Med* 297(12):627 (1977).

²¹⁶ Harada M, Tamada K, Abe K, Onoe Y, Tada H, Takenoyama M, Yasumoto K, Kimura G, Nomoto K. Systemic administration of interleukin-12 can restore the anti-tumor potential of B16 melanoma-draining lymph node cells impaired at a late tumor-bearing state. *Int J Cancer* 75:400 (1998).

²¹⁷ Yoshizawa H, Chang AE, Shu S. Specific adoptive immunotherapy mediated by tumor-draining lymph node cells sequentially activated with anti-CD3 and IL-2. *J Immunol* 147:729 (1991).

²¹⁸ Tanaka H, Tanaka J, Kjaergaard J, Shu S. Depletion of CD4+CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother* 25(3):207 (2002).

²¹⁹ Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, Chauffert B, Solary E, Bonnotte B, Martin F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* 34:336 (2004).

²²⁰ Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4+25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low dose cyclophosphamide. *Blood* 105:2862 (2005).

²²¹ Ménard C, Martin F, Apetoh L, Bouyer F, Ghiringhelli F. Cancer chemotherapy: not only a direct cytotoxic effect, but also an adjuvant for antitumor immunity. *Cancer Immunol Immunother* 57(11):1587 (2008).

²²² North RJ. Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med*. 155(4):1063 (1982).

²²³ Veltman JD, Lambers ME, van Nimwegen M, de Jong S, Hendriks RW, Hoogsteden HC, Aerts JG, Hegmans JP. Low-dose cyclophosphamide synergizes with dendritic cell-based immunotherapy in antitumor activity. *J Biomed Biotechnol*. (2010).