

Tesis Doctoral

# Estrategias de inmunoterapias contra tumores murinos durante el estado de inmunosupresión inducido por el tumor

Chiarella, Paula

2012-02-16

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Chiarella, Paula. (2012-02-16). Estrategias de inmunoterapias contra tumores murinos durante el estado de inmunosupresión inducido por el tumor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Chiarella, Paula. "Estrategias de inmunoterapias contra tumores murinos durante el estado de inmunosupresión inducido por el tumor". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-02-16.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

***Estrategias de inmunoterapias contra tumores murinos  
durante el estado de inmunosupresión inducido por el tumor***

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos  
Aires en el área Ciencias Biológicas

**Paula Chiarella**

**Director: Raúl A. Ruggiero**  
**Consejero de Estudio: Eduardo Arzt**

**Lugar de trabajo: División Medicina Experimental (CONICET). Academia  
Nacional de Medicina de Buenos Aires**

**Buenos Aires, noviembre 2011**



## **RESUMEN**

### ***“Estrategias de inmunoterapias contra tumores murinos durante el estado de inmunosupresión inducido por el tumor”***

Aunque los animales pueden ser inmunizados contra el crecimiento de algunos tumores, la mayoría de los intentos por aplicar estas inmunoterapias para causar la regresión en tumores humanos y de animales una vez que estos se encuentran establecidos no ha sido exitosos, aun cuando los tumores son fuertemente inmunogénicos. En esta tesis, nosotros demostramos que el inicio de la refractariedad a los tratamientos inmunológicos coincidió con el comienzo de un estado de inmunosupresión conocido como “eclipse inmunológico” caracterizado por una pérdida o bloqueo de la respuesta inmune antitumoral después que el tumor ha superado cierto volumen crítico ( $500 \text{ mm}^3$ ). A su vez el inicio del eclipse se correspondió con el comienzo de un proceso de inflamación sistémica progresiva caracterizado por un aumento en el número de neutrófilos circulantes y en bazo, un alto número células mieloides inmaduras (GR1/CD11b) y una elevada concentración sérica de citoquinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, proteína C reactiva y proteína A Amiloide. En ratones portadores de tumor, la aplicación de una sola dosis (0.75 mg/Kg) de un corticoide sintético como la dexametasona (DX) redujo significativamente los parámetros de inflamación sistémica y revirtió simultáneamente el eclipse inmunológico, lo cual fue demostrado por la recuperación de ciertos indicadores de respuesta inmune antitumoral. Otros dos tratamientos anti-inflamatorios (indometacina o receptor para TNF- $\alpha$ ) revirtieron parcialmente el eclipse inmunológico, aunque el efecto no fue tan efectivo que el observado con DX. La reversión del eclipse inmunológico no fue suficiente por si solo para inhibir el crecimiento de un tumor primario. Sin embargo, cuando usamos la estrategia de dos pasos inoculando DX para revertir el eclipse inmunológico y células dendríticas (CDs) estimuladas con

antígeno tumoral, como un Booster de inmunización, se observó una inhibición significativa tanto en el crecimiento de tumores establecidos como en células remanentes luego de una operación de un tumor grande establecido, a pesar de que la vacunación con CDs solamente no tuvo efecto o incluso, a veces, produjo un aumento del crecimiento tumoral. Asimismo, cuando a la estrategia de dos pasos le adicionamos un tratamiento adicional (transferencia pasiva de linfocitos naïve o administración de ATRA), si bien se observó una mayor inhibición del crecimiento de los tumores, la sobrevivencia de los animales no fue significativa.

Por lo tanto, los datos presentes en esta tesis demuestran que es necesario eliminar o mejorar el eclipse inmunológico como condición previa para permitir que una terapia inmunológica anti-tumoral pueda ser efectiva.

Palabras Claves: Células Dendritas, fibrosarcoma MCC, inmunología tumoral, inflamación sistémica e inmunoterapia

***“Immunotherapy strategy against murine tumors during state of immunosuppression induce for the tumor”***

Although animals can be immunized against the growth of some tumor implants, most of the attempts to use immunotherapy to cause the regression of animal and human tumors once they have become established have been disappointing even when strongly immunogenic tumors were used as target. In this paper, we demonstrate that the failure to achieve an efficient immunological treatment against an established strongly immunogenic murine fibrosarcoma was paralleled with the emergence of a state of immunological unresponsiveness (immunological eclipse) against tumor antigens observed when the tumor surpassed the critical size of 500 mm<sup>3</sup>. In turn, the onset of the immunological eclipse was coincidental with the onset of a systemic inflammatory condition characterized by a high number of circulating and splenic polymorphonucleated neutrophils displaying activation and myeloid suppressor cell (Gr1/CD11b) and an increasing serum concentration of the pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 cytokines and C-reactive protein and serum A amyloid phase acute proteins. Treatment of tumor-bearing mice with a single low dose (0.75 mg/kg) of the synthetic corticoid dexamethasone (DX) significantly reduced all the systemic inflammatory parameters and simultaneously reversed the immunological eclipse. Two other anti-inflammatory treatments by using indomethacin or dimeric TNF- $\alpha$  receptor, also partially reversed the immunological eclipse although the effect was not as striking as that observed with DX. The reversion of the immunological eclipse was not enough on its own to inhibit the primary growing tumor. However, when we used the two-step strategy of inoculating DX to reverse the eclipse and then dendritic cells loaded with tumor antigens (CDs) as an immunization booster, a significant inhibition of the growth of both established tumors and remnant tumor cells after excision of large established tumors was observed, despite the fact that the vaccination alone (CDs) had no effect or even enhanced tumor growth in certain circumstances. Also, when we add an additional treatment

(passive transfer of naive lymphocytes or administration of ATRA), although there was a greater inhibition of tumor growth, but survival was not significant. Therefore, these data that we present is based on the rationale that it is necessary to eliminate or ameliorate the immunological eclipse as a precondition to allow an otherwise ineffective anti-tumor immunological therapy to have a chance to be successful.

Key words: dendritic cells, MCC fibrosarcoma, antitumor response, systemic inflammation and immunotherapy

Este trabajo de Tesis dio lugar a 3 publicaciones en revistas científicas y a 7 comunicaciones presentadas en congresos nacionales e internacionales.

### **Publicaciones**

- **Paula Chiarella**, Marisa Vulcano, Evangelina Laborde, Mónica Vermeulen, Juan Bruzzo, Bárbara Rearte, Oscar D. Bustuoabad, Raúl A. Ruggiero. “Reversión del eclipse inmunológico y vacunas terapéuticas contra el cáncer en un modelo experimental”. Medicina, Buenos Aires, Vol 67(1)-2007. p.44-8.
- **Paula Chiarella**, 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. (2008) 58:701-718.
- **Paula Chiarella**, Verónica Reffo, Juan Bruzzo, Oscar D. Bustuoabad, Raúl A. Ruggiero. “Therapeutic anti-tumor vaccines: from tumor rejection to enhancement?” Clinical Medical: Oncology (2008) 2: 237-245

### **Congresos**

- **Paula Chiarella**, Mónica Vermeulen, Oscar Bustuoabad, Federico Jensen, Marisa Vulcano, Raúl Ruggiero. “Comparación de distintos procedimientos de inmunoterapia contra un tumor murino”. Medicina, Buenos Aires, Vol.64 (supl. II)-2004. p.276-277.
- **Paula Chiarella**, Evangelina Laborde, Vanzulli Silvia, Vermeulen Mónica, Marisa Vulcano, Oscar Bustuoabad, Raúl Ruggiero. “Reversion of the Immunological Eclipse in Tumor-Bearing by Anti-inflammatory Treatment”. Abstracts Book. VII Latin American Congress of Immunology -2005. p-22.
- **Paula Chiarella**, Juan Bruzzo, Oscar Bustuoabad, Gabriela Camerano, Andrea Maglioco, Graciela Gran, Raúl Ruggiero, Marisa Vulcano. “Aumento de granulocitos y células mieloides inmaduras inmunosupresoras en bazo de ratones portadores de un fibrosarcoma murino en la etapa de eclipse inmunológico”. Medicina, Buenos Aires, Vol. 66 (supl. II)-2006. p.177.
- **Paula Chiarella**, Mónica Vermeulen, Juan Bruzzo, Gabriela Camerano, Andrea Maglioco, Graciela Gran, Marisa Vulcano, Oscar Bustuoabad, Raúl Ruggiero. “Inhibición de recidivas tumorales después de la extirpación de un fibrosarcoma murino mediante un tratamiento combinado de dexametasona y



células dendríticas estimuladas con lisado tumoral”. Medicina, Buenos Aires, Vol. 66 (supl. II)-2006. p.133.

- **Paula Chiarella**, Bruzzo Juan, Gabriela C. Fernández, Monica Vermeulen, Marisa Vulcano, Oscar Bustuoabad, Raul Ruggiero. “Two-step schedule of anti-tumor immunotherapy: anti-inflammatory treatment and dendritic cells-based vaccination.” 13<sup>th</sup> International Congress of Immunology. 2007
  
- **Paula Chiarella**, Juan Bruzzo, Gabriela Fernández, Mónica Vermeulen, Marisa Vulcano, Martin Isturiz, Oscar Bustuoabad and Raúl Ruggiero. “Two-Step schedule of anti-tumor immunotherapy: anti-inflammatory treatment and dendritic cell-based vaccination.” Recent Advances in Cancer Immunotherapy with an emphasis on vaccines. 9-10 October 2008, National Hellenic Research Foundation. Athens-Greece.

Esta tesis se la dedico a mis Padres y a Augus.

Quienes siempre me dieron la libertad y el  
apoyo de hacer lo que me gusta.

Gracias, los amo.

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

A mis padres, Luciana y Daniel, que siempre me han dado su apoyo incondicional y a quienes debo este triunfo profesional, por todo su trabajo y dedicación para darme una formación académica y sobre todo humanista y espiritual. A ellos les debo todo lo que soy; gracias a su esfuerzo y contención he finalizado este proceso superando todas las adversidades.

A Augus que me acompañó en esta aventura y que, de forma incondicional, supo entender mis ausencias y mis malos momentos. Gracias amor, porque cada día al lado tuyo aprendo nuevas cosas y haces de mí una mejor persona. Te amo.

A mi hermano, Mariano, quien siempre supo darme una palabra de aliento en el momento justo y por poder hablar de lo que sea. Porque juntos nos entendemos y soportamos cuando los viejos se ponen incontrolables. A Flor, mi cuñada, por decirme siempre lo orgullosa que está de mí, lo cual me agranda el alma. Y sobre todo quiero agradecerles a ambos por darme a la hermosura de mi sobrino, Santino.

No quiero dejar de agradecer a mis tíos y padrinos, María Teresa y Gianni, quienes me malcriaban continuamente y siempre me brindaron todo su amor y su apoyo.

Gracias Nona por seguir al lado mío, y hacerme ver que todo es posible.

A mi hermana del alma y del corazón Ale, porque siempre estuviste a mi lado en los buenos y malos momentos, haciéndome ver que no importan las distancias. Gracias por aguantarme tanto, con mis olvidos y todo. Sabes que te quiero un montón.

Doy gracias también a mis suegros, Haydee y Guillermo, que me aceptaron como una hija más y me trataron como tal.

Esta tesis tampoco hubiera sido posible sin la ayuda de Raúl, quien ha confiado en mi persona, por la paciencia y por la dirección durante todos estos años. Gracias por los continuos consejos, el apoyo y el ánimo que me brindaste. Pero sobre todo quiero agradecerte por aguantar y entender mis ausencias en el

laboratorio. A mi compañero de equipo, Juan, por salvarme de muchos pasajes, y por su ayuda.

A Vero y Evi por enseñarme a ver la vida con otros ojos. Hacer que el día a día en el laboratorio sea divertido, aún en los peores momentos. Gracias chicas porque sin su eterno apoyo esta tesis no hubiera salido adelante, tanto en lo laboral como en lo emocional.

A Luciana y Gaby, demostrándome que siempre es buen momento para encontrar nuevos amigos.

A las chichis, Leti, Pau, Colo y Belén, por todos estos años de vivencias, y por las continuas risas y las charlas eternas. Las quiero.

A Martín, ya que a su lado uno aprende eternamente y por las palmadas que a uno le saca el aire, pero siempre con alegría. Y a Mami-Carmen, por hacer que mis mañanas sean divertidas, y por permitirme ser parte de su grupo sin serlo. Gracias.

A todos mis amigos, amigas y todas aquellas personas de la Academia Nacional de Medicina que han sido importantes para mí durante todo este tiempo. A todos mis “maestros científicos” que aportaron a mi formación. Para quienes me enseñaron más que el saber científico, a quienes me enseñaron a ser lo que no se aprende en laboratorio y a compartir el conocimiento con los demás, a ellos: Juan, Pablo, Dai, Mer, Pao, Eli, Sole, Juli, Coni, Silvia, Mer, Bárbara, Kao y Carmen.

A las Chicas de citometría de flujo, que sin su ayuda y su aguante, muchos resultados no hubieran salido, Marta, Nora, Norma.

A Evelia y Mabel, que sin su ayuda, el laboratorio sería un desastre.

**Nunca un año se presentó con tantas pruebas y obstáculos, con seguridad puedo decir que los aprendizajes obtenidos en este proceso marcarán mi camino de hoy en adelante. Es por eso que quiero aprovechar para decirles que cuando de verdad quieran algo, luchen por ello; que cuando las cosas son difíciles se disfrutan mucho más, y que sepan que a nuestros padres no les podemos regalar algo mejor que ver a un hijo feliz por tener lo que se merece gracias a su esfuerzo**

# Índice

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
1. NEOPLASIAS.....	19
1.1. <i>Introducción .....</i>	<i>19</i>
1.2. <i>Definición y características generales. ....</i>	<i>19</i>
1.3. <i>Tipos de cánceres. ....</i>	<i>21</i>
2. ETIOLOGIA.....	23
3. TRATAMIENTOS CONVENCIONALES CONTRA EL CANCER .....	24
4. INMUNOLOGIA TUMORAL: RESEÑA HISTÓRICA.....	27
4.1. <i>Inicios de la Inmunología Tumoral.....</i>	<i>27</i>
4.2. <i>“La Edad de Oro”.....</i>	<i>27</i>
4.3. <i>El fin de la edad de oro. Diferencia entre tumores espontáneos e inducidos .....</i>	<i>29</i>
4.4. <i>Renacimiento de de la Inmunología Tumoral.....</i>	<i>31</i>
5. LA INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER: REDEFINICIÓN DE LA TEORÍA DE LA INMUNOVIGILANCIA. 31	
<i>Eliminación.....</i>	<i>32</i>
<i>Equilibrio.....</i>	<i>35</i>
<i>Escape .....</i>	<i>36</i>
6. TERAPIAS MODIFICADORAS DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA: INMUNOTERAPIAS ...	37
7. CÉLULAS DENDRÍTICAS:.....	39
7.1. <i>Breve introducción: origen, clasificación y función.....</i>	<i>39</i>
7.2. <i>Citoquinas: un papel esencial.....</i>	<i>41</i>
7.3. <i>El rol de las CDs en la respuesta inmune .....</i>	<i>43</i>
7.3.1. <i>Activación de los linfocitos T .....</i>	<i>43</i>
7.3.2. <i>El rol de las CDs en la tolerancia central y periférica .....</i>	<i>45</i>
7.3.3. <i>La otra cara de la moneda de las CDs.....</i>	<i>46</i>
7.3.4. <i>Posible rol de las CDs en la respuesta inmune antitumoral y en la inmunoterapia             contra el cáncer .....</i>	<i>49</i>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
OBJETIVO GENERAL:.....	54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
ANIMALES.....	57
TUMOR.....	57
MEDIO DE CULTIVO.....	57

CÁLCULO DEL VOLUMEN TUMORAL .....	58
DOSIS TUMORAL 50 .....	58
ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	58
PREPARACIÓN DE EXTRACTO ACELULAR DE TUMOR.....	58
OBTENCIÓN DE MEDIO CONDICIONADO CON GM-CSF MURINO .....	59
OBTENCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS.....	60
MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CON EXTRACTO ACELULAR DE TUMOR MCC.....	61
MEDIO CONDICIONADO DE TUMOR MCC.....	61
OBTENCIÓN DE LINFOCITOS DE GANGLIO LINFÁTICO .....	62
CITOMETRÍA DE FLUJO.....	62
ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA ACTIVACIÓN DE LOS POLIMORFONUCLEARES (PMN): .....	63
OBTENCIÓN DE SUERO DE RATÓN .....	64
PREPARACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES IRRADIADAS .....	64
TÉCNICAS DE INMUNIZACIÓN: ACTIVAS .....	65
A. <i>Implantación y extirpación del tumor</i> .....	65
B. <i>Células tumorales irradiadas</i> .....	65
C. <i>Células tumorales inactivadas por calor</i> .....	65
D. <i>Células dendríticas pulsadas con lisado de tumor o con células tumorales irradiadas</i> ..	65
E. <i>Dosis sub-letales de tumor</i> .....	65
TÉCNICAS DE INMUNIZACIÓN: PASIVA .....	66
A. <i>Ensayo de transferencia adoptiva</i> .....	66
TRATAMIENTO CON ANTI-INFLAMATORIOS .....	66
ENSAYO DE INMUNIDAD CONCOMITANTE .....	67
ENSAYO DE PARABIOSIS .....	67
TEST WINN.....	68
ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MEDIADO POR CÉLULAS.....	68
DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE INFLAMACIÓN SISTÉMICA.....	68
ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY) DE CAPTURA .....	68
TRATAMIENTO CON ACIDO ALL-TRANS RETINOICO (ATRA).....	69
WESTERN BLOTTING .....	69
ANÁLISIS ESTADÍSTICO: .....	70
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>72</b>
<b>CAPITULO 1.....</b>	<b>72</b>
1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL TUMOR MCC.....	72
1.1. <i>Cinética de crecimiento del tumor MCC</i> .....	72
1.2. <i>Histología del tumor MCC</i> .....	73

1.3.	<i>Características de la inmunogenicidad del tumor MCC</i> .....	73
1.4.	<i>Inicio y decaimiento de la inmunidad anti-tumoral durante el crecimiento progresivo del tumor MCC</i> .....	75
1.5.	<i>Evaluación de las distintas poblaciones esplénicas durante el crecimiento del tumor MCC</i>	79
	<i>Conclusión parcial</i> .....	82
<b>CAPITULO 2</b> .....		<b>83</b>
2.	<b>CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU RELACIÓN CON EL TUMOR</b> .....	83
2.1.	<i>Extracto acelular del tumor MCC induce la maduración de células dendríticas</i> .....	83
2.2.	<i>Evaluación fenotípica de las distintas poblaciones de médula ósea durante el crecimiento del tumor MCC</i> .....	83
2.3.	<i>Diferenciación y maduración de células dendríticas provenientes de ratones con tumor</i>	86
2.4.	<i>¿Son los factores tumorales responsables de la generación de CDs defectuosas?..</i>	90
2.4.1.	<i>Diferenciación de las células dendríticas en presencia de factores tumorales</i> .....	90
	<i>Conclusión parcial</i> .....	92
<b>CAPITULO 3</b> .....		<b>93</b>
3.	<b>INFLAMACIÓN Y TUMOR</b> .....	93
3.1.	<i>Evidencia que la des-regulación de la inmunidad concomitante está asociada a la aparición de mecanismos supresores activos</i> .....	93
3.2.	<i>El crecimiento del tumor MCC se encuentra asociados a un proceso de inflamación sistémica</i> .....	95
3.3.	<i>Tratamiento anti-inflamatorio con dexametasona revierte los parámetros de inflamación sistémica asociados al crecimiento progresivo del tumor MCC</i> .....	99
3.4.	<i>El tratamiento anti-inflamatorio con dexametasona revierte el eclipse inmunológico</i>	102
<b>CAPITULO 4</b> .....		<b>107</b>
4.	<b>TRATAMIENTOS INMUNOTERAPUETICOS PARA REVERTIR EL CRECIMIENTO TUMORAL</b> .....	107
4.1.	<i>Terapia mixta de dexametasona y células dendríticas estimuladas con lisado de tumor MCC</i> .....	108
4.2.	<i>Combinación de terapia en dos pasos (DX+CD) con transferencia adoptiva de linfocitos</i> .....	112
4.3.	<i>Combinación de terapia en dos pasos (DX+CDs) con estrategia para diferenciar células mieloides supresores (MDSC)</i> .....	114

<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>118</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>129</b>



## ABREVIATURAS

MCC	Fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno
eaMCC	Extracto acelular de tumor MCC
CDs	Células Dendríticas
CDm	Células Dendríticas maduras
CDi	Células Dendríticas inmaduras
CD(#)	Cluster de diferenciación
SF	Solución Fisiológica
CPA	Célula presentadora de antígenos
LPS	Lipopolisacarido
pCD	Célula Dendrítica plasmocitoide
mCD	Célula Dendrítica mieloide
MHC I	Molécula de histocompatibilidad de clase I
MHC II	Molécula de histocompatibilidad de clase II
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos
NK	Célula natural killer
H&E	Hematoxilina y eosina
PE	Ficoeritrina
FITC	Fluoresceína
s.c.	Subcutáneo
i.p.	Intraperitoneal
i.f.p.	Intra food pad
ATRA	Acido <i>all-trans</i> retinoico
MyM	Materiales y Métodos
mAb	Anticuerpo monoclonal
sn	Sobrenadante
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
ac	Anticuerpo
PFA	Paraformaldehído
ES	Error estándar
IL	Interleuquina
Ag	Antígeno
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
BSA	Albumina bovina sérica
FACS	PBS suplementado con 1% BSA y 0,5% de NaN <sub>3</sub>
IMDM	Medio Dulbecco modificado por Iscove
LB	Linfocito B

LT	Linfocito T
Treg	Linfocitos T regulatorios
PBS	Solución salina de fosfato
RPMI-5	Medio RPMI-1640 suplementado con 5% de SFB
$\mu$ l	Microlitro
mg	Miligramo
ml	Mililitro
$\mu$ g	Microgramo
NKT	Linfocito T con marcadores de NK
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
HSP	Proteína de choque térmico ( <i>Heat shock protein</i> )
Th1	Linfocitos T colaboradores 1 ( <i>helper-1</i> )
Th2	Linfocitos T colaboradores 2 ( <i>helper-2</i> )
CTL	Linfocitos T citotóxicos

# **INTRODUCCION**

# **Introducción**

## **1. NEOPLASIAS**

### **1.1. Introducción**

Las células de los organismos pluricelulares se diferencian y proliferan siguiendo un programa genético que está regulado por estímulos extracelulares. Alteraciones en este sistema de regulación que, a pesar de todos los adelantos en las últimas décadas no se conocen completamente, parecen constituir la base genética del cáncer, que el cual se entiende como una acumulación de mutaciones que afectan a las células somáticas durante la vida de un organismo y hacen que estas proliferen de forma incontrolada. Según esta interpretación, que ha sido aceptada por la mayoría de los investigadores, varios pasos serían necesarios para transformar una célula normal en una célula cancerosa. La mayoría de ellos, si no todos, parecen incluir mutaciones genéticas.

La mayoría de los cánceres comienzan de una sola célula, la cual, ha tenido que acumular mutaciones en varios genes diferentes antes de llegar a formar un cáncer. El que una determinada célula se convierta en cancerosa en un momento determinado dependerá de varias causas posibles, tales como la acción de ciertos agentes químicos o ionizantes, errores durante la duplicación celular del DNA, interacción de ciertos agentes virales con el genoma de la célula huésped, factores hereditarios, etc.

### **1.2. Definición y características generales.**

El término neoplasia significa de acuerdo a sus raíces etimológicas; "tejido de nueva formación". Esto nos dice poco sobre la naturaleza biológica de la neoplasia. Entre las definiciones explicativas, la más aceptada es la que formuló Ewing en los años 30' (Ewing 1930). Según ésta, una neoplasia es un crecimiento

proliferativo, relativamente autónomo de un tejido (Pitot 1978) (Hanahan and Weinberg 2000). Esta definición contiene tres elementos esenciales: el carácter de crecimiento proliferativo; el carácter tisular y el carácter de autonomía relativa. El carácter de “crecimiento proliferativo” implica un aumento en el número de células debido a una tasa mayor de división y/o a una tasa menor de muerte que la de los tejidos normales. El carácter de “tisular” significa que el término neoplasia es definido para entidades pluricelulares. De este modo, por esta definición, los organismos unicelulares estarían libres de esta enfermedad. El carácter de “autonomía” hace referencia a que las células neoplásicas se dividen sin estar sujetas o reguladas por los mecanismos que controlan la división de células normales en el mismo organismo. El adjetivo “relativo” aplicado al término autonomía suaviza su carácter, destacando que si bien las células que proliferan no se ajustan por completo al control de los mecanismos reguladores de los organismos, ello no significa que desconozcan todas las señales que en él operan. Hay casos en los cuales el carácter autónomo de una neoplasia es muy tenue y solamente relativo al tejido en el cual ha surgido. El carácter de autonomía relativa es el rasgo distintivo de las neoplasias por el que se diferencian de otras proliferaciones como las inflamaciones, las regeneraciones y las hiperplasias (Agius 2005). Los crecimientos proliferativos compensadores como las regeneraciones o inflamaciones, contribuyen a la preservación y a la defensa del organismo, por lo que no pueden considerarse ajenos a las reglas que controlan la proliferación celular y la organización del individuo. Las hiperplasias constituyen una respuesta a una carencia de tejido o a una mayor demanda de él, o a un efecto de una alteración hormonal. En cualquier caso la hiperplasia no posee el carácter de autonomía ya que depende de un estímulo funcional para su aparición y desaparece cuando aquél desaparece (Hanahan and Weinberg 2000).

Debe señalarse que lo que hemos analizado en los párrafos que preceden es la interpretación convencional del cáncer que se basa en los conceptos de Ewing y que ha sido tácitamente aceptada por la mayoría de los investigadores. Sin embargo hay otras interpretaciones de los procesos malignos (Zajicek 1996; Sonnenschein and Soto 2000; Ruggiero and Bustuoabad 2006) que han

cuestionado algunos aspectos de la teoría convencional y que pueden ser importantes no sólo desde el punto de vista teórico sino también para desarrollar nuevas estrategias de tratamientos. No obstante la discusión de estas teorías alternativas se encuentra más allá de los alcances de esta Tesis.

De acuerdo a sus características y a su comportamiento en el organismo se pueden diferenciar dos tipos de neoplasias, las benignas o tumores benignos y las malignas o cánceres. Las primeras permanecen localizadas estrictamente en su tejido de origen y, en la mayoría de los casos, no amenazan la vida del individuo y pueden ser removidas por cirugía. Por otro lado las neoplasias malignas tienen la capacidad de invadir tejidos distintos al de origen, ya sean éstos contiguos o distantes; en este último caso, cuando el tumor se ha diseminado a tejidos distantes, sin contigüidad con el tejido de origen, se habla de *metástasis*.

### **1.3. Tipos de cánceres.**

Las neoplasias malignas o cánceres pueden ubicarse en tres grupos diferentes (Cairns 1976; Cairo 1978; Society 2010) de acuerdo a su origen histológico: carcinomas, sarcomas y 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 carcinomas (Maugh 1975; Horner MJ, Ries LAG et al. 2009). En los seres humanos los cánceres más frecuentes como el de pulmón, mama, colon, etc. 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, etc. 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.

Hay clasificaciones mucho más específicas y rigurosas de los tipos de cánceres, en los cuales se toma como criterio el órgano en el cuál se originaron y el tipo de células implicadas dentro de este órgano. De acuerdo a estas clasificaciones, hay aproximadamente unas doscientas variedades de la enfermedad (Society 2010).

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”. Estos tumores, como también los tumores benignos, tienen dos componentes básicos en su estructura:

- Las células neoplásicas proliferantes que constituyen el parénquima.
- Su estroma de sostén, constituido por tejido conectivo y vasos sanguíneos.

El estroma es esencial para el crecimiento y la propagación del tumor dado que le provee de nutrientes, factores de crecimiento y citocinas. También se ha sugerido que en algunos casos el estroma podría actuar como una barrera para la presentación antigénica y el reconocimiento por parte del sistema inmune.

## **2. ETIOLOGIA.**

Dada la distribución del cáncer en una amplia variedad de vertebrados e invertebrados (Ruggiero and Bustuoabad 2006), no es extraño que hayan muchas causas conocidas para diferentes procesos malignos.

Ciertamente, un gran número de agentes físicos -como rayos X o luz ultravioleta- y químicos –como metilcolantreno, metano, nitrosaminas, arsénico, componentes del humo del tabaco, etc.- se encuentran asociados etiológicamente a diversos cánceres, tanto en el hombre como en animales (Carbone, Klein et al. 2004).

En algunos casos, la asociación ha sido indiscutiblemente determinada pero en otros, principalmente en seres humanos, donde, por razones éticas, no es posible la experimentación directa, la relación causa – efecto no se encuentra establecida de una manera tan concluyente, aunque para ciertos agentes haya indicios epidemiológicos muy poderosos en ese sentido. Debe agregarse también, la capacidad oncogénica de diversos virus sobre todo en mamíferos (incluidos primates) y aves. En los seres humanos hay algunos virus que se consideran asociados causal o co-causalmente a algunos tumores malignos. Por ejemplo el virus de Epstein Barr al linfoma de Burkitt y al carcinoma nasofaríngeo, el virus del papiloma humano a cánceres urogenitales, el virus de la hepatitis B a tumores hepatocelulares, el virus HTLV (human T leukemia virus) a la leucemia de células T en adultos, etc. (Lajer and von Buchwald ; Tsai WL 2010).

Desde principios de los años 70', el advenimiento de las técnicas de genética molecular permitió elaborar una interpretación unificada del cáncer, según la cual todas sus causas mediatas (esto es, carcinógenos físicos, químicos o virales) tendrían una causa inmediata común, a saber la mutación de ciertos genes celulares (oncogenes y anti-oncogenes) que participarían en el control de la proliferación celular (Hahn and Weinberg 2002). Es decir, de acuerdo a esta hipótesis, el cáncer es concebido como la combinación de daños y cambios que inducen a una célula normal de un individuo sano a crecer en forma autónoma, aún cuando el estímulo inicial haya desaparecido y a pesar de los sistemas que



vigilan y modulan la división celular. Los mecanismos que inician este proceso involucran una serie de alteraciones irreversibles en la maquinaria genética de la célula normal que se trasladan a las sucesivas generaciones de células hijas. Luego de un período de tiempo variable la población celular de los tumores malignos se torna heterogénea y ello permite la selección o evolución de variantes cada vez más agresivas e incontrolables para los sistemas de defensa propios del organismo y para las terapias que se desarrollan para controlar la enfermedad, fenómeno que se conoce como progresión tumoral.

### **3. TRATAMIENTOS CONVENCIONALES CONTRA EL CANCER**

En la actualidad existen tres tratamientos convencionales contra el cáncer: la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia.

La cirugía es el método más empleado para tumores pequeños y localizados en un lugar concreto. Para que sea completamente eficaz se precisa extirpar parte del tejido que rodea el tumor para asegurar así que todas las células cancerosas han sido extirpadas. Si el cáncer se ha extendido a otras zonas, a través de la sangre o de la linfa, habrá que realizar otros tratamientos, bien sean añadidos a la cirugía o únicos y distintos a ella.

La radioterapia utiliza partículas de alta energía capaces de penetrar al cuerpo. A través de una máquina, llamada acelerador lineal, se genera y dirigen esas partículas hacia el lugar concreto donde se tengan que aplicar. La radioterapia utiliza partículas similares a los rayos X, que se utilizan para hacer una radiografía normal, lo que ocurre es que en éstas últimas, la cantidad suministrada es muy pequeña. Las células cancerosas son especialmente sensibles a la radiación. La radioterapia puede utilizarse como tratamiento único en aquellos casos en que los tumores son especialmente sensibles a la radiación y no hay señales de que se hayan extendido a sitios distantes del organismo. Puede emplearse como tratamiento suplementario a la cirugía, aplicándolo *antes* de esta, con el objetivo de disminuir el tamaño tumoral y facilitar de ese modo su

extirpación o *después* para eliminar las células residuales que hubieran quedado *in situ* luego de la operación.

La quimioterapia actúa sobre las células que tiene una alta tasa de división. Esto hace que muchos tumores sean sensibles a la quimioterapia. Sin embargo, por un lado, existen células tumorales que se encuentran en estado de reposo y por otro lado, existen células normales que exhiben una alta tasa de división. Esto significa que si bien la quimioterapia es útil tiene la limitación de que no es especialmente eficiente ni específica contra las células tumorales. Un problema adicional lo constituye el hecho de que tarde o temprano los tratamientos quimioterapéuticos terminan seleccionando variantes tumorales resistentes a esas drogas, todo lo cual limita su aplicación terapéutica (Westwood, Berry et al. ; Bailar and Gornik 1997; Nakanishi, Karp et al. 2003).

En los últimos años, se están empleando combinaciones de drogas quimioterapéuticas porque se ha comprobado que su acción conjunta es más eficaz para destruir el cáncer (Fukuda, Saikawa et al. ; Shi, Yao et al.). Se suelen combinar medicamentos anticancerígenos con modos de acción distintos y capacidad para producir diferentes efectos. Estas combinaciones pretenden ser más eficaces sobre las células cancerosas y menos dañinas para las células normales.

Los enfermos con cáncer son habitualmente tratados con una combinación de cirugía, radioterapia y quimioterapia. Pero aún así, este tratamiento combinado no es suficiente en una multitud de casos (Cimini and Ippoliti), especialmente en aquellos tumores que han invadido tejidos adyacentes y distantes. Prueba de ello es que, en la actualidad, el cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo luego de las enfermedades cardiovasculares, lo que impulsa a médicos e investigadores a encontrar nuevas modalidades terapéuticas contra esta terrible enfermedad. Este esfuerzo está dirigido al perfeccionamiento de los sistemas tradicionales de tratamiento y/o a través de la introducción de nuevas formas terapéuticas, como la hormonoterapia (aplicada por ejemplo a ciertos cánceres de mama (Gotay and Dunn ; Trinh, Sas et al.) o las terapias moleculares (Arrieta, Hernandez-Pedro et al. ; Arrieta, Villarreal-Garza et al. ; Cimini and Ippoliti), que

tienen por objeto afectar caminos de señalización presumiblemente específicos de las células de ciertos tumores, aunque en su gran mayoría estas nuevas terapias se encuentran en etapa de experimentación.

En resumen, las terapias convencionales contra el cáncer, tales como la cirugía, la radiación y la quimioterapia están limitadas porque su aplicación se restringe a tumores localizados (cirugía) o por su carencia de especificidad tumoral y sus efectos tóxicos colaterales (radiación y quimioterapia).

Una terapia ideal debería combinar tanto especificidad como eficacia, actuando selectivamente y siendo atóxica, lo cual implicaría sólo la eliminación de las células tumorales sin causar perjuicio a las células normales. La inmunoterapia parecería ser, en principio, ese tratamiento ideal ya que mediante la estimulación del propio sistema inmune del paciente (inmunoterapia activa) o mediante la inoculación eventual de anticuerpos o células inmunes (inmunoterapia pasiva) podrían reconocerse y eliminarse las células tumorales sin afectar al resto del organismo (Westwood, Berry et al. 2010).

Sin embargo, como veremos en el punto siguiente, aún cuando la inmunoterapia fuera propuesta hace más de un siglo como tratamiento contra el cáncer, no ha sido, al menos hasta hoy, la eficaz herramienta antitumoral que imaginaron sus primeros impulsores.

## **4. INMUNOLOGIA TUMORAL: Reseña histórica**

### **4.1. Inicios de la Inmunología Tumoral**

La historia de la inmunología tumoral se remonta a principios del siglo XX cuando Loeb y Jensen en América y Ehrlich en Europa, comenzaron a trasplantar tumores en animales de experimentación (Ehrlich 1909). Ellos observaron que si un animal sanaba espontáneamente de un tumor trasplantado, se hacía resistente a un inóculo posterior con células de ese tumor. La misma resistencia se observaba cuando el tumor se extirpaba quirúrgicamente. Se interpretaron estos hechos asumiendo que el animal se había inmunizado contra el tumor como resultado de la presencia de antígenos específicos presentes en sus células, lo que parecía abrir las puertas para la fabricación de vacunas contra el cáncer.

Sin embargo, la expectativa de un rápido éxito de la inmunoterapia antitumoral fue pronto desalentada cuando se comprendió que si bien un animal podía hacerse inmune contra un tumor de trasplante, no era porque detectaba en él antígenos específicos del tumor, sino porque reconocía antígenos de histocompatibilidad normales del animal donante del tumor, que diferían de los propios (Old and Boyse 1964; Suss R 1973). Debe recordarse que en la primera década del siglo XX no se habían desarrollado aún las cepas endocriadas de ratones y los trasplantes se hacían entre animales exocriados que, como los seres humanos difieren en sus antígenos de histocompatibilidad. Esto trajo como consecuencia un profundo descrédito en la Inmunología Tumoral que duró casi 50 años.

### **4.2. “La Edad de Oro”**

En 1957, Prehn y Main publicaron un trabajo que se hizo célebre (Prehn and Main 1957). Los autores utilizaron cepas estrictamente endocriadas de ratones y fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno, un hidrocarburo policíclico con gran poder cancerígeno. Se mostró que los ratones a los que se les había implantado y

extirpado un tumor eran capaces de resistir implantes posteriores de células del mismo tumor, aunque injertos de tejido normales del mismo donante eran aceptados sin ningún inconveniente. Más aún, cuando el desafío se realizaba con células de un tumor distinto al que había sensibilizado al animal, aquellas crecían sin oposición. Estos resultados demostraron en forma inequívoca que la respuesta inmune desarrollada contra estos tumores estaba dirigida contra antígenos presentes en las células tumorales que no sólo diferían de los antígenos normales sino de los presentes en otro tumor inducido por el mismo carcinógeno químico. En 1960, Klein y colaboradores demostraron que el pre-tratamiento con células tumorales muertas por radiación, también inmunizaba contra fibrosarcomas inducidos por metilcolantreno con la misma eficiencia que lo hacía la implantación y la extirpación del tumor (Klein, Sjogren et al. 1960). Ambos métodos son considerados los dos procedimientos clásicos de vacunación contra tumores.

Esto inició lo que puede ser llamada "*La edad de oro de la Inmunología Tumoral*", que se extendió por espacio de veinte años. En efecto, entre 1960 y 1980, la expectativa despertada por la inmunología oncológica fue de tal magnitud que muchas de las mejores revistas especializadas en cáncer dedicaban casi todas sus páginas a trabajos de aquella disciplina. En este período se documentó la inmunogenicidad de una gran variedad de tumores de ratón, rata y hámster inducidos por diferentes agentes químicos (como metilcolantreno, dimetilbenzatraceno, nitrosaminas, etc.), físicos (rayos ultravioleta, rayos x) y virales (retrovirus, polioma, adenovirus, herpes, etc.), lo que daba una idea de la generalidad del fenómeno (Old and Boyse 1964; Hellstrom and Hellstrom 1969). En estos años además se formularon muchos de los conceptos básicos de la inmunología tumoral. En primer lugar, se demostró que los ratones que habían sido inmunizados contra un tumor, podían transferir pasivamente ese estado inmune con linfocitos (especialmente linfocitos derivados del timo) pero no con anticuerpos, indicando que la respuesta inmune contra tumores se llevaría a cabo principalmente a través de la rama celular y no humoral (Hellstrom and Hellstrom 1969). Esto es válido para la mayor parte de los tumores de ratón, salvo algunas leucemias donde los anticuerpos cumplen un rol antineoplásico. En segundo lugar,

se diseñaron diferentes ensayos *in vitro* destinados a determinar la antigenicidad de los tumores en cultivo. En tercer lugar, Thomas y Burnet formularon la teoría de la inmunovigilancia (Burnet 1957). Según ésta, el sistema inmune, a través de sus linfocitos T, tiene como función además de proteger contra agentes patógenos externos como virus, patrullar el organismo a la búsqueda de células tumorales para eliminarlas antes de que se manifiesten como tumores clínicos. Esta teoría estaba avalada por un hecho: ratones o pacientes inmunodeficientes, cualquiera sea el origen de esta inmunodeficiencia exhiben un número mayor de tumores que su contraparte normal. Por otra parte, la mera existencia de un tumor en un organismo con un sistema inmune aparentemente normal, debía ser la manifestación de una falla específica en el sistema de vigilancia. Por lo tanto para curar un tumor, de acuerdo a esta teoría, debería previamente comprenderse la naturaleza de esa falla y corregirla.

La idea resumida en la tríada: *un tumor-un antígeno-una vacuna* fue el centro de todos los esfuerzos de la época. Sin embargo esas grandes expectativas, como veremos, no se vieron correspondidas por la realidad.

#### **4.3. El fin de la edad de oro. Diferencia entre tumores espontáneos e inducidos**

En 1976, Hewitt y colaboradores publicaron un trabajo que hoy es considerado un punto de inflexión en la historia de la inmunología tumoral (Hewitt, Blake et al. 1976). A diferencia de la mayoría de los trabajos anteriores que utilizaban tumores experimentales inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos, físicos o virales, Hewitt empleó exclusivamente tumores de origen espontáneo. Los resultados de su investigación, basados en el estudio de 27 tumores espontáneos de ratón revelaron que, a diferencia de lo observado con tumores inducidos, los tumores espontáneos no exhibían ninguna inmunogenicidad detectable, aún cuando Hewitt y colaboradores utilizaron las mismas técnicas de inmunización que habían permitido demostrar la fuerte inmunogenicidad de los tumores inducidos. En 1981, la misma conclusión fue alcanzada por Middle y Embleton trabajando con 32 tumores espontáneos de rata (Middle and Embleton 1981). Estos

resultados completaban un trabajo anterior en el que no se hallaba inmunogenicidad en tumores murinos inducidos con pequeñas y sucesivas dosis de agentes físicos y químicos que parecían simular, mucho más realísticamente que los tumores generados por dosis únicas y masivas de carcinógenos, la génesis de los tumores surgidos espontáneamente en los diversos animales y seres humanos.

Además de estos experimentos, otros tres hechos ayudaron a marcar la finalización de la Edad de Oro de la inmunología tumoral. El primero fue la comprobación de que si bien pacientes y animales inmunodeficientes exhibían una mayor proporción de tumores, éstos eran en gran medida, derivados del sistema linforreticular pero no eran los tumores más comunes como el de pulmón, mama, etc. Si la vigilancia inmunológica hubiera sido el mecanismo antitumoral universal que se había propuesto, todos estos tumores deberían haber aumentado su frecuencia en individuos inmunosuprimidos.

El segundo hecho fue la comprobación de que los ratones nude, genéticamente timoprivos no exhibían una mayor frecuencia de tumores espontáneos que los ratones convencionales, lo que sugería que, aún cuando pudiera existir, la vigilancia inmunológica no estaba mediada por linfocitos T derivados del timo, como habían postulado los creadores de la teoría.

El tercer hecho fue el sistemático fracaso de las terapias inmunológicas aplicadas en esos años contra tumores en crecimiento o aplicadas a pacientes cuyos tumores habían entrado en remisión y que recibían el tratamiento para evitar una recidiva.

Por estas razones el comienzo de los 80' encontró a la inmunología tumoral en una situación de descrédito reflejado en el escasísimo número de trabajos publicados en la especialidad. Este estado de cosas se prolongó hasta mediados de la década siguiente.

#### **4.4. Renacimiento de de la Inmunología Tumoral.**

En los 90' comenzaron a conocerse con más detalle los distintos pasos celulares y moleculares del reconocimiento antigénico y de la activación de la respuesta inmune celular. De primordial importancia fue la comprensión del papel que cumplen las células dendríticas como células presentadoras de antígenos. Todos estos estudios llevaron a considerar la posibilidad de elaborar nuevas, más finas y eficaces vacunas antitumorales, lo cual resultó en un renacimiento de la inmunología tumoral.

Por otro lado, la extensión del concepto de vigilancia inmunológica, más allá de la órbita exclusiva de los linfocitos T, la revaloración del rol que cumplirían las células denominadas Natural Killers (NK) y la posibilidad de contar con ratones knock-out para diferentes componentes del sistema inmune, permitió despertar el interés sobre ciertos aspectos de la teoría de Thomas y Burnett, sobre la base de que en diferentes ratones privados de uno u otro componente asociado a la respuesta inmune se evidenciaba la aparición de un espectro de tumores que si bien no abarcaba en general a los cánceres más comunes, no se restringía solo a tumores hematopoyéticos.

Es decir que a partir de la década del 90 y después de quince años de gran escepticismo se comenzó a plantear nuevamente la posibilidad de que el cáncer pudiese ser abordado por medio de terapias inmunológicas.

#### **5. LA INMUNOEDICIÓN DEL CÁNCER: Redefinición de la teoría de la inmunovigilancia**

La teoría de la inmunovigilancia del cáncer ya no es suficiente para describir con precisión las complejas interacciones que se producen entre un tumor en desarrollo y el sistema inmune del huésped. Inicialmente, se pensó que la inmunovigilancia cumplía la función de proteger al organismo, a través del sistema inmune adaptativo, en las etapas muy tempranas (o pre-clínicas) del cáncer. Contrariamente, hoy en día se sabe que tanto la inmunidad innata como

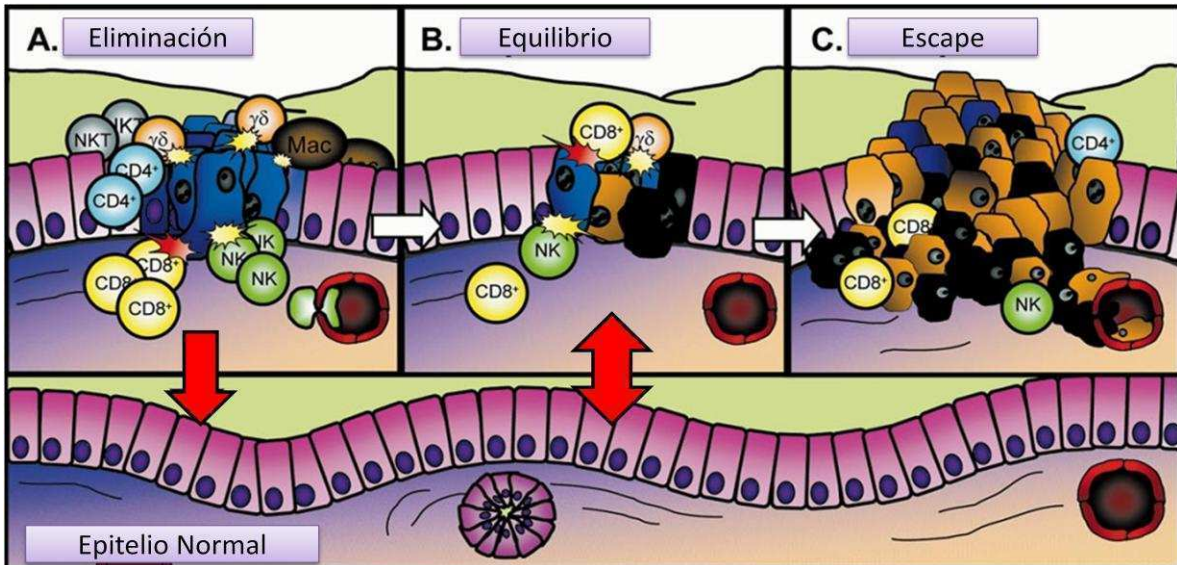


adaptativa participan en el proceso y funcionan no solo como protectoras del hospedador contra el desarrollo de tumores sino también para esculpir, o editar, la inmunogenicidad que eventualmente puede generar el tumor. Por lo tanto, se ha propuesto el uso del término más amplio " inmunoedición del cáncer " para enfatizar la forma más adecuada del doble papel de la inmunidad, no sólo en la prevención, sino también en el re-arreglo de la enfermedad neoplásica (Shankaran, Ikeda et al. 2001; Dunn, Bruce et al. 2002). Inmunoección del cáncer por lo tanto representa un perfeccionamiento de la hipótesis original de la inmunovigilancia del cáncer, pero es más amplia en su alcance. Es por ello que la hipótesis de la inmunoección contempla las 3 etapas del tumor, o como las denominaron los autores Dunn y col (Dunn, Old et al. 2004) "las tres E de la Inmunoección del cáncer": eliminación, equilibrio y escape.

### **Eliminación**

La fase de eliminación representa el concepto original de la inmunovigilancia (Figura I-A y Figura II). Si en esta fase se erradica satisfactoriamente el desarrollo del tumor, representa el proceso de inmunoección sin llegar a la progresión y las fases subsiguientes. El rechazo inmunológico de un tumor en desarrollo, como la defensa contra patógenos microbianos, requieren una respuesta integrada que involucre las armas tanto de una respuesta inmune innata como adaptativa (Janeway 1989). El primer paso de una respuesta inmune antitumoral (Figura I-A) ocurre cuando las células del sistema inmune innato se alertan con la presencia de un tumor en desarrollo, al menos en parte debido a la interrupción del tejido local que se produce como resultado de los procesos de remodelación del estroma, parte integral de la fisiología básica de desarrollo de tumores sólidos. El estroma remodelado durante los procesos de angiogénesis (Carmeliet and Jain 2000; Hanahan and Weinberg 2000; Sternlicht and Werb 2001) e invasión (Sternlicht and Werb 2001) puede producir moléculas proinflamatorias que, junto con las citoquinas generadas por las células tumorales (Vicari and Caux 2002), convocan a las células del sistema inmune innato mediante las nuevas señales de

“daño” local (Matzinger 1994; Wrenshall, Stevens et al. 1999). Una vez reclutados en la masa tumoral, las células NKT, NK y/o macrófagos reconocen ciertas moléculas en el tumor que fueron inducidas por la inflamación o por los procesos de transformación celular.



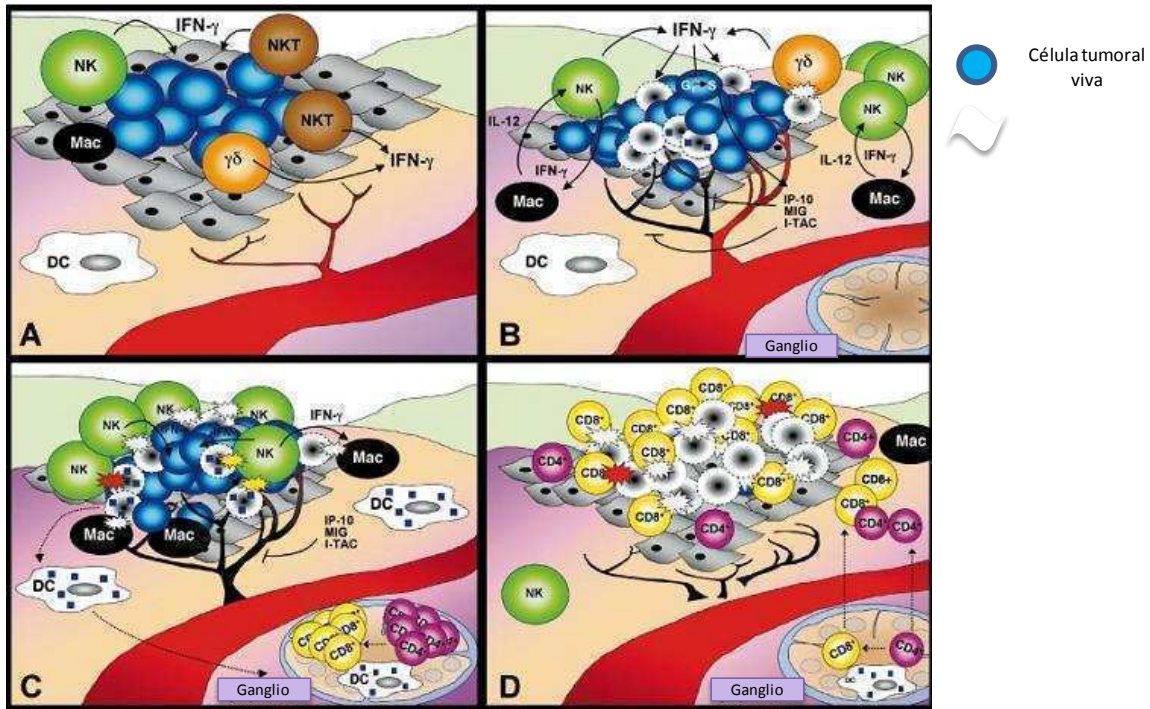
**Figura 1:** Las tres E de la inmunoección del cáncer: eliminación, equilibrio y escape. Las flechas rojas indican que tanto en la fase de eliminación como de equilibrio el sistema inmune puede eliminar el tumor, retornando al epitelio normal. (Dunn, Old et al. 2004)

En el segundo paso (Figura II-B), los efectos de la inmunidad innata sobre el tumor se amplifican. Los productos generados durante la remodelación de la matriz extracelular pueden inducir a que macrófagos que han infiltrado el tumor produzcan bajas cantidades de IL-12 (interleuquina-12) (Hodge-Dufour, Noble et al. 1997) que estimulan a las células NK que han infiltrado el tumor a generen bajas cantidades de IFN- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ ), que a su vez activan a los macrófagos a producir más cantidad de IL-12, lo que aumenta la producción de IFN- $\gamma$  generadas por las células NK. En este sistema de retro-alimentación (*feedback*) positiva (Bancroft, Schreiber et al. 1991), se activan una serie de mecanismos dependientes de IFN- $\gamma$ , tales como, efectos antiproliferativos (Bromberg, Horvath et al. 1996), pro-apoptóticos (Kumar, Commane et al. 1997) y anti-angiogénesis

(Luster and Leder 1993; Coughlin, Salhany et al. 1998; Qin and Blankenstein 2000), que terminan por eliminar parte de la masa tumoral. Como resultado de estos procesos, una fuente de antígenos de células tumorales muertas está disponible y el sistema inmune adaptativo es reclutado dentro del proceso.

En el tercer paso (Figura II-C), los antígenos liberados por el tumor por los efectos producidos por la inmunidad innata generan una respuesta inmune adaptativa específica de tumor. En este paso se reclutan las células dendríticas (CDs) inmaduras (CDi) al sitio del tumor y se activan ya sea por la exposición al entorno de citoquinas creado durante el ataque en curso sobre el tumor de la inmunidad innata o mediante la interacción con células NK que han infiltrado el tumor (Gerosa, Baldani-Guerra et al. 2002). Las CDs pueden adquirir antígenos tumorales, mediante la endocitosis de células muertas del tumor o por la interacción con los complejos de HSP-antígenos tumorales (*Heat shock protein*) (Li, Menoret et al. 2002; Srivastava 2002). Una vez activadas, las CDs migran a los ganglios drenantes (Sallusto, Mackay et al. 2000), donde inducen la activación de linfocitos T CD4 helper 1 naïve (Th1) y CD8 citotóxicas (CTL, de sus siglas en inglés cytotoxic T lymphocyte) específicas del tumor.

En el cuarto y último paso (Figura II-D), tanto las células CD4 como CD8 específicas de tumor se dirigen al sitio tumoral donde participarán de la eliminación del mismo. Las CD8 reconocerán eficientemente al tumor e inducirán la muerte de las células tumorales mediante mecanismos directos e indirectos. Por lo tanto, la fase de eliminación en la inmunoección del cáncer es un proceso permanente que se debe repetir cada vez que se presentan antígenos tumorales distintos. Por esta razón, es particularmente digno de mención que el cáncer es más frecuente en una población de ancianos, donde la función del sistema inmune, y por lo tanto, la inmunovigilancia del cáncer, comienzan a declinar.



**Figura II:** Modelo propuesto para la fase de eliminación de la hipótesis de la inmunoección del cáncer. Los eventos de la figuras son descritos en el texto. CD: células dendríticas, MAC: macrófagos, NK: natural killer, NKT: natural killer tipo linfocito T. (Dunn, Old et al. 2004)

### Equilibrio

En la fase del equilibrio (Figura I-B), el sistema inmune del hospedador y las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en un equilibrio dinámico. Es probablemente la fase más larga y puede durar por años en los seres humanos. De hecho, se ha estimado que para muchos tumores sólidos humanos puede haber un intervalo de 20 años entre la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor (Loeb, Loeb et al. 2003). Se requiere una comprensión completa del mecanismo de la fase de equilibrio en nuevos modelos tumorales para entender mejor los mecanismos intrínsecos que generan nuevos fenotipos tumorales y para identificar los responsables de “esculpir” el sistema inmune.

## **Escape**

En la fase de escape (Figura I), las células tumorales adquieren la capacidad para evadir el reconocimiento del sistema inmune y/o impedir que éste las destruya. La progresión desde el equilibrio hasta el escape podría ocurrir porque una población de células tumorales produce un cambio en respuesta al sistema inmune.

Algunas de éstas alteraciones son probablemente el resultados de mutaciones genéticas en las células tumorales (Dunn, Bruce et al. 2002; Khong and Restifo 2002). Mediante un proceso de selección darwiniana, las células tumorales poco o no inmunogénicas serán seleccionadas porque son “invisibles” para el sistema inmune y por lo tanto adquirirían la capacidad de crecer progresivamente.

La clasificación continua de las tres E de la inmunoedición del cáncer tiene importantes implicaciones para la inmunoterapia del cáncer en los seres humanos. Al obtener una mejor comprensión de los procesos celulares y moleculares que conducen al rechazo inmunológico del tumor en la fase de eliminación, será posible identificar qué fuerzas inmunes necesitan ser aumentadas para facilitar la protección natural contra los tumores. Mediante el estudio de la fase de equilibrio, será posible entender los procesos genéticos que llevan al desarrollo de los tumores con inmunogenicidad reducida e identificar los objetivos moleculares de los procesos de inmunoedición del cáncer con el fin de comprender mejor al tumor y ver como se puede prevenir mediante la estabilización del genoma de las células tumorales. Por último, al dilucidar cómo los tumores escapan a la detección inmunológica a través de la generación de variantes poco o no inmunogénicas generado por el tumor, será posible desarrollar métodos para determinar el grado en que se ha editado un tumor y diseñar estrategias para revertir estos mecanismos de encubrimiento, permitiendo así el ataque inmunológico contra el tumor.

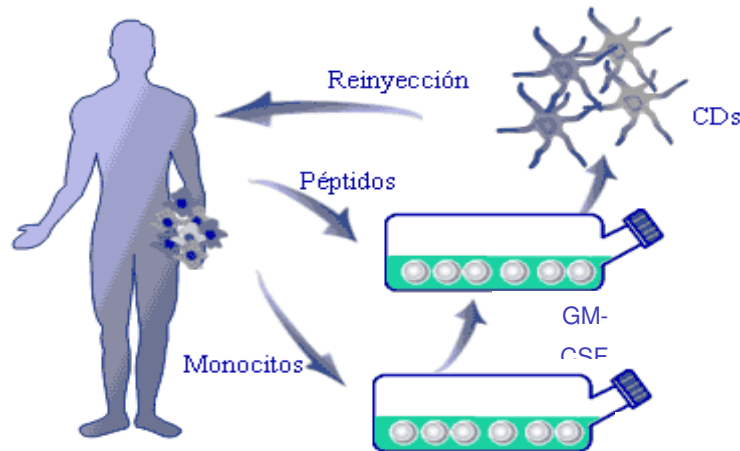
## **6. TERAPIAS MODIFICADORAS DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA:** **INMUNOTERAPIAS**

Como ya hemos mencionado anteriormente los tratamientos convencionales contra el cáncer (como la radioterapia, la cirugía y la quimioterapia) no son eficientes en una multitud de casos, sobre todo en tumores que han invadido otros tejidos y han dado metástasis. Es por ello que, en la actualidad, el cáncer es la segunda causa de muerte (Finn 2004; Lotze and Papamichail 2004). Esto ha motivado a médicos e investigadores a encontrar nuevas terapias contra esta enfermedad, dirigiéndose al perfeccionamiento de los sistemas tradicionales, pero también y cada vez con mayor énfasis, a la introducción de nuevas formas terapéuticas, en especial a la inmunoterapia. Ello hace que nuevos esfuerzos de investigación interdisciplinaria sean necesarios, al objeto de conocer mejor la maquinaria celular responsable de la malignización celular y de los mecanismos inmunológicos responsables de su eventual destrucción.

Las nuevas estrategias de inmunoterapia tienen como objetivo potenciar la respuesta inmune frente al tumor, e incluyen:

- Activación inespecífica del sistema inmune, por ejemplo con BCG (Vita, Siracusano et al. ; Foss 2002).
- Utilización de citoquinas, como es el caso de la IL-2 (Salgaller 2001; Finn 2004).
- Utilización de anticuerpos monoclonales sin modificar o unidos a toxinas, enzimas o radioisótopos que poseen capacidad citolítica de las células tumorales (Salgaller 2001; Finn 2008).
- Vacunas utilizando virus oncogénicos a partir de células tumorales modificadas o alteradas genéticamente (Lotze and Papamichail 2004).
- Terapia génica introduciendo genes capaces de modular la actividad tumoral (supresión de genes mutados) o genes dirigidos a amplificar la producción de citoquinas moléculas co-estimuladoras en las células tumorales (Foss 2002; Lotze and Papamichail 2004).

- Estimulación de células dendríticas (CDs) que han incorporado antígenos del propio tumor y luego son administradas al individuo (Figura III) (Ballestrero, Boy et al. 2008; Melief 2008; Vulink, Radford et al. 2008)



**Figura III:** Células dendríticas (CDs) cargadas con antígenos procedentes del tumor pueden ser utilizadas para tratar enfermos portadores de tumor.

Aunque estos tratamientos pueden realizarse de forma segura, es decir sin efectos secundarios, y pueden ser efectivos en algunos casos particularmente sobre tumores experimentales incipientes, en general hasta hoy no han sido eficaces para tratar tumores establecidos que han superado cierto tamaño crítico. Sin embargo muchos investigadores esperan que el perfeccionamiento de alguna de estas estrategias pueda jugar un rol importante en el futuro tratamiento contra el cáncer.

De todas las estrategias de inmunoterapias modernas, la que permite abrigar mayores esperanzas es la inmunoterapia basada en CDs. Por tal motivo dedicaremos en esta Tesis un espacio que incluya la descripción más detallada del origen y función de estas células.

## **7. CÉLULAS DENDRÍTICAS:**

### **7.1. Breve introducción: origen, clasificación y función**

Las células dendríticas (CDs) fueron descubiertas hace aproximadamente 32 años por Steinman y col (Steinman and Cohn 1973). Pasó más de un siglo desde su descubrimiento hasta que se les adjudicó una función en el sistema inmune; y fueron Steinman y Cohn quienes identificaron en base a su morfología a las CDs presentes en los órganos linfoides y descubrieron que éstas células desempeñaban un rol crucial en la estimulación de los linfocitos T vírgenes y en el desarrollo de una respuesta inmune primaria (Stingl, Katz et al. 1978; Braathen and Thorsby 1980).

Las CDs representan una familia heterogénea de células muy móviles y de forma irregular. Más recientemente, se ha demostrado que estas células poseen gran plasticidad tanto desde el punto de vista ontogénico como funcional, como lo demuestran las diferencias observadas en su origen, en sus características fenotípicas, localización topográfica y en la regulación de la respuesta inmunitaria (Maugh 1975). Estas células pueden originarse de diferentes precursores en medula ósea (mieloides o linfoides) además de que diferentes tipos funcionales de CDs pueden obtenerse de un mismo precursor (CDs regulatorias, tolerogénicas, semi-maduras, etc.) lo que determina que sus diferentes subpoblaciones se encuentren en la sangre, órganos linfoides secundarios (Bailar and Gornik 1997) y en los sitios que son puerta de entrada de patógenos (piel y mucosas) (Banchereau, Briere et al. 2000). Inicialmente se demostró que es una célula presentadora de antígeno con habilidad para activar a los linfocitos T vírgenes (Steinman and Witmer 1978; Inaba, Steinman et al. 1983). Sin embargo, esta noción se amplió, puesto que se demostró que las CDs, dependiendo de su origen, pueden activar o tolerizar a los linfocitos T (Ardavin, Wu et al. 1993). Esta plasticidad funcional ha permitido, entre los inmunólogos y otros investigadores, la generación de dos puntos de vista aparentemente contradictorios en cuanto al papel inmunorregulador de estas células: unos piensan que cada tipo de célula



dendrítica tiene un papel inmunorregulador que le es particular, en tanto que otros sugieren que lo importante es que la presentación del antígeno depende de la activación y maduración de la CDs, independientemente de su origen o subtipo. Cualquiera que sea el caso, es evidente que los nuevos conocimientos sobre el papel de estas células en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa han revolucionado nuestra visión sobre el sistema inmunitario y su fisiología a tal punto que, han puesto en evidencia, las debilidades de teorías tan aceptadas universalmente como la de la selección clonal (Burnet 1959) y apuntalado el surgimiento de otras, como la teoría del peligro (Matzinger 1994), según la cual el sistema inmunitario responde más bien a "señales de alarma o peligro" independientemente si el antígeno es exógeno o endógeno (propio o extraño).

Sin importar su origen y su función, las CDs presentan dos estadios en los cuales difieren sustancialmente en su fenotipo y funcionalidad, CDs inmaduras (CDi) y CDs maduras (CDm) (Figura III). Las células que se encuentran en su estado inmadura, en ausencia de procesos inflamatorios y de respuesta inmune, se encuentran recorriendo y censando los tejidos periféricos, el sistema circulatorio sanguíneo y linfático y los órganos linfoides secundarios (Guermonprez, Valladeau et al. 2002).



Ubicación	Tejidos periféricos	Órganos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	+++	+/-
Capacidad de procesamiento	+++	+/-
Expresión de moléculas coestimuladoras y de presentación	+	+++
Capacidad estimuladora de linfocitos T vírgenes	+/-	+++

**Figura III:** Características generales de las CDs.

Las CDi responderán incrementando su maquinaria de procesamiento frente al reconocimiento directo de PMAPs (patrones moleculares asociados a patógenos) o a través del reconocimiento vía receptores Fc y/o receptores del complemento. También se activaran indirectamente al reconocer señales de alerta en el microambiente, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGE-2, etc.) o moléculas intracelulares (señales de alerta) provenientes de células necróticas o dañadas (HSP, ATP, UTP, ácido úrico) (Gallucci and Matzinger 2001). En respuesta a estas señales, las CDs inician un programa de diferenciación llamado “maduración” a través del cual se convertirán en células presentadoras de antígeno (CPA) profesionales capaces de activar linfocitos T vírgenes. El proceso de maduración se asocia con una serie de eventos:

- Incremento en la expresión de receptores de quimioquinas y consecuente migración de las CDs a los órganos linfáticos.
- Decrecimiento notable de su capacidad endocítica
- Incremento de la expresión en superficie de moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86.
- Incremento en la expresión de complejos péptido-antigénico/MHC clase I y II (complejo mayor de histocompatibilidad clase I y clase II, respectivamente).

## **7.2. Citoquinas: un papel esencial**

Las CDs juegan un papel regulatorio en el sistema inmune, funcionan como nexo entre la inmunidad innata y la respuesta adaptativa. Uno de los mecanismos que es de suma importancia en la actividad inmunoregulatoria de las CDs en dicho nexo, es la producción de citoquinas. La producción de citoquina contribuye a una homeostasis normal, dando como resultado una estimulación eficiente. Diferentes subpoblaciones de CDs exhiben la capacidad de producir distintas citoquinas, que pueden estar vinculados con funciones especializadas en el sistema inmunológico. Las citoquinas mencionadas a continuación (IL-12 y TNF- $\alpha$ ), son algunas de las citoquinas liberadas por las CDs, pero cabe mencionar que existen muchas más, con importantes roles pero que no mencionaremos en esta tesis.

IL-12 es una citoquina esencial para la activación/maduración de las CD4, que promueve la producción de IFN- $\gamma$  de las células T, lo que sugiere que juega un papel importante en la inducción de una respuesta de tipo Th1 (ver más adelante). La habilidad de las CD4 de producir o no IL-12 depende de muchos factores. Un ejemplo de ello es, la expresión de IL-12 en respuesta a la activación CD40 parece ser dependiente del estado de las CD4 frente a una señal microbiana (Mosca, Hobeika et al. 2000; Schulz, Edwards et al. 2000), mientras que la expresión de IL-12 mediante CD4 estimuladas puede ser modulada por otras muchas citoquinas (IL-4, IL-10, IL-13, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , CCL2, TGF- $\beta$  (Koch, Stanzl et al. 1996; Geissmann, Revy et al. 1999; Tada, Asahina et al. 2001; Luft, Luetjens et al. 2002; Heystek, den Drijver et al. 2003; Sauma, Michea et al. 2004). Vale destacar, que la expresión de IL-12 también puede estar influenciada por los métodos de purificación (Elkord, Williams et al. 2005). Bajo ciertas condiciones, la activación de las células *natural killer* (NK) depende de la producción de IL-12 de las CD4. Otras citoquinas importantes de la familia de IL-12, son las IL-23 e IL-27.

TNF- $\alpha$  es una citoquina pro-inflamatoria sumamente poderosa que tiene múltiples efectos en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa (McDevitt, Munson et al. 2002). Su expresión mediante las CD4 parece ser una respuesta relativamente común a los estímulos de maduración / activación. Además cumple una función tanto autócrina como parácrina (Sallusto, Cella et al. 1995; Kadowaki, Antonenko et al. 2000; Asselin-Paturel, Boonstra et al. 2001), ya que también induce la migración de las CD4 desde los tejidos periféricos a los ganglios drenantes (Koide, Inaba et al. 1987; MacPherson, Jenkins et al. 1995; Hanahan and Weinberg 2000; Bauman, Huffnagle et al. 2003).

Existe un montón de evidencia de las que las CD4 producen varias citoquinas, incluyendo IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18, IFN- $\gamma$ , APRIL y BAFF, como muchas otras quemoquinas. La capacidad de producción de estas citoquinas está de acuerdo con el papel clave que juegan las CD4 para regular la respuesta inmune, ya que el rango de citoquinas expresadas puede tener un impacto sobre numerosos aspectos de la inmunidad innata y adaptativa, deseadas y no deseadas, como veremos a continuación.

## 7.3. El rol de las CDs en la respuesta inmune

### 7.3.1. Activación de los linfocitos T

La interacción de las CDs con los linfocitos T vírgenes pueden perfilar la respuesta inmune hacia diferentes fenotipos o incluso inducir tolerancia de los linfocitos T. Esto dependerá de: a) el subtipo de CDs, b) los receptores estimulados, c) el tipo y la dosis del antígeno, d) la vía de inmunización y e) el microambiente circundante a la CPA (Guermónprez, Valladeau et al. 2002). El linfocito T, que se encuentra en contacto cercano con la CDs madura, requiere dos señales muy importantes para activarse eficazmente: señal 1, dada por el reconocimiento del péptido antigénico presentado por las moléculas de MHC I y II, a través del TCR. Involucra, además, el reconocimiento de sitios no polimórficos de las moléculas de MHC I y II por parte de los receptores de CD8 y CD4, respectivamente. La señal 2, por otro lado, es provista por moléculas coestimuladoras expresadas en las CDs (CD80 y CD86), que interactúan con sus ligandos, expresados en el linfocito T (CD28) (Fainboim 2005). Si bien las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-12 no se encuentran mencionadas cuando se habla de las señales necesaria para una eficaz activación de las CDs hacia las células T vírgenes, es sabido que son de suma importancia (Manfred B. Lutz and Steinkasserer 2006), tanto para la correcta maduración/activación de las CDs, como para una correcta proliferación y activación de los linfocitos T, como veremos más adelante.

La presentación antigénica ocurre cuando un fragmento del antígeno (peptídico) asociado con moléculas de clase II del HLA en la membrana de la CD se pone en contacto con el linfocito T (CD4) virgen a través de su receptor para el antígeno (TCR)(Inaba, Metlay et al. 1990; Mayordomo, Zorina et al. 1995). No existe otra célula en el organismo, que cumpla la función de presentación del antígeno de manera más eficaz que la célula dendrítica. Ellas son 100-300 veces más eficientes que cualquier otra célula presentadora de antígeno(Croft, Duncan et al. 1992). Esta capacidad de las CDs mieloides para activar a los linfocitos T, *in vivo*, ha sido directamente demostrada en experimentos de transferencia celular

en ratones. Así, la reinyección en la almohadilla plantar o por vía intravenosa, de CD estimuladas, *in vitro*, con antígenos proteicos, induce respuestas de linfocitos T específicas, del antígeno (Inaba, Metlay et al. 1990; Levin, Constant et al. 1993).

Si durante el proceso de maduración de CDs resulta ser inmunogénica, los clones T se diferenciarán a linfocitos T cooperadores o *helper* (Th) en el caso de una células T CD4 y a linfocitos T citotóxico (CTL) en el caso de una células T CD8. Los CTL desempeñan un papel central en la erradicación o control de infecciones virales y en la respuesta inmune antitumoral. Los linfocitos Th, a su vez no constituyen una población homogénea sino que luego de la activación puede diferenciarse en diversas subpoblaciones efectoras, entre las cuales pueden mencionarse los linfocitos Th1, Th2 y Th17 a las cuales recientemente se ha sumado la población Th9. Estas subpoblaciones difieren en la forma de inducción, los patrones de circulación, el perfil de citoquinas que producen y los mecanismos efectoras que activan (Janeway C 2005). Además, las citoquinas características de cada perfil promueven la diferenciación de la propia subpoblación y en algunos casos pueden inhibir el desarrollo de otras (O'Garra and Arai 2000).

Si la CDs produce IL-12 en ausencia de IL-4 o citoquinas inmunosupresoras, las células T CD4 se diferenciaran hacia un perfil Th1. Los linfocitos Th1 se describen como células productoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 y linfoxina- $\beta$  y son esenciales en la activación de una respuesta inmune mediada por célula fagocíticas, especialmente frente a patógenos intravesiculares. El IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos Th1 estimula la actividad microbicida de las células fagocíticas, lo cual favorece la destrucción intracelular de los microorganismos fagocíticos. El IFN- $\gamma$  también estimula la síntesis de anticuerpos IgG opsonizados y fijadores de complemento, que facilitan la fagocitosis. Asimismo, las células Th1, a través de la interacción CD40-CD40L (ligando), aumentan la capacidad de las CDs de estimular células T CD8 facilitando la respuesta citotóxico (Abbas AK 2004).

Por el contrario, en la diferenciación hacia un perfil Th2 es importante la presencia de IL-4 (producidas por células NKT y en menor grado mastocitos) y en

este caso las CD4 estimulan al linfocito T CD4 en ausencia de IL-12. Esta respuesta emerge luego del desafío con helmintos y alérgenos, que generalmente producen una estimulación crónica de los linfocitos T. Los mecanismos efectores asociados a este perfil linfocitario se hallan principalmente asociados a las reacciones inmunes mediadas por IgE, eosinófilos y mastocitos, a su vez, los linfocitos Th2 colaboran con las células B a los fines de promover la diferenciación a células plasmáticas involucradas en la síntesis de anticuerpos y son importantes en la erradicación de parásitos helmintos y otros patógenos extracelulares. Estas células se encuentran implicadas en el desarrollo de patologías alérgicas (Abbas AK 2004; Janeway C 2005).

Además las CD4 pueden inducir la diferenciación a células T de memoria de una parte de los clones activados. Estas células persistirán por prolongados períodos de tiempo, permitiendo responder rápidamente a una futura exposición al antígeno (Janeway C 2005). En este sentido, en ausencia de colaboración de células T CD4 con CD8, el establecimiento de memoria en la respuesta T CD8 se halla severamente comprometido (Badovinac, Messingham et al. 2005; Trumfheller, Finke et al. 2006).

### **7.3.2. El rol de las CD4 en la tolerancia central y periférica**

Conjuntamente con el papel fundamental que poseen las CD4 en el inicio de la respuesta inmune y la generación de memoria inmunológica, también cumplen un papel crítico en la inducción y mantenimiento de tolerancia, tanto central como periférica. En la tolerancia central las CD4 de la medula del timo, junto a las células del epitelio tímico cumplen un papel central en la selección negativa, presentando antígenos propios a timocitos en desarrollo (Brockner, Riedinger et al. 1997). Como la tolerancia central no es totalmente eficiente, la tolerancia periférica es necesaria a los fines de complementarla. Mecanismos eficaces de tolerancia son importantes especialmente en los focos infecciosos y tejidos inflamados, sitios en los cuales las CD4 captarán y procesarán antígenos propios y extraños para luego ser presentados en órganos linfáticos secundarios. Entre otros, la tolerancia

periférica implica procesos como: a) la anergia clonal, proceso a través del cual la presentación del antígeno en el contexto de moléculas MHC induce una eficiente estimulación del TCR (señal 1), pero en ausencia de una coestimulación suficiente (señal 2) por parte de CDs, este efecto tendrá como resultado la inhibición de la proliferación y de las funciones efectoras, y b) células T regulatorias con actividad supresora, las cuales pueden generarse en el microambiente tímico dando lugar a las células T regulatorias naturales (Treg; CD4-CD25-Foxp3) o en periferia inducidas por CDs tolerogénicas (Szabo, Sullivan et al. 2003; Greenwald, Freeman et al. 2005; Adler and Steinbrink 2007; Steinman and Banchereau 2007).

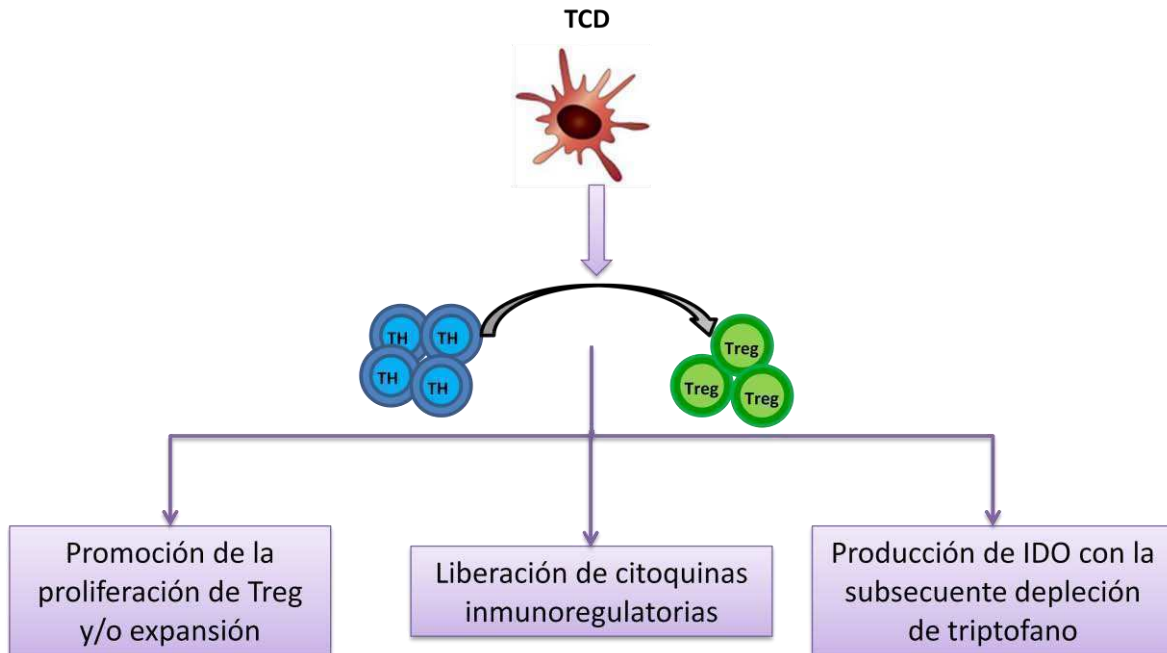
### **7.3.3. La otra cara de la moneda de las CDs**

Hoy sabemos que las CDs inmaduras residentes en los tejidos periférico migran constantemente hacia los ganglio linfáticos en ausencia de señales inflamatorias; tradicionalmente estas células se han caracterizados por presentarse en forma inmadura, semimadura o en estados estacionario. Las CDs semimaduras expresan niveles reducidos de CD40, de CD80 y CD86, una capacidad limitada para producir IL-12 y un aumento en la producción de IL-10 (Lutz and Schuler 2002). La presentación antigénica por parte de estas CDs conduce al silenciamiento del clon activado (anergia clonal) (Rutella, Danese et al. 2006). En este sentido, recientemente se ha demostrado que CDs semimaduras son capaces de inducir la expresión de las moléculas inhibitorias PD-1 (*programmed death-1*) y CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*) a los fines de promover tolerancia periférica en células T CD8 (Probst, McCoy et al. 2005). Por lo tanto, se cree actualmente que el efecto neto de la dosis de Ag, el linaje de las CDs y su estado de maduración, la estimulación de las CDs por derivados de patógenos y/o citoquinas (productos del entorno en los sitios de inflamación), determinará si se desarrollará una respuesta de células T inmunogénica o tolerogénica (Banchereau and Steinman 1998; Steinman, Hawiger et al. 2003).

Otro subtipo de CD son las CD tolerogénicas (TDC), que son células que pueden encontrarse en diferentes estadios de maduración y activación y pueden inhibir la polarización de la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios, a la vez que facilitan la proliferación de Treg naturales o generan células Treg como las Treg inducibles CD4-CD25Foxp3 (iTreg), los linfocitos Th3 productores de TGF- $\beta$  a nivel de mucosas y las células Tr1 (población de células T regulatorias relevantes en autoinmunidad, cáncer e infecciones, (Roncarolo, Gregori et al. 2006)) productoras de IL-10 (Dubsky, Ueno et al. 2005; Rutella, Danese et al. 2006; Morelli and Thomson 2007; Steinman and Banchereau 2007). Esta citoquina produce la disminución de la expresión de las moléculas coestimuladoras y de citoquinas proinflamatorias en CPA, e inhibiendo la producción de IL-2 y TNF- $\alpha$  en células T CD4 (Roncarolo, Gregori et al. 2006). Las CD tolerogénicas inducen tolerancia periférica a través de la maduración de células T regulatorias utilizando diferentes mecanismos: través del factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Ghiringhelli, Puig et al. 2005), a través del contacto célula-célula o por una combinación de ambos mecanismos (Walker, Chodos et al. 2003) (Figura III). A su vez, tanto las Treg como el tumor, liberan IL-10, TGF- $\beta$ , y expresanIDO (indoleamina 2,3-dioxigenada), generando aun mas CD tolerogénicas (Munn, Sharma et al. 2002; Steinman, Hawiger et al. 2003; Lewkowich, Herman et al. 2005).

Asimismo, las CD deficiente en moléculas coestimuladoras o que expresan niveles incrementados del ligando de PD-1 favorecen la diferenciación de iTreg (Benson, Pino-Lagos et al. 2007; Wang, Pino-Lagos et al. 2008). Además, las CD al endocitar cuerpos apoptóticos producen altos niveles de TGF- $\beta$  los cuales favorecen la diferenciación de iTreg (Perruche, Zhang et al. 2008). En este sentido, se ha demostrado que diferentes subpoblaciones de CD en diferentes compartimientos generan iTreg a través de TGF- $\beta$  (Belkaid 2008).





**Figura IV: Mecanismos que subyacen a las funciones tolerogénicas de las TCD.** TDC pueden promover una mala presentación de las células T Ag-específico mediante varios mecanismos, incluyendo la conversión de las células T vírgenes a células Treg, liberando citoquinas inmunosupresoras, y mediante la expresión de IDO con la subsecuente depleción del triptófano, dando como resultado un aumento en la generación de células Treg.

Las células tumorales pueden expresar factores que estimulan a las CD4 a producir TGF- $\beta$ , y de esta forma desviando su eficaz maduración y provocando aún más la proliferación de las Treg. Asimismo, se sabe que las quemoquinas producidas por las células tumorales reclutan Treg dentro del lecho tumoral (Curiel, Coukos et al. 2004).

Las Treg representan el 5-10% de las CD4 en roedores y expresan moléculas de superficie asociadas con la activación/memoria de las células (CD25, CD45Rb<sup>low</sup>, CD62L, CD103, CTLA-4 y GITR), así como también el factor de transcripción Foxp3 (Brunkow, Jeffery et al. 2001). Bajo condiciones normales, las Treg se encuentran en estado de anergia, ya que fallan en proliferar o producir IL-2 en respuesta al estímulo convencional de las células T. Esta anergia puede ser eludida por la adición exógena de altas dosis de IL-2, anti-CD28 o expuestas a CD4 maduras (Takahashi, Kuniyasu et al. 1998; Thornton and Shevach 1998;

Yamazaki, Iyoda et al. 2003; Thornton, Upham et al. 2004). Sin embargo, se vio que las CD4s maduras también pueden inhibir la función inhibitoria de las Treg (Pasare and Medzhitov 2003). En humanos, las células Treg se acumulan en el tumor, ganglio drenante y sangre (Liyanaige, Moore et al. 2002; Curiel, Coukos et al. 2004) y similares observaciones se vieron en modelos de tumores de roedores (Ghiringhelli, Larmonier et al. 2004).

A su vez, las células Treg son capaces de impedir una respuesta producida por células T efectoras por medio de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- $\beta$  o por contacto célula-célula a través de moléculas como CTLA-4 (Sakaguchi 2005). CTLA-4 es el receptor inhibitorio principal en células T activadas y se une fuertemente a B7.1 y B7.2 (CD80 y CD86, respectivamente) en CD4s con mayor afinidad que su receptor de activación, CD28 (Egen, Kuhns et al. 2002). Por lo tanto, las Treg pueden inhibir la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 vía CTLA-4 y/o LFA-1 (*lymphocyte-function associated antigen-1*) (Onishi, Fehervari et al. 2008). De manera similar, vía CTLA-4, las Treg aumentan la actividad de la enzima IDO en CD4s (von Boehmer 2005). La disminución del triptófano, causa en células T CD4 un aumento en la producción de IL-10 y TGF- $\beta$  (von Boehmer 2005; Fallarino, Grohmann et al. 2006) y consecuente supresión de la respuesta inmune.

#### **7.3.4. Posible rol de las CD4s en la respuesta inmune antitumoral y en la inmunoterapia contra el cáncer**

La inmunidad protectora hacia tumores y patógenos, implica la coordinación de la inmunidad innata y adaptativa. Sin embargo, las células tumorales son generalmente pobres en cumplir el papel de células presentadoras de antígeno, y por lo tanto son incapaces de iniciar por sí mismas una respuesta mediada por células T (Steinman and Dhodapkar 2001; Pardoll 2003). Una correcta respuesta hacia estos antígenos dependerá de la adquisición y presentación de estos por las CPAAs derivadas de médula ósea (Heath and Carbone 2001). Las CD4s son las CPAAs por excelencia ya que tienen una alta capacidad para adquirir y procesar

antígenos exógenos derivados de tumor o de células infectadas por virus y generar una respuesta de células T CD4 y CD8 (Banchereau and Steinman 1998). La inmunización activa mediante la transferencia adoptiva de CDs se vio facilitada por el desarrollo de nuevos métodos por generar CDs *in vitro* (Banchereau, Schuler-Thurner et al. 2001).

Existen distintos protocolos para cargar a las CDs con antígenos tumorales. Esto incluye el uso de vectores virales, ARN derivado de tumor, ADN, complejos inmunes, células tumorales apoptóticas, lisado de células tumorales, o proteínas de choque térmico (HSP, *Heat Shock protein*) (Banchereau, Schuler-Thurner et al. 2001; Zhou, Bosch et al. 2002).

En la mayoría de los tumores de seres humanos, los blancos antigénicos expresados por las células tumorales no son del todo conocidos. Aún así, en aquellos casos que los antígenos son conocidos, es posible que los antígenos tumorales de cada paciente difieran o sea diferentes entre pacientes (Dhodapkar, Krasovsky et al. 2002). Estas consideraciones llevaron a utilizar el total de las células tumorales, ya sea líneas celulares o células tumorales autólogas como fuentes de antígenos tumorales. La mayoría de los estudios se han enfocado en usar células muertas, usando también células irradiadas o lisados derivados de estas células para cargar a las CDs (Berard, Blanco et al. 2000; Hoffmann, Meidenbauer et al. 2000; Jenne, Arrighi et al. 2000; Shimizu, Thomas et al. 2001).

Estudios en humanos han demostrado que CDs derivadas de monocitos y progenitores CD34<sup>+</sup> maduras con células tumorales irradiadas, pueden generar una respuesta mediada por células T *in vitro* (Fujii, Fujimoto et al. 1999; Berard, Blanco et al. 2000; Hoffmann, Meidenbauer et al. 2000; Jenne, Arrighi et al. 2000; Spisek, Chevallier et al. 2002). Otros estudios demostraron lo mismo, pero con lisado de células necróticas o células infectadas con virus (Kotera, Shimizu et al. 2001; Larsson, Fonteneau et al. 2002; Wen, Min et al. 2002). También se vio en ratones que la inoculación de CDs cargadas con antígenos tumorales inducían un inmunidad específica de tumor y generaba protección a futuros desafíos tumorales (Kotera, Shimizu et al. 2001; Goldszmid, Idoyaga et al. 2003).

Las CD<sub>s</sub> desempeñan un papel importante en la iniciación, programación y regulación de una respuesta inmune tumor específica (Steinman and Banchereau 2007), pero todavía hay mucho por aprender de su función. Sin embargo, la mayor parte de los esfuerzos se han centrado en la utilización del poder inmunoestimulante de las CD<sub>s</sub> para utilizarlas en inmunoterapia contra el cáncer (Palucka, Ueno et al. 2007; Lesterhuis, Aarntzen et al. 2008).

# **OBJETIVOS**

## **Objetivos**

En 1957, hace mas de 50 años, Prehn y Main (Prehn and Main 1957) demostraron que la extirpación quirúrgica de un tumor murino inducido químicamente dejaba a los ratones inmunes contra implantes (de otro modo letales) con células vivas de ese tumor. En 1960 este hallazgo fue confirmado por Klein y colaboradores (Klein, Sjogren et al. 1960) quienes mostraron que un sistema de vacunación igualmente eficaz contra tumores inducidos químicamente, era el pretratamiento con células tumorales irradiadas. Desde entonces, estos experimentos *in vivo* y también numerosos ensayos *in vitro* han sido reproducidos por muchos investigadores que demostraron, mas allá de toda duda razonable, que algunos tumores de animales y seres humanos, expresan antígenos que pueden producir una respuesta T dependiente contra el tumor. Sobre esta base, surgió la idea de que el cáncer tal vez pudiera ser eliminado por terapias inmunológicas, que tendrían la virtud de ser específicas contra el tumor sin tener los indeseables efectos tóxicos colaterales de la radio y la quimioterapia. Sin embargo, una enorme proporción de ensayos clínicos realizados en los últimos 40 años, han dado resultados desalentadores.

El fracaso de los tratamientos inmunológicos contra el cáncer se ha atribuido a diversas causas. En primer lugar, se ha invocado la falta de inmunogenicidad o la poca inmunogenicidad de los tumores tratados, sobre la base de que tumores espontáneos de ratón, de rata, y presumiblemente humanos, exhiben por lo común una inmunogenicidad mucho menor que la de tumores experimentales inducidos por dosis masivas de carcinógenos químicos y virales (Hewitt, Blake et al. 1976; Middle and Embleton 1981). Otra posibilidad es que los tumores, aun cuando pueden ser inmunogénicos al iniciar su crecimiento, pueden sufrir mutaciones a medida que crecen, dando como resultado la pérdida o la disminución de la expresión de sus antígenos, evadiendo de este modo el sistema inmunológico (Janeway C 2005).

Implícita en estas causas, invocadas para explicar la refractariedad de los tumores establecidos a los tratamientos inmunológicos, subyace la idea de que la eficacia de estos tratamientos dependería básicamente de la inmunogenicidad del tumor,

independientemente del estado del organismo donde éste se desarrolla. Por tal motivo la gran mayoría de los protocolos de inmunoterapia antitumoral han procurado y procuran mejorar la forma de presentar los antígenos tumorales al sistema inmunológico de manera tal de estimular más eficazmente la respuesta inmune destinada a rechazar el tumor, antes de que éste pudiera modular su expresión antigénica.

Pero, ¿son necesariamente válidas estas consideraciones? Si un tumor es muy inmunogénico, y persiste como tal durante todo su crecimiento, ¿va a ser relativamente sencillo eliminarlo con terapias inmunológicas? , ¿O por alguna razón un organismo portador de tumor se hace refractario a las terapias inmunológicas independientemente de la inmunogenicidad del tumor?

### **Objetivo General:**

El objetivo general de los experimentos realizados en esta Tesis es el de responder a estas preguntas, para lo cual hemos utilizado un fibrosarcoma de ratón de la cepa BALB/c, inducido por el carcinógeno químico metilcolantreno al que hemos denominado MCC, similar a los usados por Prehn y Main en sus experimentos pioneros de 1957.

### **Objetivos Específicos:**

- a) Caracterizar el tumor MCC desde el punto de vista de su dinámica de crecimientos y de su inmunogenicidad. Para esto último se utilizarán diversas técnicas de vacunación preventivas. También se emplearán estas mismas técnicas no ya en forma preventiva, sino de manera terapéutica, con el objetivo de determinar sus efectos sobre tumores establecidos, entendiendo como establecido, siguiendo a Schreiber y col. (CITA), el tumor que tiene al menos 400-500 mm<sup>3</sup> y 14 días de evolución.
- b) Caracterizar durante el crecimiento del tumor MCC las modificaciones producidas en las poblaciones celulares de bazo, sangre y medula ósea y las alteraciones en la concentración sérica de diversas citoquinas.

c) También se evaluarán los efectos producidos por el tumor MCC sobre la diferenciación de las células dendríticas a partir de precursores de la médula ósea, ya sea usando medios condicionados de tumor o suero de portadores de tumor.

d) Si las terapias inmunológicas que servían como vacunas preventivas no fueran útiles como vacunas terapéuticas para tratar tumores establecidos, entonces, se estudiará la naturaleza de la refractariedad del organismo portador de tumor frente a esas terapias.

**Sobre la base de este conocimiento se intentará eliminar o atenuar la acción de los agentes causales de esa refractariedad para, después de esto, aplicar terapias inmunológicas que estimulen el sistema inmune del hospedador para dirigirlo contra el tumor.**



# **MATERIALES Y METODOS**

## **Materiales y Métodos**

### **Animales**

Se utilizaron ratones BALB/c de ambos sexos, entre 2 y 4 meses de edad. Los ratones fueron provistos por nuestro bioterio de la División de Medicina Experimental de la Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires y fueron mantenidos con pellets Cooperation (San Nicolás, Bs. As.) y agua ad libitum. Los animales fueron equiparados por sexo y edad en cada experimento y su cuidado se realizó de acuerdo a las normas éticas del National Institute of Health (NIH Guide and Use OF Laboratory Animals) seguidas por la Academia Nacional de Medicina, lugar donde se realizó este trabajo.

### **Tumor**

**MCC:** Fibrosarcoma, inducido en un ratón macho de la cepa BALB/c de 5 meses de edad, 3 meses después de la implantación subcutánea de un pellet de 3-metilcolantreno. Es un tumor de crecimiento lento que se conserva en nitrógeno líquido y se mantiene por pasajes singenéticos subcutáneos. En este trabajo se usó entre los pasajes 20 y 30. Más detalles de este tumor han sido reportados previamente (Franco, Bustuoabad et al. 1996; Franco, Bustuoabad et al. 2000).

### **Medio de cultivo**

Para los cultivos celulares se utilizó medio RPMI-1640 (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cuando fue necesario el medio fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA) (inactivado por calor, 56°C por 30 minutos), 2mM L-Glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de estreptomina y suplementado con  $5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol (medio completo).

### **Cálculo del volumen tumoral.**

Se calculó de acuerdo a la fórmula de Attia y Weiss (Attia and Weiss 1966) utilizando un calibre para hacer las mediciones.  $Volumen\ tumoral = a \times b^2 \times 0,4$ , donde  $a$  y  $b$  son los diámetros mayor y menor respectivamente. Dicha fórmula permite calcular el equivalente a la masa tumoral sin el sacrificio de los animales.

### **Dosis Tumoral 50**

La dosis tumoral 50 (DT<sub>50</sub>) es definida como el número de células tumorales capaz de crecer en el 50 % de los ratones. Se la calcula utilizando el método de Reed y Muench. Cada tumor tiene una DT<sub>50</sub> característica.

### **Análisis Histológico**

Se utilizaron cortes histológicos de piel incluyendo el tumor a analizar, fijados con 10% de formaldehído en PBS e incluidos en parafina Leica histowax, mezclando con polímeros aditivos. Se obtuvieron secciones semi-seriadas (3-5  $\mu\text{m}$ ) que fueron teñidas con hematoxilina y eosina (H&E).

### **Preparación de Extracto Acelular de Tumor**

Se realizó la extracción del tumor MCC, agregando por cada gramo de tumor 7-10 ml de PBS estéril. Luego los fragmentos fueron disgregados pasándolos a través de Mesh (malla metálica). Alícuotas del filtrado fueron tomadas para contar el número de células y verificar la viabilidad celular, coloreándolas con Trypan Blue. Las células luego fueron lisadas mediante 4 ciclos de congelamiento (inmersión en nitrógeno líquido por 60 segundos) y descongelamiento (inmersión en agua a 40 °C por 5 minutos). Posteriormente se realizaron dos centrifugaciones, la primera a 1000 rpm durante 10 minutos y la segunda a 2500 rpm durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron

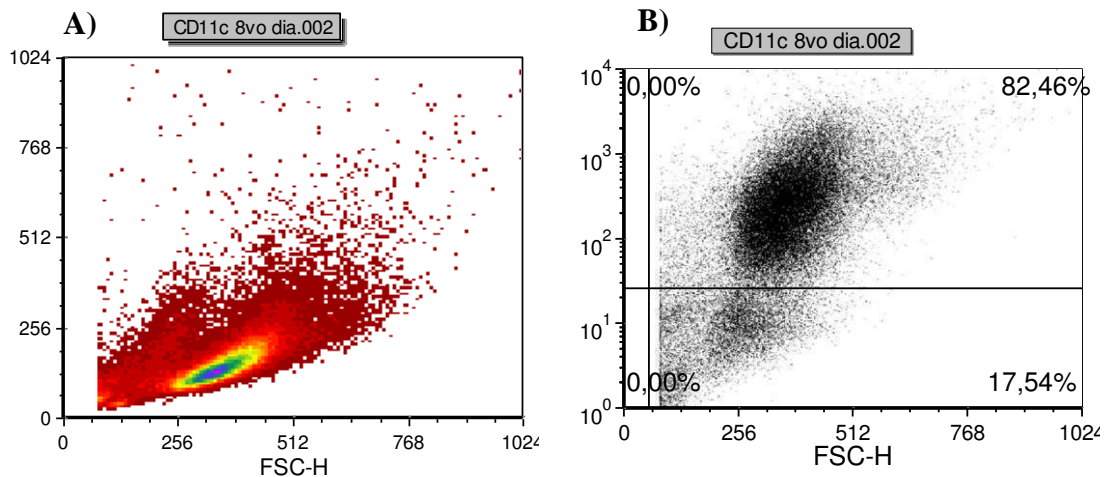
sonicados durante 40 minutos, luego pasados por filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  y posteriormente ajustados para contener 7,5  $\mu\text{g/ml}$  de proteínas. La determinación del contenido proteico se hizo por el método de Bradford (Bradford 1976). Por último los extractos, se fraccionaron en alícuotas de 1 ml para ser conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Nestle, Alijagic et al. 1998).

### **Obtención de medio condicionado con GM-CSF murino**

Se empleo la línea celular J558 descrita por Zal y col. (1994), que proviene de células del mieloma X63-Ag8 transfectadas con el vector de expresión BCMGNeo (Karasuyama and Melchers 1988) y que contiene el ADNc que codifica para el factor estimulador de colonias de granulocito-macrófago (GM-CSF) murino. Las células se cultivaron en IMDM suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomina 100  $\mu\text{g/ml}$ , L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 59  $\mu\text{M}$  y 10% SFB (IMDM-10). Periódicamente se realizo una selección positiva del stock de células J558 con G418 (sigma), ya que el vector transfectado incluye un casete de resistencia a dicho compuesto. El cultivo de selección se realizo en IMDM-10 conteniendo 1mg/ml de G418. El stock de J558 se preservó alicuotando en ampollas en  $\text{N}_2$  líquido sin G418 en una mezcla de 1/10 partes de dimetilsulfóxido (DMSO) en SFB. Para la preparación periódica de medio condicionado, se descongelados ampollas de stock, y se cultivaron en suspensión en IMDM-10 en presencia del factor de selección en botellas de cultivo de 25  $\text{cm}^2$  (Corning). Luego de 72 hs de cultivo, las células se repicaron en botellas de 75  $\text{cm}^2$  en una concentración de  $2 \times 10^5$  células/ml de medio sin G418 y 72 hs más tarde (fase estacionaria) se recolecto el sn de cultivo. El medio condicionado así obtenido fue fraccionado y conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

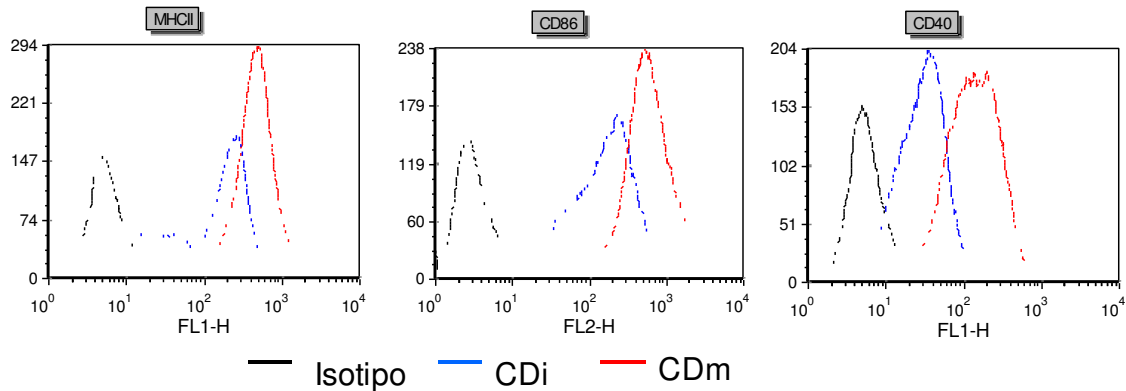
## Obtención de Células Dendríticas

Se obtuvieron las células dendríticas (McDevitt, Munson et al.) a partir de medula ósea (MO) procesándolas de acuerdo a la técnica descrita por Inaba y col (1992). Las células de medula ósea se extrajeron del fémur y de la tibia de ratones BALB/c de 4-6 semanas de edad y se resuspendieron en medio RPMI solo. Se centrifugaron durante 10 minutos a 1500 rpm y el pellet se resuspendió en medio completo ( $1 \times 10^6$ /ml) adicionándole 10-15% de medio condicionado de la línea celular J588, productora de factor estimulante del crecimiento-granulocito-macrófago (GM-CSF) (Inaba, Inaba et al. 1992). Al tercer y sexto día se levantaron las células con tripsina-EDTA (0,25%), se centrifugaron 10 minutos a 1200 rpm y el pellet se volvió a resuspender en medio completo conteniendo GM-CSF. Al cabo de 8 días de cultivo, se obtuvo una población con más del 80% de CD (CD11c<sup>+</sup>) como se puede observar en la **Figura V**.



**Figura V: Obtención de CD.** A) Dot Plot de la población celular obtenida luego de 8 días de cultivo en presencia de GM-CSF. B) Porcentaje de expresión de CD11c de la población total.

Para comprobar la funcionalidad de las CD obtenidas se incubaron  $1 \times 10^6$  células/ml durante 24 horas con  $5 \mu\text{g/ml}$  de LPS (un conocido inductor de la maduración de las CD). Como se observa en la **Figura VI**, la estimulación de las CD con LPS *E. Coli* 0111:B4 (Sigma- Aldrich) produce un aumento en la expresión de CD86, CD40 y MHC II (marcadores de maduración) respecto de las CD sin estimular (CDi).



**Figura VI:** Las CD estimuladas con LPS (CDm) o sin estimular (CDi) se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos según se describe en Materiales y Métodos (ver más adelante).

### **Maduración de células dendríticas con extracto acelular de tumor MCC**

La maduración de las CD ( $1 \times 10^6$ /ml) se llevó a cabo incubándolas durante 24h con extracto acelular del tumor MCC en relación 4:1 (volumen de células dendríticas: volumen de extracto acelular de MCC) en medio completo en tubos de polipropileno.

### **Medio condicionado de tumor MCC**

Para obtener medio condicionado de tumor primero se extrajo quirúrgicamente tumor MCC y luego fue disgregado en Mesh. Las células obtenidas fueron resuspendidas en medio completo y centrifugadas por 10 min a 1200 rpm a  $4^\circ\text{C}$ . El pellet de células fue resuspendido nuevamente en medio completo y

cuantificado su concentración. En placas de petri (Corning) se sembraron a razón de  $5 \times 10^5$  células/ml. A las primeras 24 hs y luego cada 48 hs la mitad el medio fue reemplazado por medio completo fresco. En cada recambio, el medio extraído fue centrifugado a 15 min a 1500 rpm a 4°C y el sn fue alicuotado y guardado a -80°C para su posterior uso. El pellet de células fue descartado.

### **Obtención de linfocitos de ganglio linfático**

Para los ensayos que requirieron poblaciones celulares de ganglio linfático, se extrajeron por cirugía ganglios inguinales, axilares y laterales, eliminando cuidadosamente el tejido graso circundante. Los ganglios fueron disgregados a 4°C en Mesh en condiciones de esterilidad con medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 5% SFB (medio RPMI-5%). Los restos de tejido capsular fueron removidos. Posteriormente la suspensión celular fue centrifugada 10 min a 1200 rpm en frío. El sedimento celular fue resuspendido en medio RPMI-5%. La viabilidad y la concentración celular fueron evaluadas por recuento en cámara de Neubauer y utilizando como colorante de exclusión azul tripán-blue en una dilución 1/20.

### **Citometría de flujo**

Para la evaluación de los diferentes fenotipos celulares en los diferentes ensayos, las células obtenidas se lavaron dos veces en solución FACS (PBS suplementado con BSA 1% y  $\text{NaN}_3$  0,1%) a 4°C y fueron resuspendidas en FACS suplementados con 2% SFB. Luego se incubaron las suspensiones celulares con sus respectivos ac por 30 min a 4°C. Como control de marcación inespecífica, las células fueron incubadas simultáneamente con los correspondientes isotipos (dependiendo de cada anticuerpo y fabricante). Pasado el tiempo de incubación las células fueron lavadas con FACS por 10 min a 1200 rpm a 4°C para quitar el ac sobrante. Luego las células fueron fijadas a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) al 0,5% en PBS y

conservadas en oscuridad a 4°C hasta ser adquiridas en el citómetro de flujo. Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa FCS Express (De novo software, Los Angeles, CA).

Los ac utilizados (ver Tabla A) fueron ac monoclonales (mAb) conjugados con fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) dependiendo cada caso (BD Pharmingen, SanDiego, CA).

**Tabla A: Anticuerpos monoclonales utilizados para el análisis de citometría de flujo.**

Anticuerpos	
CD11c	CD45/B220
MHCII (IAb)	CD19
CD80	CD11b
CD86	GR1
CD40	CD4
F4/80	CD8
	CD25

### **Análisis morfológico de la activación de los polimorfonucleares (PMN):**

El procedimiento de citometria de flujo se basa principalmente en que los PMN se pueden estimular de forma artificial, utilizando un compuesto no fluorescente, el cual debe ingresar al interior del fagocito, para ser transformado en fluorescente por parte de diversas especies reactivas derivadas del oxígeno (ERDO). La fluorescencia así emitida, es detectada por el citómetro de flujo. El fluorocromo mas utilizado para medir H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogeno) intracelular es 123-Dihidrorodamina (123-DHR). Esta molécula es directamente oxidada a 123 Rodamina la cual es excitable a 488nm y emite a 515nm. El ingreso a la célula de 123-DHR es como un cromógeno permeable que es convertido a 123-Rodamina y subsecuentemente localizado en las



mitocondrias. La conversión de molécula no fluorescente a fluorescente depende completamente de los productos de oxidación y no requiere catálisis enzimática (Robinson 1998).

Para ello de cada ratón experimental se obtuvieron los PMN de periferia. Mediante la separación por gradiente de densidad Ficoll-Hypaque (Coligan J 1994) PMN purificados ( $2,5 \times 10^5$  células) se incubaron con 123-DHR 1mM (Sigma) a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Luego las células fueron analizadas por citometría de flujo.

### **Obtención de suero de ratón**

Ratones normales o portadores de tumor fueron sangrados por el plexo retro-orbital. La sangre fue guardada a 37°C por 1 hs para su coagulación. El suero fue obtenido luego de la centrifugación de la sangre y guardada a -20°C hasta su uso. Para los ensayos de timidina tritiada, los sueros fueron descomplementados a 56°C por 30 minutos.

### **Preparación de células tumorales irradiadas**

Células tumorales en suspensión ( $1 \times 10^6$  células/ml) fueron irradiadas con 90 Gy en una cámara de plástico para irradiación; rayos X fueron generados en un aparato de radioterapia Philips 250/15 a 220 kV, 14 mA, y con un filtro de 1 mm A1. La dosis de radiación fue de  $3.15 \text{ Gy min}^{-1}$  a una distancia de 29 cm.

## **Técnicas de inmunización: Activas**

### **A. Implantación y extirpación del tumor**

Los tumores fueron extraídos quirúrgicamente de los ratones cuando el volumen alcanzado fue de 400-600 mm<sup>3</sup>. Dos semanas más tarde, los ratones se desafiaron en el franco opuesto con células tumorales vivas.

### **B. Células tumorales irradiadas**

Los animales fueron pre-tratados con dosis subcutáneas (s.c.) de  $2-4 \times 10^6$  células tumorales irradiadas, 7 y 14 días antes del desafío con el tumor.

### **C. Células tumorales inactivadas por calor**

Se obtuvieron trozos de tumor de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> para luego calentarlos a 80-90°C por 30 segundos. Los animales luego fueron pretratados subcutáneamente con dichos fragmentos 7 y 14 días antes del desafío con el tumor.

### **D. Células dendríticas pulsadas con lisado de tumor o con células tumorales irradiadas**

Luego de obtener CD maduras con el extracto acelular de MCC o con células irradiadas, las células son centrifugadas a 300g por 10 minutos. El pellet es resuspendido en medio RPMI-1640. Posteriormente los ratones normales (sin tumor) fueron inoculados con dos dosis de  $3 \times 10^5$  DC en la almohadilla plantal (intra foot pad, i.f.p), una por semana, dos semanas. A los 7 días post inoculación de las células, fueron inoculados con células tumorales vivas.

### **E. Dosis sub-letales de tumor**

Los ratones que luego de una primera dosis baja de células tumorales ( $\leq 5 \times 10^4$  células vivas de MCC) no presentaron crecimiento tumoral, fueron re-inoculados con células vivas del mismo tumor.

## Técnicas de inmunización: Pasiva

### **A. Ensayo de transferencia adoptiva.**

Ratones normales fueron inoculados vía intra-peritoneal (i.p.) con  $10^8$  células de esplenocitos de ratones normales, inmunizados y portadores de tumor. Para el tratamiento de vacunación, la transferencia adoptiva fue realizada 2 horas antes de la inoculación s.c. del tumor. El índice de sobrevivencia (IS) fue calculado como el cociente de los días de sobrevivencia del animal con el múltiplo del número de ratones muertos y el número de ratones totales inoculados. El IS mide porcentaje de sobrevivencia y de mortalidad

## Tratamiento con anti-inflamatorios

Se inocularon 20  $\mu\text{g}$ /ratón (0.75 mg/kg de peso de ratón) de **Dexametasona** (DX) fosfato sódico (Decadron Shock, SIDUS) por vía i.p.

**Indometacina** (Sigma) fue diluido en 0.015 M de NaCl para obtener una dosis de 0.5 mg/kg de peso de ratón (10  $\mu\text{g}$ /ratón) y los animales recibieron dos pequeñas dosis por vía i.p.

**TNFR** (proteína recombinante compuesta por el receptor dimérico soluble humano p80 del factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ) ligado a la región humana Fc de IgG (TNFR:Fc, etanercept) fue cedido por John Wyeth (Buenos Aires, Argentina). Cada ratón recibió dos dosis i.v. de 100  $\mu\text{g}$  de TNFR:Fc en 0.1ml de solución salina, descrito previamente (Mohler, Torrance et al. 1993; Bustuoabad, Ruggiero et al. 2005).

Para poder neutralizar la interacción de DX con el receptor de glucocorticoide (GC), se utilizó **RU-486** (Sigma), el cual es un análogo de GC. RU-486 fue inoculado en una sola dosis de 3mg/ml en 1,2 propanediol vía i.p. 5 horas antes de la inoculación de DX.

### **Ensayo de inmunidad concomitante**

Animales recibieron implante tumoral s.c. en el flanco derecho seguido, en diferentes intervalos, por un segundo implante s.c. del mismo tumor en el flanco izquierdo. Los controles son animales que solo reciben el implante del lado izquierdo. El título de la inmunidad concomitante fue definido como el cociente entre la TD<sub>50</sub> del segundo desafío en animales portadores de tumor y la TD<sub>50</sub> de animales controles y expresado en función del volumen del tumor primario al día del desafío con el tumor secundario (Franco, Bustuoabad et al. 1996).

Estrictamente, la inhibición de un segundo desafío del tumor en un anfitrión portador de tumor no es en sí mismo un índice de una inmunorespuesta concomitante porque los ratones que llevan tumores grandes (en el caso del MCC cuando el tamaño de tumor es  $> 2500 \text{ mm}^3$ ) a la hora del segundo desafío del tumor son capaces de inhibirlo por un mecanismo no-inmunológico enteramente diverso, incluso, junto con el mecanismo inmunológico, concepto más amplio de la resistencia concomitante antitumoral (Ruggiero, Bustuoabad et al. 1990; Prehn 1993; Franco, Bustuoabad et al. 1996; Ruggiero and Bustuoabad 2006). Sin embargo, en este trabajo, probamos la inhibición de un segundo desafío del tumor inoculado en los ratones que llevaban tumores primarios de MCC  $< 2500 \text{ mm}^3$  y en consecuencia, el efecto inhibitorio (cuando era presente) se podrían asociar solamente dicho fenómeno inmunológico, es decir, la inmunidad concomitante.

### **Ensayo de parabiosis**

Ratones parabióticos fueron preparados juntando pares de ratones con unión parabiótica descrita previamente (50); la circulación cruzada fue establecida a los 7 días, de acuerdo con experimentos anteriores (50). Los animales fueron equiparados por sexo y edad en cada experimento y su cuidado se realizó de acuerdo a las normas éticas del National Institute of Health (NIH) y las propias de nuestra institución

### **Test Winn**

La actividad antitumoral de células esplénicas de ratones normales, inmunizados y portadores de tumor fue realizado mediante el test Winn *in vivo* (Winn 1961), el cual consiste en la mezcla de dichos esplenocitos con células tumorales en una relación 100:1. Las células tumorales luego fueron inoculadas s.c y se midió el crecimiento tumoral.

### **Ensayo de citotoxicidad mediado por células**

Células marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  en 0.1 ml de medio completo fueron inoculadas en diferentes suspensiones de células esplénicas en una proporción 100:1 por 4 hs a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego, se centrifugaron las células y se midió la radiactividad tanto en el pellet como en el sobrenadante en un contador Gamma (Beckman). El porcentaje de lisis específica se calculó como: ***[cpm sobrenadante/ (cpm pellet + cpm sobrenadante)] x100***. Mayores detalles de esta técnica fueron reportados previamente (Franco, Bustuoabad et al. 1996). El ensayo se realizó por cuadruplicado.

### **Determinación de marcadores de inflamación sistémica**

Se obtuvo sangre por punción del plexo retroorbital. Se separó suero por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Dicho procedimiento se realizó tanto para medir la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ , como también de proteína C reactiva (CRP) y proteína A amiloide (SAA). Una vez obtenidos las soluciones se cuantificaron mediante la técnica ELISA (ver a continuación).

### **ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de captura**

La técnica ELISA se utilizó para detectar las citoquinas IL-12p70, TNF- $\alpha$ , IL-10 (Ready-Set-Go, eBioscience), IL-1 $\beta$  e IL-6 (RD System, Minneapolis, MN,

USA), y las proteínas de fase aguda SAA y CRP (Immunology Consultants Laboratory, Inc.; Newberg, OR; USA), dependiendo del ensayo y en todos los casos se utilizó el protocolo detallados por el fabricante.

### **Tratamiento con ácido all-trans retinoico (ATRA)**

Para el protocolo con ATRA se utilizó de Roche Farma, Vesanoïd®. El Vesanoïd se presenta en forma de cápsulas blandas de dos colores: amarillo anaranjado / marrón rojizo. Cada envase en frascos contiene 100 cápsulas. El Vesanoïd® pertenece a un grupo de medicamentos conocidos como retinoides, estructuralmente relacionados con la vitamina A.

Está indicado para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (un tipo de enfermedad de la sangre). La tretinoína (compuesto principal) reduce el crecimiento de cierto tipo de células sanguíneas enfermas. Se comercializa en envases blister y frascos, con 100 cápsulas.

Para poder administrar el contenido a los animales, cada capsula fue dividida en dos mediante el uso de un bisturí. La solución dentro de cada capsula fue extraída mediante lavados con vaselina (2 ml por cada capsula). Durante todo el proceso se trabajó en oscuridad. Una vez obtenida la mezcla, la solución fue suministrada vía oral a cada animal experimental mediante el uso de jeringas especiales. A cada animal se le suministró diariamente 1mg durante 15 días, comenzando con la primer dosis de DX y terminando 3 días después de la segunda dosis de CDs.

### **Western blotting**

Las células fueron lavadas y lisadas con un buffer compuesto por 20 mM Tris (pH 8), 150 mM de NaCl, el 1% Nonidet P-40, EDTA de 200 µM, pirofosfato de sodio, y 100 mM de fluoruro del sodio con inhibidores de proteasa. El lisado correspondiente a la muestra enriquecida con  $4 \times 10^6$  células T fue separada en un gel del 10% SDS-PAGE en 200 V por 45 Min. El material luego es transferido a una membrana de PVDF. Primero se realizó el bloqueo con 5%

BSA, y luego de sucesivos lavados, la membrana fue incubada con un anticuerpo primario anti-p56<sup>lck</sup> (biotecnología de Santa Cruz) a temperatura ambiente por 2 hs y luego con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. p56<sup>lck</sup> es una kinasa de la tirosina de la proteína de la familia del *src* que se expresa en células de T y tiene un papel significativo en la transducción de la señal a través del receptor de la célula de T (Salvadori, Martinelli et al. 2000).

### **Análisis estadístico:**

Los valores se expresan como la media  $\pm$  error estándar (ES). Se utilizaron los test T de student, Chi cuadrado ( $X^2$ ) y ANOVA de una sola vía, post test de Bonferroni, considerándose significativas las diferencias con  $p \leq 0.05$ .

# **RESULTADOS**



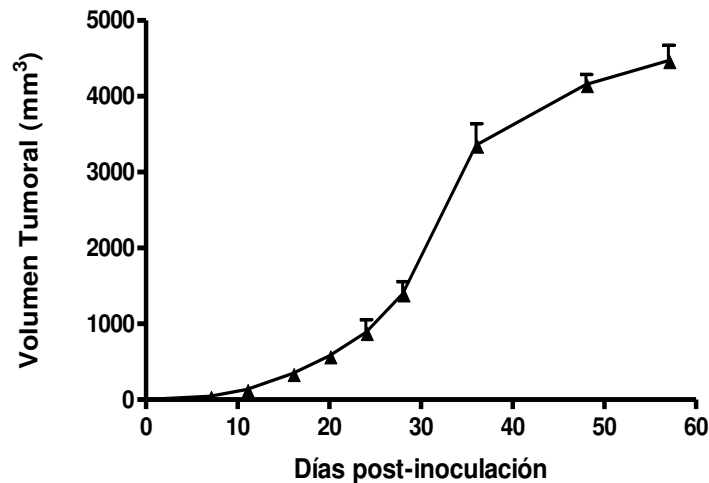
## Resultados

### CAPITULO 1

#### 1. CARACTERISTICAS GENERALES DEL TUMOR MCC.

##### 1.1. *Cinética de crecimiento del tumor MCC.*

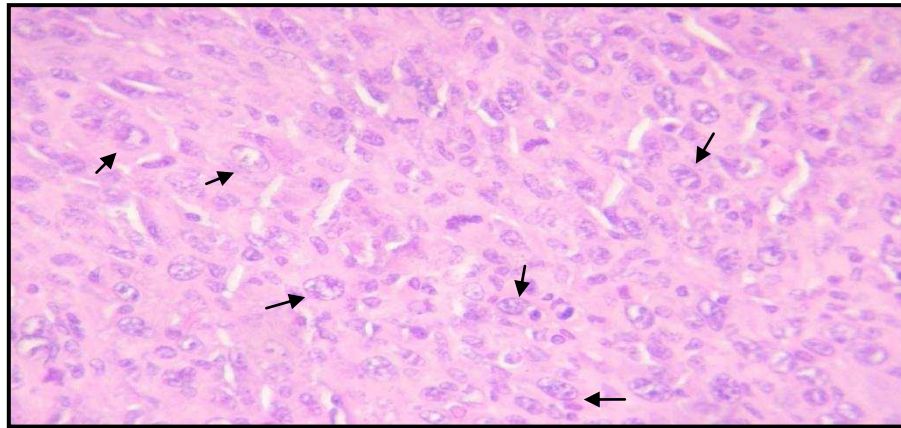
Doce ratones recibieron  $5 \times 10^5$  de células tumorales MCC por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho. Como se observa en la **Figura 1** el crecimiento del tumor MCC fue relativamente lento al comienzo hasta el día 25 aproximadamente, después de lo cual exhibió una brusca aceleración hasta el día 40. A partir del día 40 el tumor continúa su crecimiento de forma más lenta hasta producir la muerte del animal. Este tipo de curva – llamada Gompertziana- es común a una gran variedad de tumores. La sobrevivencia de los ratones portadores del tumor MCC fue de  $61 \pm 6$  días (media  $\pm$  error estándar, ES)



**Figura 1:** *Cinética de crecimiento del tumor MCC en función del tiempo (días) luego de la inoculación de  $5 \times 10^5$  de células tumorales MCC por vía subcutánea (s.c.) en el flanco derecho.*

### 1.2. Histología del tumor MCC.

La **Figura 2** muestra el análisis histopatológico del fibrosarcoma MCC donde se distinguen células fusiformes neoplásicas con marcada actividad mitótica.



**Figura 2:** *Fibrosarcoma murino MCC. Tumor viable fusicelular con elevado número de mitosis (flechas) (H&E, 400x).*

### 1.3. Características de la inmunogenicidad del tumor MCC

Para evaluar la inmunogenicidad del tumor MCC se realizaron diferentes estrategias activas y pasivas de inmunización: implantación y extirpación del tumor, pre-tratamiento con dosis subletales de células tumorales, pre-tratamiento con células irradiadas, pre-tratamiento con células muertas por calor, pre-tratamiento con células dendríticas estimuladas con lisado tumoral o con células tumorales irradiadas, y transferencia pasiva de linfocitos inmunes. El propósito de estas técnicas es impedir el crecimiento de un futuro implante de células tumorales vivas de MCC. Medimos la DT50 ( $DT_{50}$ ) del tumor (definida como el número de células tumorales inoculadas s.c. capaces de crecer en el 50% de los ratones) tanto en ratones inmunizados como en ratones controles. A continuación en la **Tabla 1** se muestran los resultados de los distintos ensayos de inmunización, ya sean activos como pasivos.

***Tabla 1: Inmunogenicidad del fibrosarcoma murino MCC expresado como aumento de la DT<sub>50</sub> en ratones pre-tratados con diferentes procedimientos de inmunización respecto de la DT<sub>50</sub> observada en ratones controles.***

Ensayos de Inmunización	DT <sub>50</sub> (n) <sup>a</sup>	DT <sub>50</sub> tratados/control <sup>b</sup>
<b>Activos: Estrategias de Vacunación</b>		
-Implantación y operación	> 5 × 10 <sup>6</sup> (4) <sup>**</sup>	>100
-Dosis sub letales	> 5 × 10 <sup>6</sup> (4) <sup>**</sup>	>100
-Células irradiadas con rayos-X	> 5 × 10 <sup>6</sup> (4) <sup>**</sup>	>100
-Células inactivadas por calor	8 × 10 <sup>5</sup> (2) <sup>*</sup>	16
-CD pulsadas con lisado tumoral	> 5 × 10 <sup>6</sup> (4) <sup>**</sup>	>100
-CD pulsadas con células irradiadas con rayos-X	> 5 × 10 <sup>6</sup> (2) <sup>**</sup>	>100
<b>Pasivos:</b>		
-Transferencia de esplenocitos inmunes	2.8 × 10 <sup>5</sup> (2) <sup>*</sup>	5.6
<b>Control</b>	5 × 10 <sup>4</sup> (6)	1

**a:** DT<sub>50</sub>: Número de células tumorales inoculadas s.c. capaces de crecer en el 50% de los ratones; (n)= número de experimentos; en cada experimento hubo 12-24 ratones controles y 12-24 ratones que recibieron el procedimiento de inmunización, que luego fueron desafiados con diferentes dosis s.c. de células tumorales MCC, con lo cual se calculó la DT<sub>50</sub> en cada caso. El error estándar (ES) nunca excedió el 10% del valor medio.

**b:** Relación o cociente entre: DT<sub>50</sub> del grupo tratado/ DT<sub>50</sub> del grupo control

\*: p < 0.01 comparado con el control

\*\* : p < 0.001 comparado con el control

Los resultados de estos experimentos revelaron que el tumor MCC es fuertemente inmunogénico dado que los diferentes métodos de vacunación empleados fueron capaces de impedir el desarrollo de implantes de MCC, incluso cuando el número de células tumorales implantadas fue muy alto (5 × 10<sup>6</sup> células).

Sin embargo, estos mismos procedimientos utilizados no ya como vacunas preventivas sino como posibles herramientas o vacunas terapéuticas para tratar el mismo tumor MCC una vez que se encuentra en crecimiento, no tuvieron ningún efecto aun cuando el tamaño del tumor a tratar fue muy pequeño. La única excepción fueron las células dendríticas estimuladas *in vitro* con extracto acelular

del tumor MCC. En efecto, cuando  $3 \times 10^5$  de estas células fueron inoculadas en la almohadilla plantar de ratones que albergaban un tumor MCC de 10-70 mm<sup>3</sup>, se observó un retardo del crecimiento tumoral y una mayor supervivencia ( $76.0 \pm 8.4$  días; n= 6) que la observada en ratones controles portadores de MCC de igual tamaño inoculados con células dendríticas inmaduras o solución fisiológica ( $60.1 \pm 3.2$  días; n= 11,  $p < 0.05$ ).

Sin embargo tumores poco mayores a 100 mm<sup>3</sup> no fueron afectados por ninguna de las terapias inmunológicas utilizadas, incluida la terapia con células dendríticas maduras (Chiarella, Reffo et al. 2008).

#### **1.4. Inicio y decaimiento de la inmunidad anti-tumoral durante el crecimiento progresivo del tumor MCC**

Al comienzo de su crecimiento (iniciado por la inoculación s.c. de  $5 \times 10^5$  células tumorales), el tumor MCC genera una respuesta inmune anti-tumoral que va creciendo progresivamente durante las primeras dos semanas después de su inoculación. Más tarde, cuando el tumor supera los 500 mm<sup>3</sup> esta respuesta inmune desaparece bruscamente, por mecanismos que aún no han sido comprendidos (**Figura 3 A-E**).

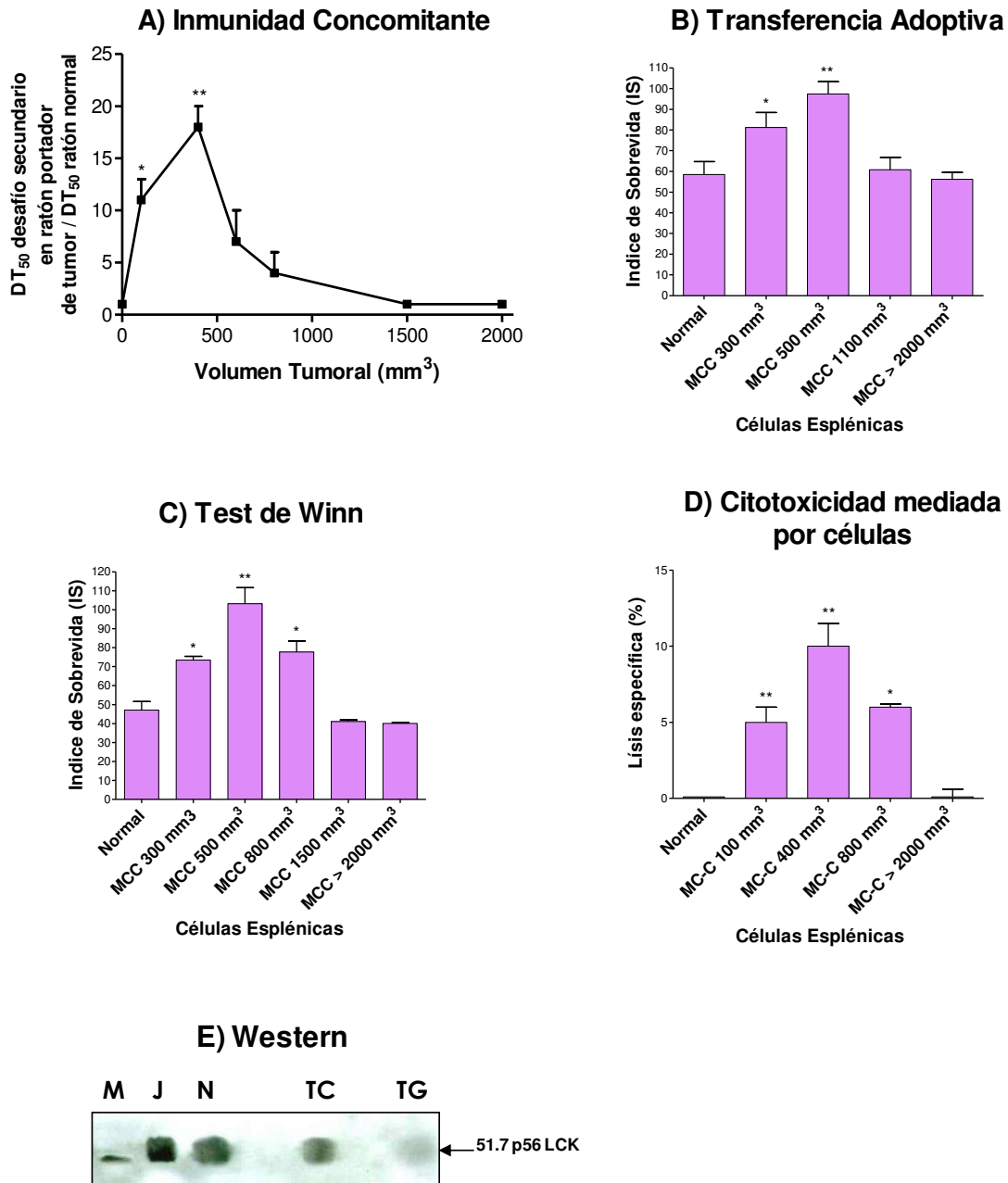
La inmunidad anti-tumoral durante el crecimiento del tumor MCC fue evaluada usando 5 ensayos diferentes:

- Capacidad de un ratón portador de tumor de inhibir el crecimiento de un segundo implante (Inmunidad Concomitante, **Figura 3A**).
- Habilidad de células esplénicas para transferir pasivamente inmunidad anti-tumoral a ratones naïve (Transferencia Adaptativa de inmunidad, **Figura 3B**).
- Habilidad de células esplénicas para contrarrestar la capacidad tumorigénica de células tumorales cuando las células esplénicas son mezcladas con células tumorales *in vitro* y luego inoculadas en ratones normales (Test de Winn, **Figura 3C**).

- Habilidad de células esplénicas para matar específicamente a células tumorales marcadas con  $^{51}\text{Cr}$  *in vitro*. (Citotoxicidad mediada por células, **Figura 3D**)
- El nivel de tirosina kinasa p56<sup>lck</sup>, una proteína de transducción de señales que se expresa en células T y que es activada luego de la unión del ligando al TCR (**Figura 3E**).

Como se observa en la **Figura 3A-D**, cada uno de los parámetros anteriores, se expresa y luego decae después de que el tumor ha superado los 500 mm<sup>3</sup>. Del mismo modo como se muestra en la **Figura 3E**, observamos que mientras células T de ratones normales y ratones portadores de tumor <500 mm<sup>3</sup> exhiben altos niveles de p56<sup>lck</sup>, las células T de ratones portadores de tumor >500mm<sup>3</sup> exhiben una profunda reducción de la expresión de la proteína.

La temprana y transitoria respuesta anti-tumoral demostró ser específica de tumor y fue observada en ratones eutímicos pero no en nude (Franco, Bustuoabad et al. 1996) lo cual significa que es un mecanismo dependiente de células T.



**Figura 3:** A) **Inmunidad concomitante:** expresada como la DT<sub>50</sub> de un tumor secundario MCC en ratones portadores de tumor MCC/DT<sub>50</sub> en animales controles. El eje de abscisa indica el volumen del tumor primario al momento del desafío del tumor secundario. Cada punto representa la media ± ES de 5 experimentos. \* P < 0.002 comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de 1,500 y 2,000 mm<sup>3</sup>; P < 0.05 comparados con ratones portadores de tumor MCC de 800 mm<sup>3</sup>. \*\* P < 0.001 comparado con ratones controles y ratones portadores

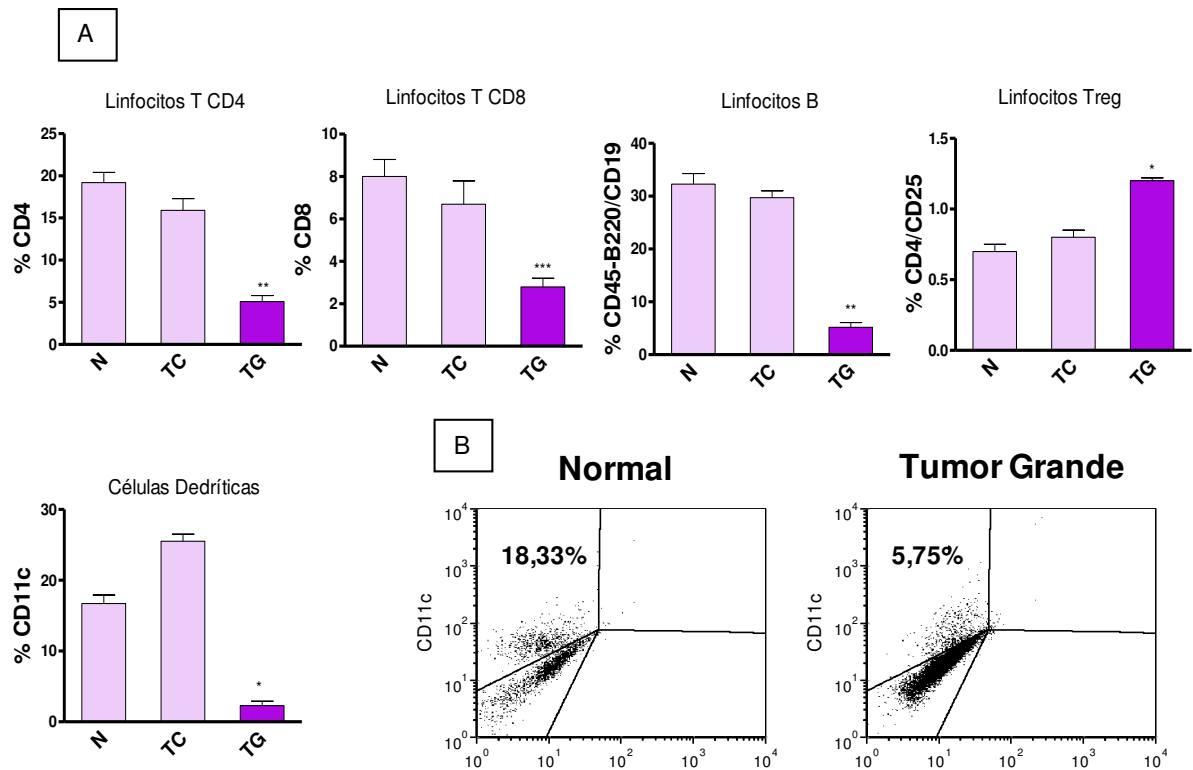
de tumor MCC de 800, 1,500 y 2,000 mm<sup>3</sup>;  $P < 0.02$  y  $P < 0.05$  comparados con ratones portadores de tumor MCC de 600 mm<sup>3</sup> y 100 mm<sup>3</sup>, respectivamente. **B) Ensayo de transferencia adoptiva.** Ratones normales recibieron por vía i.p.  $1 \times 10^8$  células esplénicas provenientes de ratones normales o ratones portadores de tumor MCC de diferentes tamaños; 2 hs después del desafío s.c. con  $5 \times 10^5$  células tumorales viva. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de 6 experimentos. IS= tiempo de sobrevivida / t / n, donde t= número de animales muertos y n= número de animales inoculados. \* $P < 0.01$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de 1,100 y  $>2,000$  mm<sup>3</sup>. \*\*  $P < 0.001$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de 1,100 y  $>2,000$ . **C) Test de Winn.**  $50 \times 10^6$  células esplénicas de ratones normales o de ratones portadores de tumor de diferente tamaño que fueron mezclados *in vitro* con  $5 \times 10^5$  células tumorales MCC y luego la mezcla inoculada s.c. en ratones naïve. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de 5 experimentos. \* $P < 0.001$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de 1,500 y  $>2,000$  mm<sup>3</sup>. \*\*  $P < 0.001$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de 1,500 y  $>2,000$  mm<sup>3</sup>;  $P < 0.002$  y  $P < 0.01$  comparado con ratones portadores de tumor MCC de 300 mm<sup>3</sup> y 800 mm<sup>3</sup>, respectivamente. **D) Citotoxicidad mediada por células.** Se midió la actividad citotóxica de  $2 \times 10^6$  células esplénicas de ratones normales o ratones portadores de tumor de diferente tamaño sobre  $2 \times 10^4$  células tumorales marcadas con <sup>51</sup>Cr. Cada barra representa la media  $\pm$  ES de 4 experimentos. \*  $P < 0.01$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de  $>2,000$  mm<sup>3</sup>. \*\*  $P < 0.001$  comparado con ratones controles y ratones portadores de tumor MCC de  $>2,000$  mm<sup>3</sup> y  $P < 0.05$  comparado con ratones portadores de tumor MCC de 100 y 800 mm<sup>3</sup>. **E) Niveles de p56<sup>LCK</sup>:** en esplénocitos T ( $4 \times 10^6$  células/calle) a través del crecimiento del tumor MCC. La figura es representativa de uno de los dos experimentos realizados. Calles: M= marker de peso molecular, J= células Jurkat (control positivo de expresión de p56<sup>LCK</sup>), N= esplénocitos de ratones normales, TC=esplénocitos de ratones portadores de tumor chico ( $<500$  mm<sup>3</sup>), TG= esplénocitos de ratones portadores de tumor grande (1,500–2,000 mm<sup>3</sup>)

### 1.5. Evaluación de las distintas poblaciones esplénicas durante el crecimiento del tumor MCC

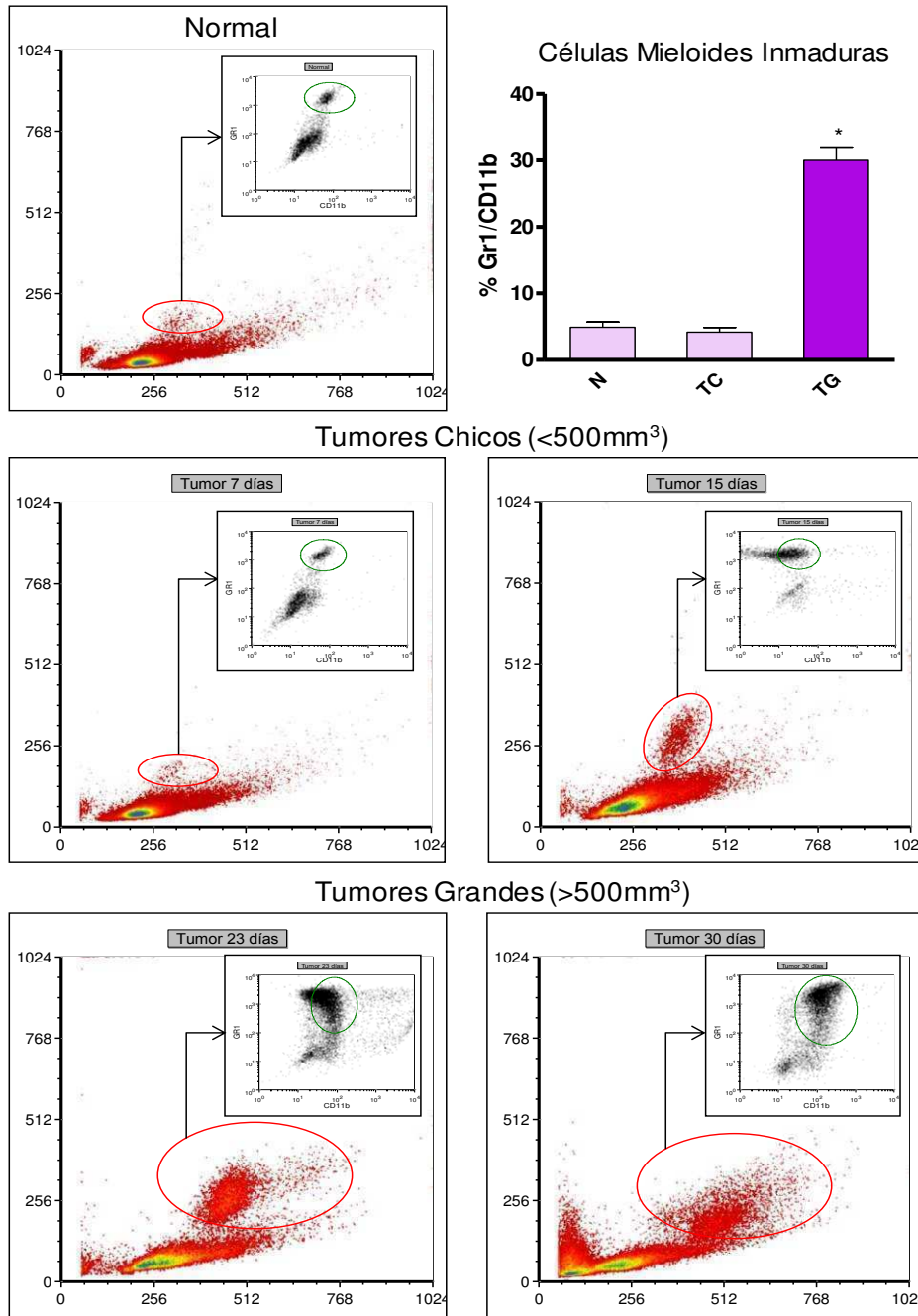
Durante el crecimiento del tumor MCC se pudo observar que las distintas poblaciones esplénicas se fueron modificando. Tanto los linfocitos T ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ), los linfocitos B ( $CD19^+/B220^+$ ) como las células dendríticas ( $CD11c^+$ ) exhibieron una reducción significativa entre ratones controles (ratones sin tumor) y ratones portadores de tumor chico (volumen tumoral  $\leq 500 \text{ mm}^3$ ) con respecto a los ratones portadores de tumor grande (volumen tumoral  $> 500 \text{ mm}^3$ ) (**Figura 4A**). Los ratones portadores de tumores chicos no mostraron diferencias significativas con respecto a los ratones normales, aunque se observó un aumento de células dendríticas ( $CD11c^+$ ) que luego disminuyó en ratones portadores de tumores grandes. Sin embargo los linfocitos T regulatorios ( $CD4^+CD25^+$ ) se vieron aumentados. En la **Figura 4B** se muestra un gráfico de puntos (*Dot plot*) de citometría de flujo representativo del porcentaje de células dendríticas (CDs) de bazo.

Contrariamente a lo observado con los linfocitos y las CDs, se observó un aumento significativo en células  $GR1^+/CD11b^+$  en ratones portadores de tumor grande. Estas células denominadas células supresoras o células mieloides inmaduras (MDSC de sus siglas en inglés), se caracterizan por ser fenotípicamente grandes y granulosa. En la **Figura 5** se puede observar como esta población va aumentando a medida que el tumor crece (círculo), desde los días 7 y 15 post inoculación de células tumorales MCC (tumores chicos,  $\leq 500 \text{ mm}^3$ , TC) hasta los días 23 y 30 (tumores grandes,  $> 500 \text{ mm}^3$ , TG).





**Figura 4: Evaluación de las distintas poblaciones esplénicas durante el crecimiento del tumor MCC. A) Porcentaje de distintas poblaciones esplénicas obtenidas de ratones controles (normales, N), ratones portadores de tumor chico (TC, volumen  $\leq 500 \text{ mm}^3$ ), ratones portadores de tumor grande (TG, volumen  $>500 \text{ mm}^3$ ). La estadística se realizó comparando los ratones normales vs. los de tumor grande. Comparación entre TG vs. N: \*  $p < 0.001$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.05$ . Los resultados representan la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Los números absolutos de esplénocitos de bazo fueron: TG  $[(5.53 \pm 0.80) \times 10^8, n=4$  experimentos]; N  $[(1.33 \pm 0.17) \times 10^8, n=4, p < 0.01$  vs. TG] y TC ( $< 500 \text{ mm}^3$ )  $[(2.05 \pm 0.37) \times 10^8, n=4, p < 0.05$  vs. TG]. B) Dot plot representativo mostrando el porcentaje de células dendríticas CD11c<sup>+</sup> de ratones normales y ratones portadores de tumor grande**



**Figura 5: Evaluación del aumento de células mieloides inmaduras (Gr1/CD11b) en bazo durante el crecimiento del tumor MCC.** El gráfico de barras muestra los resultados representando la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes, donde N= ratones normales, TC= tumores chicos,  $\leq 500 \text{ mm}^3$  y TG= tumores grandes,  $> 500 \text{ mm}^3$ . Los gráficos de punto son representativos de uno de los cuatro experimentos. La estadística se realizó comparando los ratones normales vs. los tumor grande (\* $p < 0.001$ ).

En nuestro laboratorio también se evaluaron las modificaciones de las distintas poblaciones de ganglio drenante y no drenante del tumor (Maglioco, Machuca et al.), obteniéndose resultados similares a los observados en bazo.

### **Conclusión parcial**

El fibrosarcoma MCC es un tumor fuertemente inmunogénico que despierta una respuesta inmune antitumoral durante las primeras etapas de su crecimiento. Esta inmunidad desaparece bruscamente cuando el tumor supera los 500 mm<sup>3</sup>.

Asociada a esta pérdida de inmunidad (conocida históricamente como eclipse inmunológico) se observó una absoluta incapacidad de cualquier estrategia inmunológica para afectar el crecimiento tumoral, aunque estas mismas estrategias son muy eficaces para prevenir el crecimiento del tumor cuando se aplican **antes** del implante tumoral. Coincidente con el eclipse inmunológico, se observó una significativa alteración de las poblaciones de células esplénicas, a saber una disminución de la proporción de los linfocitos T y B y de las células dendríticas y un aumento de los linfocitos T regulatorios y de las células mieloides inmaduras con fenotipo GR1/CD11b (MDSC).

## CAPITULO 2

### **2. CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SU RELACIÓN CON EL TUMOR**

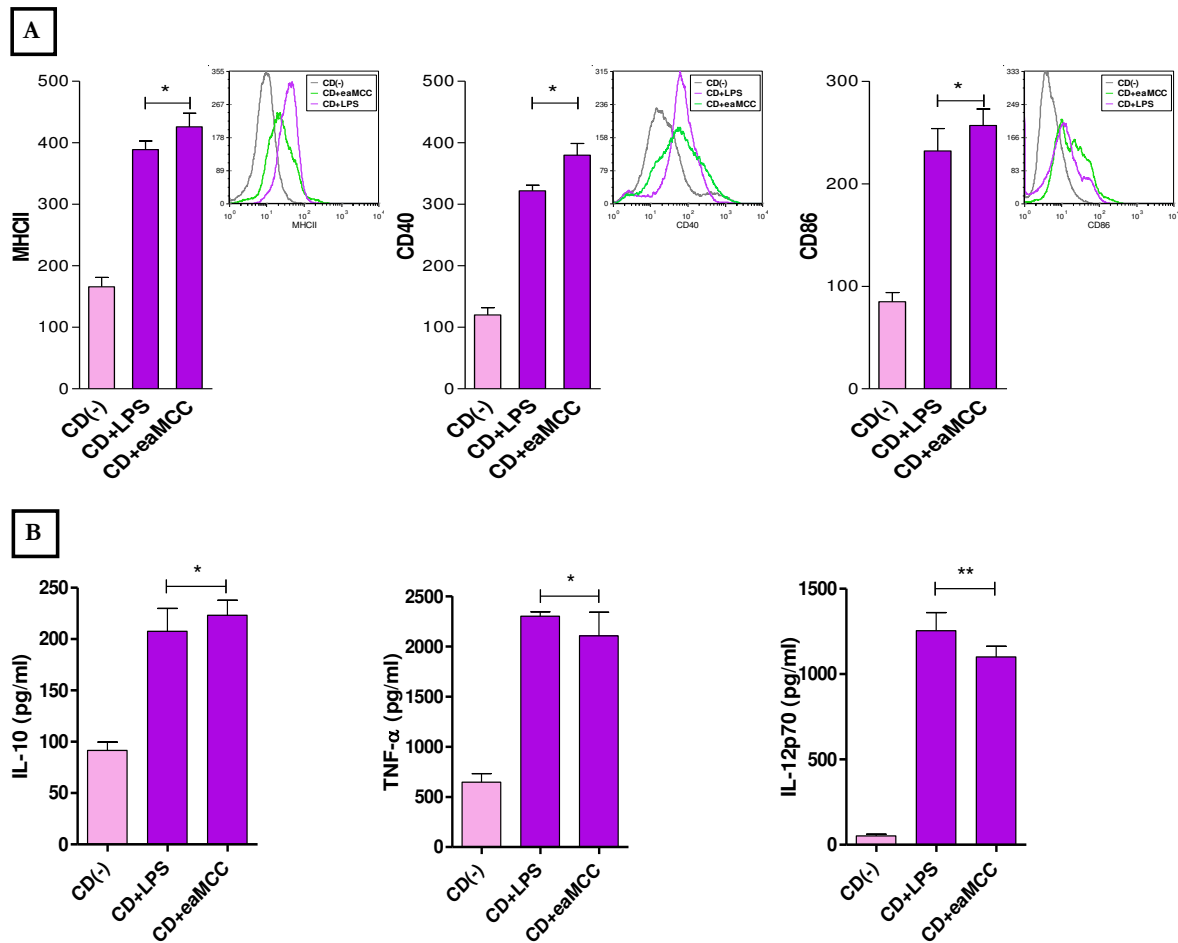
#### ***2.1. Extracto acelular del tumor MCC induce la maduración de células dendríticas***

En primer lugar se demostró que el extracto acelular de MCC (eaMCC) induce la maduración de las CD, elevando los marcadores de maduración clásico: MHCII, CD80, CD86 y CD40 (**Figura 6A**) y produciendo las citoquinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 (**Figura 6B**).

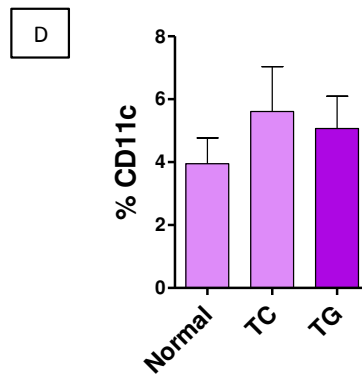
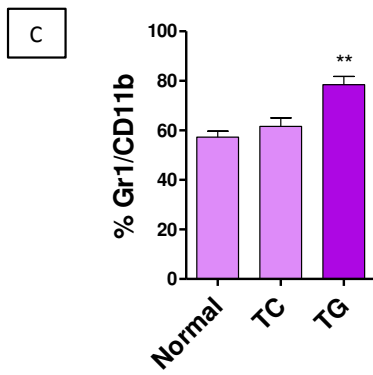
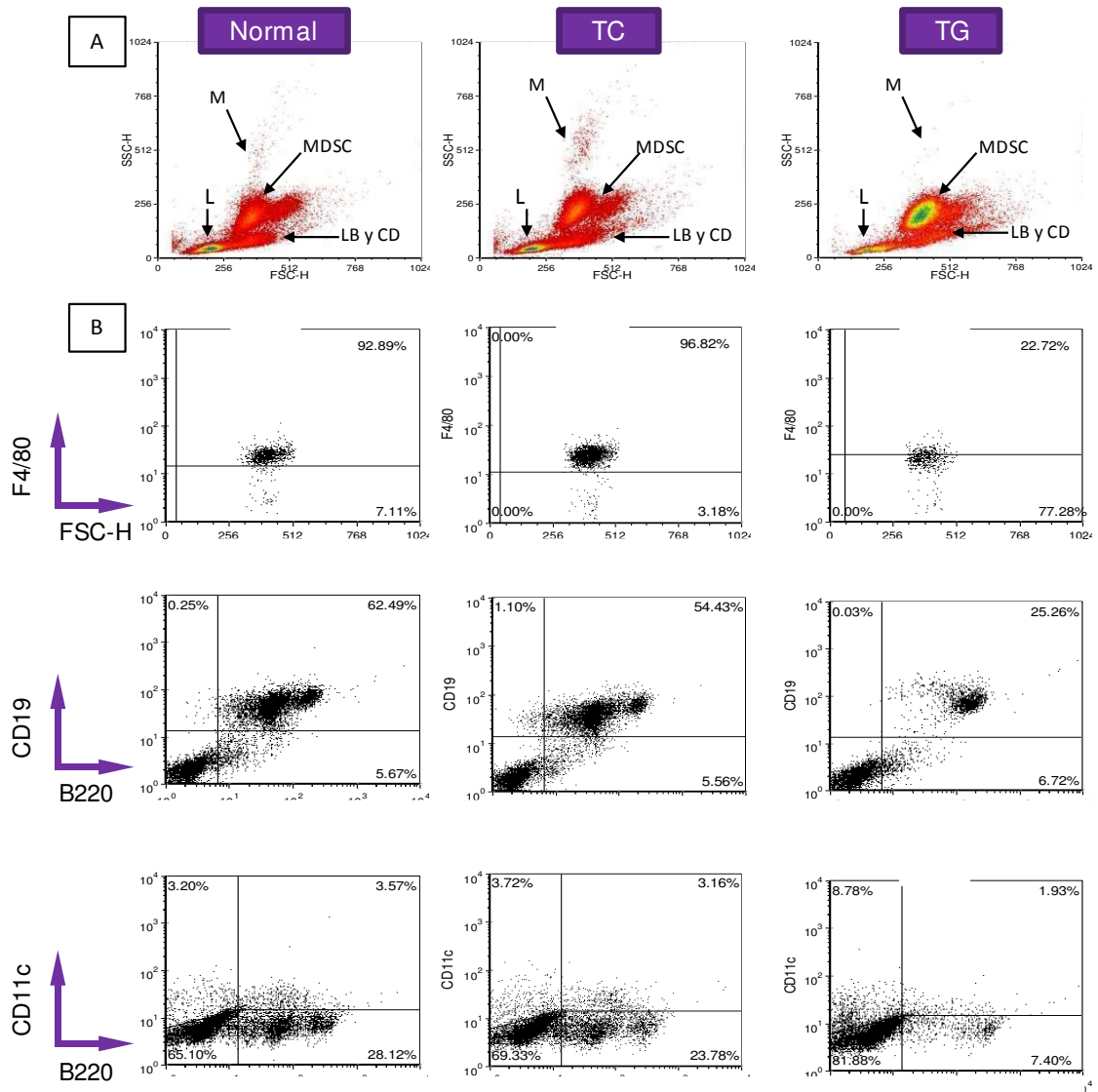
#### ***2.2. Evaluación fenotípica de las distintas poblaciones de médula ósea durante el crecimiento del tumor MCC***

Quisimos evaluar el estado de los precursores de médula ósea, para ver si el problema de la falta de respuesta inmune hacia el tumor (cuando éste supera los 500 mm<sup>3</sup>) estaba asociado, al menos en parte, a la inhibición de la diferenciación de precursores mieloides a CD.

Para ello obtuvimos las células de médula ósea de animales normales, animales portadores de tumor chico y portadores de tumor grande. Como el objetivo de esta Tesis no se basa en la caracterización de las distintas poblaciones celulares en los distintos órganos, solo señalaremos que en médula ósea se observa un cambio poblacional importante, al igual que el observado en bazo y ganglio (Maglioco, Machuca et al.). A medida que el tumor MCC crece se modifican las poblaciones (**Figura 7A**), dando como resultado una disminución en macrófagos (F4/80), en LB inmaduros y maduros (CD19/B220) y en CD plasmocitoides (CD11c/B220) (**Figura 7B**) y un aumento significativo de las MDSC (**Figura 7C**). Por otro lado no se observó una modificación significativa en la proporción de las CD mieloides (**Figura 7D**).



**Figura 6: Extracto acelar de MCC madura eficazmente a las CD.** **A)** Las CD ( $1 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron con: LPS ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) (como control positivo, CD-LPS) y extracto acelar de MCC (1:4, CD-eaMCC) durante 24 hs para observar los marcadores de maduración y además se utilizaron CD sin estimular (como control negativo, CD(-)). La expresión de CD40, CD86 y MHC II se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados expresan la media de intensidad fluorescencia (MFI) como valores relativos  $\pm$  ES de tres experimentos representativos. \*  $p < 0.001$  respecto del control. **B)** Evaluación de la concentración de TNF- $\alpha$ , IL-12p70 e IL-10 en los sobrenadantes de cultivo de CD(-), CD-LPS y CD-eaMCC. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  ES de tres experimentos. \*  $p < 0.001$ ; \*\* $p < 0.0001$  respecto del control.

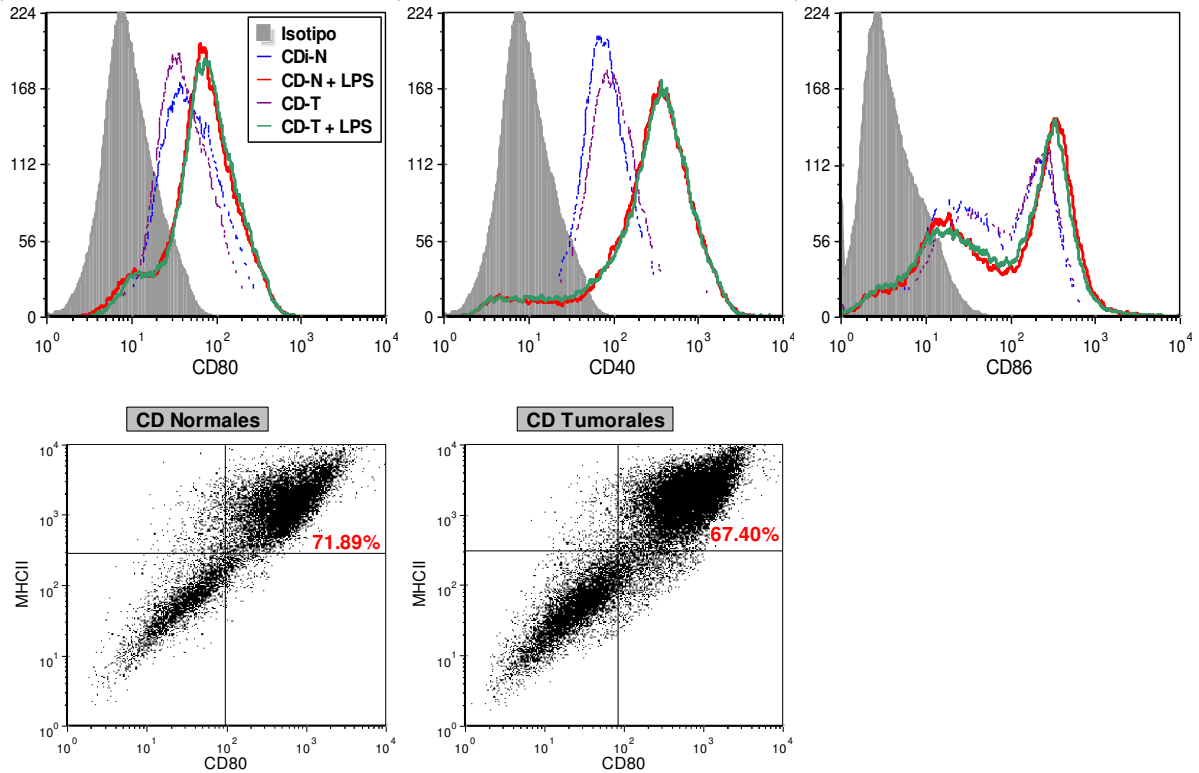


**Figura 7: Caracterización de las distintas poblaciones en médula ósea. A)** Dot plot mostrando las distintas poblaciones hematopoyéticas en ratones controles (normal), ratones portadores de tumor chico (TC) y ratones de tumor grande (TG). **B)** Análisis de las distintas poblaciones mediante la expresión de los marcadores característicos de cada población: macrófagos (F4/80), linfocitos B (CD19/B220) y células dendríticas plasmocitoides (CD11c/B220). **C)** Porcentaje de células mieloides inmaduras de fenotipo GR1/CD11b de 3 experimentos independientes. \*\* $p < 0,001$  con respecto al normal y TC. **D)** Porcentaje de CDs (CD11c) de 3 experimentos independientes.

### **2.3. Diferenciación y maduración de células dendríticas provenientes de ratones con tumor**

A partir de los resultados obtenidos de médula ósea (MO), en donde no se observaron cambios en las proporciones de los precursores de las CDs mieloides, decidimos evaluar el estado de dichas células en ratones portadores de tumor, para ver si la falta de una respuesta anti-tumoral se debe, entre otras cosas, a la dificultad de estos precursores de diferenciarse en CDs. Para ello se obtuvieron precursores de CDs a partir de MO, de animales normales y animales portadores de tumor grande y se diferenciaron en presencia de GM-CSF durante 8 días. Luego las CDs diferenciadas se maduraron con LPS por 24 hs, y se caracterizaron los marcadores de maduración (MHCII y CD40) y las moléculas co-estimuladoras (CD86 y CD80).

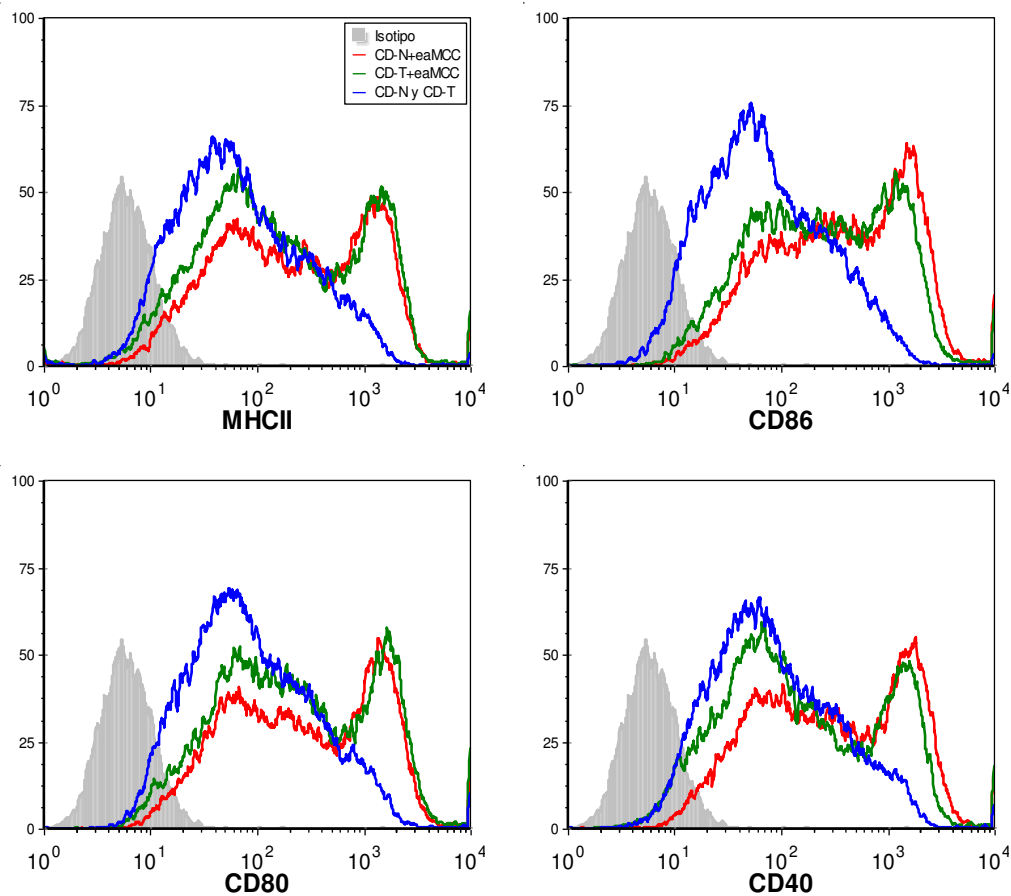
Los resultados fueron analizados por citometría de flujo y demostraron que los precursores de CDs a partir de MO de un animal con tumor diferencian y maduran de igual forma que los precursores de ratones normales (**Figura 8**).



**Figura 8: Evaluación fenotípica de precursores de médula ósea de ratones portadores de tumor.** Caracterización del fenotipo de CDs derivadas de MO de ratones normales (CD-N) y de ratones portadores de tumor (CD-T), obtenidas tras 8 días de cultivo en presencia de GM-CSF y maduras luego por 24 hs con LPS (+LPS). Se analizó el perfil de expresión de los distintos marcadores de maduración por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. Los porcentajes de las distintas poblaciones celulares fueron analizados a partir de una región enriquecida en CDs (CD11c<sup>+</sup>). El presente es un experimento representativo de 3.



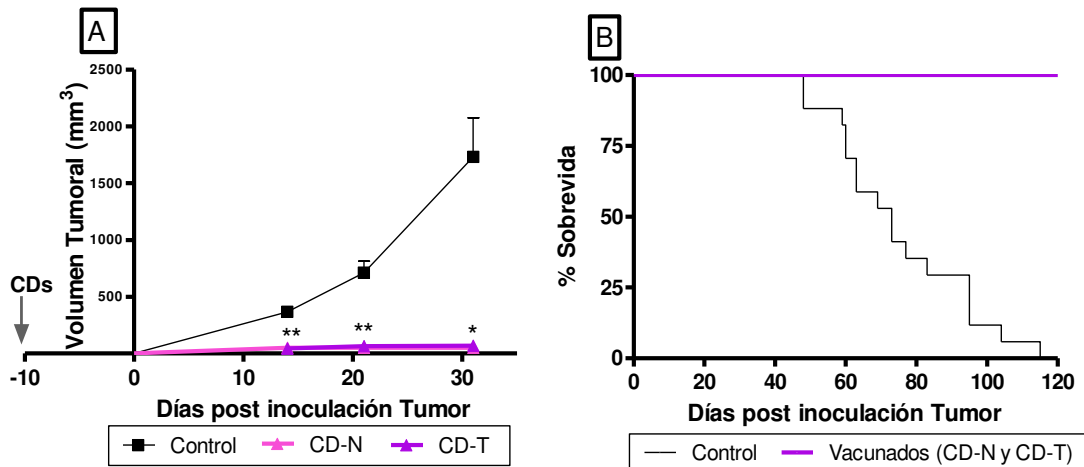
Del mismo modo cuando obtuvieron precursores de MO de ratones portadores de tumor y se diferenciaron por 8 días con GM-CSF y luego se maduraron con eaMCC por 24 hs, la maduración de las CDs fue tan efectiva que cuando fueron maduras con LPS (**Figura 9**). Las CDs diferenciadas de un ratón normal y de un ratón portador de tumor que no fueron maduras con eaMCC exhibieron curvas muy similares por lo que se decidió mostrar solo una (línea azul) por cuestiones de claridad.



**Figura 9: Evaluación fenotípica de precursores de médula ósea de ratones portadores de tumor.** Caracterización del fenotipo de CDs derivadas de MO de ratones normales (CD-N) y de ratones portadores de tumor (CD-T), obtenidas tras 8 días de cultivo en presencia de GM-CSF y maduras luego por 24 hs con extracto acelular de MCC (eaMCC). Se analizó el perfil de expresión de los distintos marcadores de maduración por citometría de flujo. Las células fueron marcadas con anticuerpos monoclonales conjugados con distintos fluorocromos. Los porcentajes de las distintas poblaciones celulares fueron analizados a partir de

una región enriquecida en CD $s$  (CD11c $^+$ ). El presente es un experimento representativo de 3.

Asimismo cuando se realizó la vacunación con CD $s$  derivadas de MO de ratones portadores de tumor y maduras *in vitro* con eaMCC, los resultados fueron similares a los obtenidos con CD $s$  provenientes de un ratón normal maduras con eaMCC. Estos es, la vacunación fue tan efectiva con CD $s$  derivadas de ratones portador de tumor como de ratones normales (**Figura 10**).



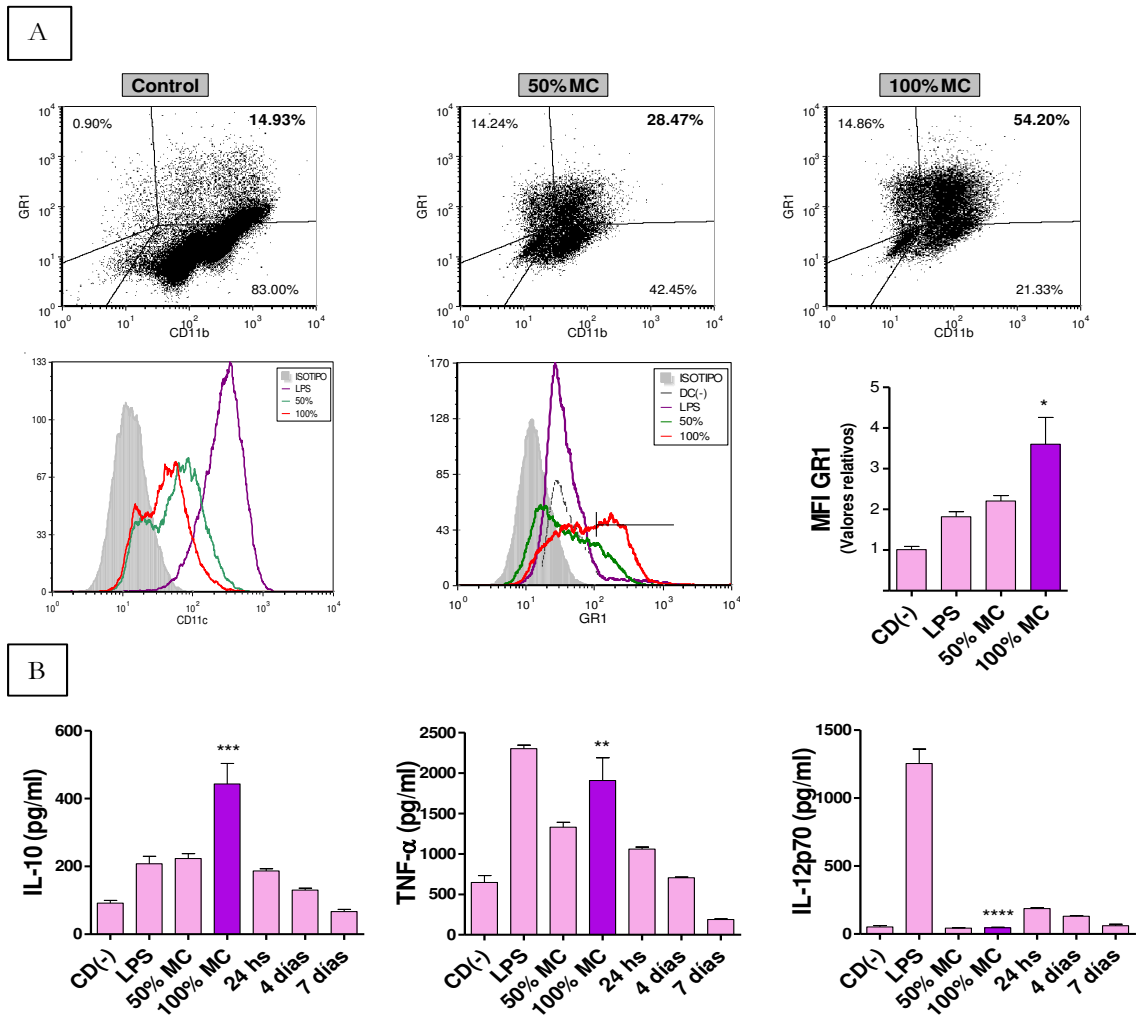
**Figura 10: Vacunación con células dendríticas provenientes de ratones normales (CD-N) y ratones con tumor (CD-T). Evaluación del crecimiento tumoral y sobrevida. A)** Los ratones recibieron una vacunación almohadilla plantal (*intra food pad, i.f.p*) con  $3 \times 10^5$  CD $s$  (N o T) (previamente estimuladas *in vitro* con eaMCC) 10 días antes de la inoculación s.c. de  $5 \times 10^5$  células MCC vivas. El crecimiento de MCC inoculados en ratones que recibieron CD(-) o solución fisiológica sirvieron como controles. \* $P < 0.01$ ; \*\* $P < 0.001$ . **B)** Curva de sobrevida de ratones controles y ratones que recibieron la vacunación con CD $s$  (N o T). La curva de las CD-N y CD-T fueron iguales y es por eso que se graficaron juntas.

## **2.4. ¿Son los factores tumorales responsables de la generación de CDs defectuosas?**

### **2.4.1. Diferenciación de las células dendríticas en presencia de factores tumorales**

Con el objeto de evaluar la posibilidad de que la falla en la respuesta inmune antitumoral en ratones portadores de tumores grandes sea debido, entre otras cosas, a factores liberados por el tumor que pueden generar una falla en la diferenciación en MO de precursores mieloides a CDs se llevo a cabo el siguiente experimento. En primer lugar obtuvimos precursores de MO de ratones normales, los cuales se diferenciaron en medio completo normal o medio condicionado de tumor (al 50% o 100%), en presencia de GM-CSF. Al cabo de 8 días de cultivo las células obtenidas fueron marcadas con anticuerpos monoclonales para estudiar su perfil (**Figura 11A**). Además se tomaron los sobrenadante para evaluar las citoquinas mediante la técnica de ELISA (**Figura 11B**). Los mismos resultados fueron obtenidos al estudiar los precursores de MO provenientes de ratones portadores de tumor grande.

Como puede verse en la **Figura 11A** las células que estuvieron en presencia del medio condicionado de tumor no diferenciaron a CDs, por ser CD11c negativas. Lo interesante fue que estas mismas células marcaron de forma positiva para GR1/CD11b, dando como resultado MDSC. Al analizar los niveles de IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 en los sobrenadantes de estos cultivos, se pudo observar niveles altos de IL-10 y de TNF- $\alpha$  y a su vez bajos niveles o nulos de IL-12p70 (**Figura 11B**). Los datos revelados por los ELISAS corroboran que las células presentes en el cultivo eran MDSC.



**FIGURA 11: Caracterización del fenotipo de precursores de MO en presencia de medio condicionado de tumor MCC. A) Precursoras de MO diferenciadas en presencia de medio normal (Control), 50% medio condicionado (50% MC) o 100% de medio condicionado (100% MC) tras 8 días de cultivo con GM-CSF y maduras luego con LPS por 24 hs. Las células fueron marcadas con distintos anticuerpos monoclonales. Los porcentajes de las distintas poblaciones celulares fueron analizadas de una región enriquecida en células CD11c<sup>+</sup>. Solo se muestran los gráficos con anti-GR1 y anti-CD11b. Además se muestra un histograma de GR1 con su respectivo gráfico de barras. Tanto el Dot Plot como el histograma son representativos de 5 experimentos independientes. B) De los mismos cultivos fueron recolectados los sobrenadantes a los cuales luego se les midieron por la técnica de ELISA distintas citoquinas. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  (100% vs LPS).**

Cuando los precursores de MO fueron incubados con medio condicionado de tumor (al 50% o 100%) se observó que se diferenciaban menos a CDs, observando menos nidos (característicos de que las CDs se están diferenciando correctamente), así como también se observaron mas células adherentes. A cabo de 8 días de diferenciación la mayoría de las células eran fenotípicamente más grandes y granulosas que CDs, o con vacuolas. Asimismo se observó una mayor citotoxicidad cuanto mayor era el porcentaje de medio condicionado. Esta citotoxicidad no era debida a la falta de nutrientes, ya que los medios fueron suplementados con aminoácidos esenciales así como también con SFB.

Esto demuestra que los precursores de CDs son afectados claramente por los factores liberados por el tumor, no solo impidiendo la diferenciación hacia células dendríticas, sino además favoreciendo la expansión de las células mieloides inmaduras o supresoras (MDSC) con fenotipo GR1/CD11b.

Asimismo cuando los precursores de MO fueron incubados en presencia de suero de ratones portadores de tumor, se observó una significativa disminución en la diferenciación de los precursores obtenidos de MO a CDs (dato no mostrado).

### **Conclusión parcial**

El extracto acelular del tumor MCC madura eficazmente a las células dendríticas provenientes de precursores de médula ósea tanto de ratones normales como de ratones portadores de tumor. Por otro lado se demostró que los precursores de MO tanto de ratones normales como de portadores de tumor no se diferencian eficazmente a CDs en presencia de factores liberados por el tumor, desviándose en este caso la diferenciación hacia células mieloides supresores inmaduras (MDSC). Esto significa que, la pérdida de respuesta inmune antitumoral en portadores de tumor grande podría deberse, al menos en parte, a que el tumor produce factores que son liberados a la corriente sanguínea y que afectarían la diferenciación de precursores de MO a CDs. Esta falta de CDs dificultaría la inducción de una respuesta inmune antitumoral eficaz.

## CAPITULO 3

### 3. INFLAMACIÓN Y TUMOR

#### 3.1. *Evidencia que la des-regulación de la inmunidad concomitante está asociada a la aparición de mecanismos supresores activos*

El estado de tolerancia hacia el tumor MCC observado en ratones portadores de tumor cuando éste ha superado los 500 mm<sup>3</sup> (eclipse inmunológico, ver punto 1.4) podría ser atribuido a mecanismos de delección clonal (por ejemplo de células T inmunes al tumor) o a mecanismos de inmunosupresión activa. Para distinguir entre ambas alternativas, se realizaron parabiosis entre ratones tolerantes e inmunes. Como controles se efectuaron parabiosis entre ratones inmunes y normales y entre normales y normales. Como ratones tolerantes empleamos portadores de tumor MCC de más de 500 mm<sup>3</sup>; como ratones inmunes utilizamos aquellos que habían sido vacunados contra MCC usando células MCC irradiadas. Ratones normales fueron aquellos sin tumor que no habían recibido ningún tratamiento. La parabiosis es la unión experimental de dos individuos que a partir del establecimiento de la unión, comparten una misma circulación.

Si la delección clonal jugara un papel importante, la transferencia de linfocitos de un ratón inmune a un ratón tolerante unido en parabiosis al primero, debería revertir el eclipse inmunológico al reemplazar un tipo celular que había sido eliminado del ratón tolerante. Por otro lado, si mecanismos de supresión activa fueran responsables del estado de tolerancia aquella transferencia sería incapaz de revertir el eclipse, porque la inmunidad transferida sería esterilizada por esos mecanismos supresores.

Para evaluar el estado de tolerancia o inmunidad, cada miembro del par en parabiosis fue desafiado, en el dorso, con  $2 \times 10^5$  células MCC vivas, 9 días después de haberse realizado la parabiosis.

Como puede observarse en la **Tabla 2**, en el par tolerante-inmune, las células tumorales crecieron en todos los animales (6/6), tanto tolerantes como inmunes, indicando que la parabiosis no solo falló en revertir el eclipse inmunológico en los tolerantes, sino que convirtió a los inmunes en tolerantes. Por el contrario, en el par inmune-normal, el estado inmune pudo ser transferido al ratón normal, ya que cuando el ratón normal fue desafiado con células tumorales MCC, estas no crecieron. Estos resultados sugirieron fuertemente que el eclipse inmunológico puede estar mediado por mecanismos de supresión activos. Si este fuera el caso, se podría explicar la refractariedad a las terapias inmunológicas en tumores establecidos, porque cualquier mecanismo activo que suprima la respuesta inmune en ratones portadores de tumor contra su propio tumor, puede también suprimir cualquier intento activo o pasivo de una inmunoterapia antitumoral.

***Tabla 2: Falla en la eliminación de la tolerancia en ratones portadores de tumor MCC en parabiosis con ratones inmunes***

Ratones en parabiosis <sup>b</sup>	Ratones con tumor MCC/ total <sup>a</sup>		
	Tolerante	Inmune	Normal
Tolerante x Inmune	6/6	6/6	
Inmune x Normal		0/4	0/4
Normal x Normal			9/9

**a:** número de ratones a los cuales les creció el tumor luego del desafío con células tumorales vivas / número total de animales inoculados. El desafío tumoral fue de  $2 \times 10^5$  células tumorales MCC en el dorso de cada miembro del par de animales en parabiosis, luego de 9 días de haber sido realizada la parabiosis.

**b:** ratones tolerantes son ratones portadores de tumor MCC  $>500 \text{ mm}^3$ , creciendo s.c. en el flanco opuesto a la unión en parabiosis. Ratones inmunes son animales inoculados con células tumorales MCC irradiadas 14 y 7 días antes de la parabiosis. Ratones individuales (es decir no unidos en parabiosis) tanto tolerantes como normales fueron incapaces de rechazar un implante con  $2 \times 10^5$  células tumorales MCC en 5/5 y en 9/9 casos respectivamente. Ratones inmunes individuales rechazaron el implante tumoral en 6/6 casos.

\*:  $p < 0.05$

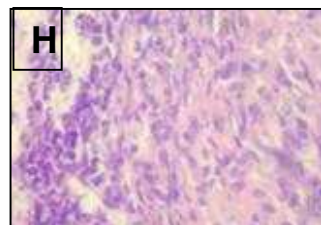
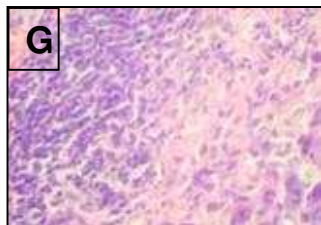
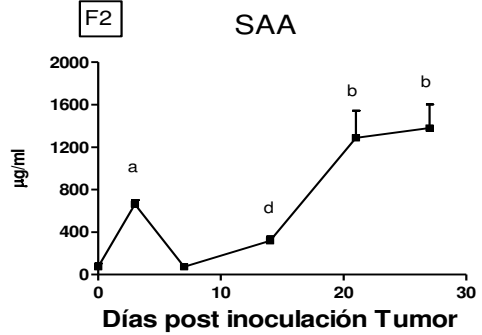
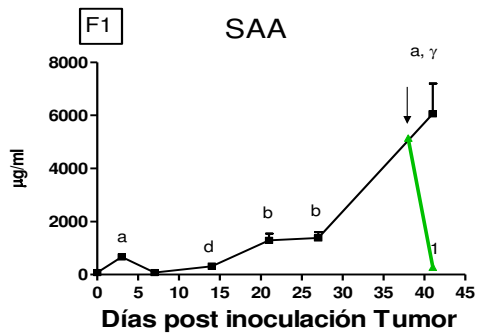
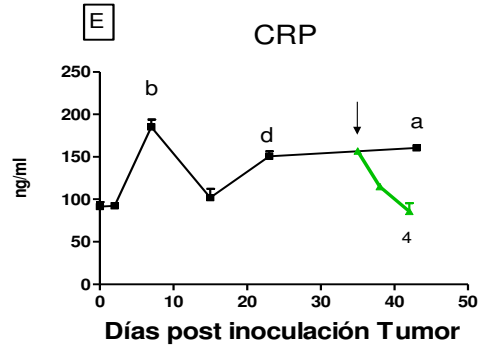
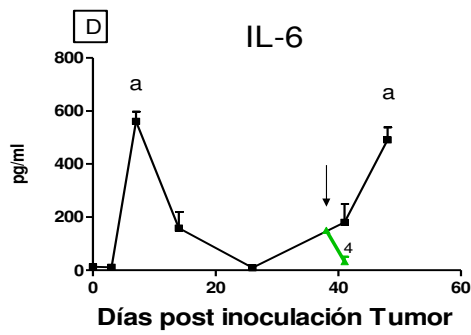
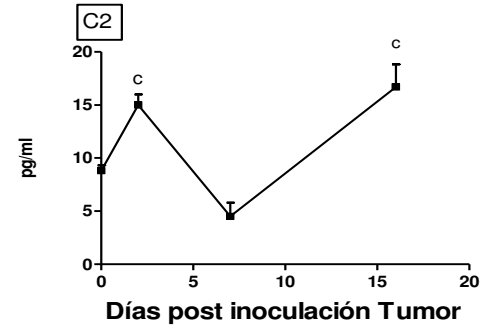
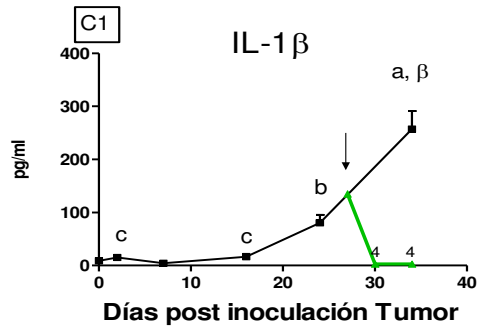
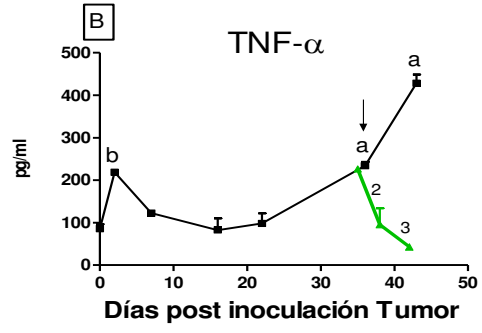
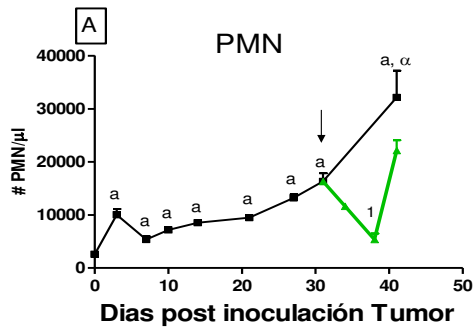
\*\* :  $p < 0.01$

### **3.2. El crecimiento del tumor MCC se encuentra asociados a un proceso de inflamación sistémica**

Durante el crecimiento del tumor MCC hemos detectado dos picos de inflamación sistémica evidenciados por un aumento de polimorfonucleares (PMN) circulantes, y en la concentración sérica de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y de las proteínas de fase aguda CRP (*C reactive protein*) y SAA (*serum A amyloid*).

El primer pico es relativamente pequeño y transitorio, ya que fue detectado sólo durante la primera semana luego de la inoculación del tumor. Posiblemente este pico representa la respuesta del organismo ante el trauma de la inoculación, ya que un pico similar ha sido obtenido después de la inoculación con fibroblastos normales. Por otro lado, el segundo pico se observó luego de 14 días, al mismo tiempo que el tumor comenzó a crecer exponencialmente, y coincidente con el inicio del eclipse inmunológico. Este segundo pico fue, en general, más prominente que el primero y su intensidad fue proporcional al tamaño del tumor (**Figura 12A-F**). Estudios histológicos mostraron que entre los días 5 y 14 después de la inoculación de las células tumorales, el tumor incipiente era infiltrado preferencialmente por linfocitos (**Figura 12G**). Sin embargo, a medida que el tumor crecía y que los PMN aumentaban en circulación, también aumentaba el porcentaje de PMN que infiltraba el tumor (**Figura 12H**).

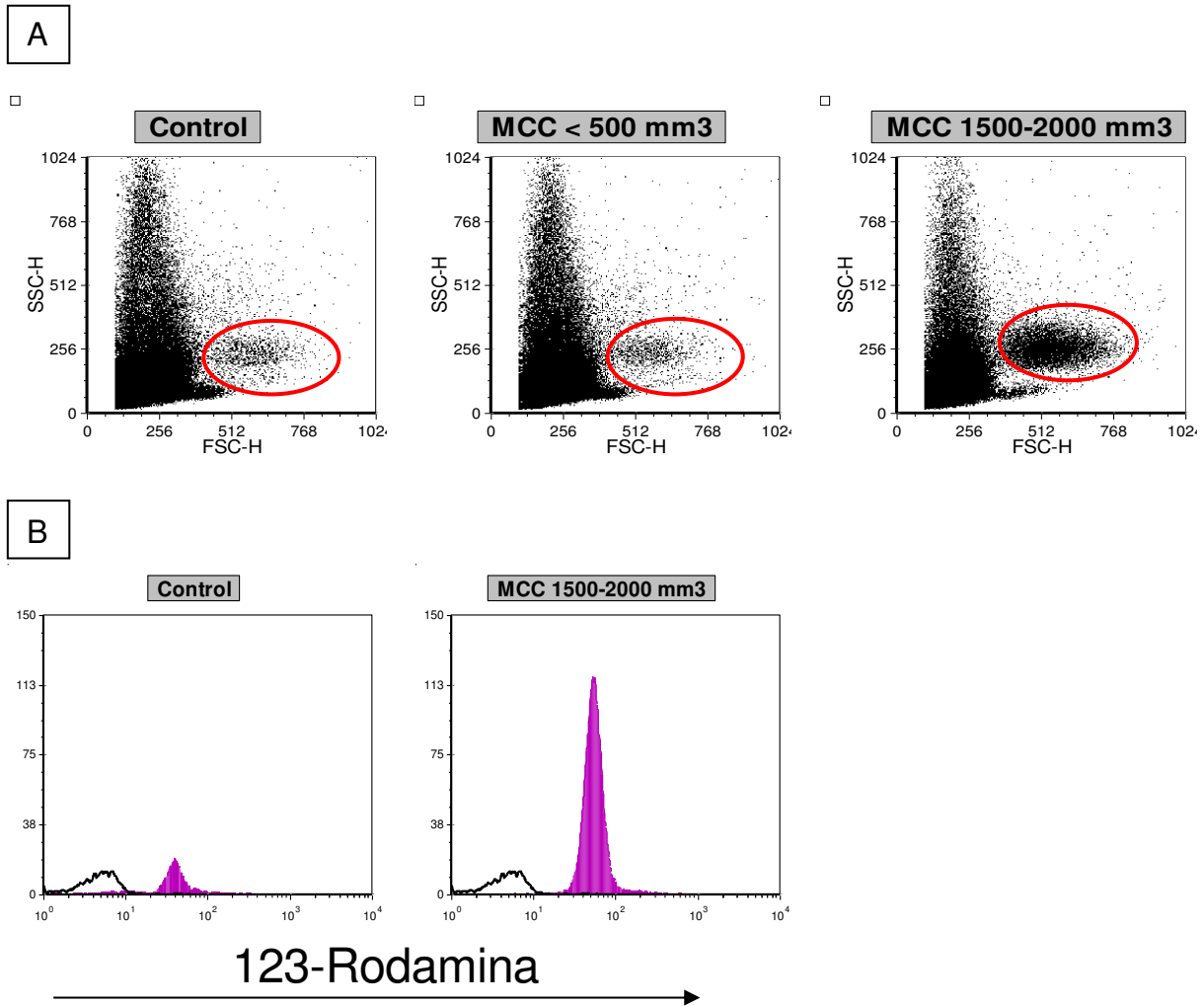




**Figura 12: El crecimiento del tumor MCC está asociado a una condición de inflamación sistémica.** EL crecimiento subcutáneo del tumor MCC fue acompañado por ciertos parámetros de inflamación sistémica, evidenciada tanto por un aumento de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) **(A)** como por un aumento de la concentración sérica de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$  **(B)**, IL-1 $\beta$  **(C)**, e IL-6 **(D)**, y de las proteínas de fase aguda CRP **(E)** y SAA **(F)** (líneas negras). En C1 Y F1 se observan los gráficos completos, y en C2 y F2 se descartan los días 24 y 34, para observar mejor el pico inicial al día 2 de IL-1 $\beta$  y al día 3 de SAA, respectivamente. Cada punto representa la media  $\pm$  ES de 2-4 determinaciones de citoquinas y proteínas de fase aguda y la media  $\pm$  ES de 3-10 determinaciones de conteo de PMN. Comparación con valores normales: a  $P < 0.001$ , b  $P < 0.01$ , c  $P < 0.05$ , d  $P < 0.02$ . Comparación entre el segundo pico (días 34-48) y el primer pico (días 2-7) de inflamación sistémica:  $^{\alpha}P < 0.002$ ,  $^{\beta}P < 0.001$ ;  $^{\gamma}P < 0.01$ . El infiltrado peritumoral en tumores pequeños (<500 mm<sup>3</sup>) preferentemente está compuesto por linfocitos **(G)** y en tumores grandes (1,500–2,000 mm<sup>3</sup>) por PMN **(H)** (X400). Las líneas en color verde (flecha) representan los valores observados luego del tratamiento con una sola dosis de dexametasona (DX) (0.75 mg/kg ratón) vía i.p. (ver más adelante, punto 3.3). Comparación entre grupo control y el grupo con el tratamiento son:  $^1P < 0.05$ ,  $^2P < 0.002$ ,  $^3P < 0.001$ ,  $^4P < 0.01$ .

En ratones portadores de tumor grande, no solo observamos un gran número de PMN maduros e inmaduros, sino que además pudimos observar un gran número de precursores mieloides en diferentes estados de diferenciación que eluían aproximadamente en el mismo lugar que los PMN en el gradiente de Ficoll-Hypaque. Estos precursores mieloides y también muchos de los PMN circulantes observados, pueden incluirse en lo que recientemente se ha dado en llamar MDSC (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Se tratan de células con fenotipo GR1/CD11b (como ya estuvimos mencionando), con un tamaño mayor al de los PMN observados en los ratones normales o portadores de tumor chico (**Figura 13A**), y exhiben un significativo nivel de activación. La activación, asociada a la liberación de grandes cantidades de especies reactiva del oxígeno (ROS), se evaluó utilizando el cromóforo 123-Dihidrorodamina (123-DHR), y como puede observarse en la **Figura 13B**, los PMN y los precursores mieloides de tumor grande generan más cantidad de 123-Rodamina que los controles, indicativo de una mayor producción de ROS.

En contraste con el gran aumento de PMN circulantes, el número de linfocitos circulantes permaneció constante a través del crecimiento tumoral, con valores no muy diferentes a los normales ( $6955 \pm 556$  linfocitos/ $\mu$ l; n=6).



**Figura 13. Análisis morfológico por citometría de flujo de polimorfonucleares (PMN) y precursores mieloides circulantes. A) Cambio en el fenotipo de PMN y precursores mieloides (elipse roja) circulantes a través del crecimiento del tumor MCC. Ratones normales (control), portadores de tumor chico ( $< 500\text{m}^3$ ), y de tumor grande ( $1500\text{-}2000\text{ mm}^3$ ). B) Determinación de la activación de PMN circulantes en ratones controles y portadores de tumor MCC grande mediante la liberación de 123-Rodamina. Figura representativa de 3 experimentos independientes.**

Nota: desde el punto de vista de su ubicación en el gradiente de Ficoll-Hypaque y de su localización en el dot plot, no hemos podido distinguir entre PMN y precursores mieloides, y de hecho cuando hablamos de PMN en esta Tesis incluimos a los precursores mieloides (MDSC).

### 3.3. *Tratamiento anti-inflamatorio con dexametasona revierte los parámetros de inflamación sistémica asociados al crecimiento progresivo del tumor MCC*

La correlación temporal entre inflamación sistémica y eclipse inmunológico observada durante el crecimiento del tumor MCC, sugirió la posibilidad de que éste (el eclipse) pudiera ser causado, al menos en parte, por aquélla (inflamación sistémica). Los tres hechos siguientes dan mayor peso a esta posibilidad. En primer lugar y según se ha desarrollado en el capítulo anterior (ver punto 2.3) la dramática expansión de MDSC en circulación y bazo observada durante el crecimiento de MCC, es un reflejo de la incapacidad de precursores mieloides de diferenciarse, entre otras cosas, a CD8. Esto indudablemente deteriora la capacidad del animal portador del tumor para mantener una efectiva respuesta inmune antitumoral. En segundo lugar, las células MDSC parecen ejercer, según datos de diversos laboratorios, un significativo efecto inmunosupresor a través de la inhibición de células CTL, la inducción de Treg y también como consecuencia de su habilidad para diferenciarse en TAM (macrófagos inmunosupresores asociados al tumor). En tercer lugar, la proliferación de células esplénicas inmunes contra el tumor MCC incubadas *in vitro* con antígeno tumoral (una medida *in vitro* de respuesta inmune antitumoral) fue inhibida cuando estas células fueron co-cultivadas con suero de ratones portadores de tumor grande, que exhibían una alta concentración de citoquinas pro-inflamatorias y de proteínas de fase aguda (**Tabla 3**). No se observó tal inhibición cuando las células inmunes fueron co-cultivadas con suero de ratones normales o de portadores de tumor pequeño que no exhiben una alta concentración de moléculas pro-inflamatorias.

Para inhibir la inflamación sistémica utilizamos varias estrategias anti-inflamatorias. La primera fue a través del empleo de corticoide sintético dexametasona (DX), que, utilizado en una dosis relativamente baja (0.75 mg/kg por vía i.p.), redujo significativamente los parámetros de inflamación sistémica, observándose un efecto máximo en circulación entre los 3 y los 5 días después del tratamiento [**Figura 12** (línea verde)]. De igual modo, DX redujo significativamente

el número de células MDSC de bazo mientras que por el contrario aumentó el número de CD4 y de linfocitos T y B esplénicos (**Figura 14**) y de ganglio (Maglioco, Machuca et al.). Además el tratamiento con DX revirtió el efecto inhibitorio del suero de ratones portadores de tumor grande sobre la proliferación in vitro de esplénocitos inmunes en presencia de antígeno tumoral (**Tabla 3**). Se utilizaron otras estrategias anti-inflamatorias usando indometacina y el receptor dimérico de TNF- $\alpha$  (TNFR), obteniéndose efectos anti-inflamatorios cualitativamente similares a los observados con DX aunque cuantitativamente menos importantes (Chiarella, Vulcano et al. 2008)

**Tabla 3: Efecto del suero de animales portadores de tumor MCC grande sobre la proliferación in vitro de células esplénicas inmunes contra el tumor MCC en presencia de antígeno tumoral (extracto de MCC)**

Dilución final del suero	Incorporación de timidina <sup>3</sup> [H] por células esplénicas (CPM $\pm$ SE) <sup>(1)</sup>				
	MCC 2000 mm <sup>3</sup>	Normal	MCC 2000 mm <sup>3</sup> + DX-3	MCC 2000 mm <sup>3</sup> + DX-7	Medio solo
---	---	---	---	---	22117 $\pm$ 981
1:2	3757 $\pm$ 749 <sup>a</sup>	8507 $\pm$ 730	10389 $\pm$ 213	3107 $\pm$ 217 <sup>e</sup>	
1:4	6072 $\pm$ 691 <sup>b</sup>	13688 $\pm$ 1267	14543 $\pm$ 1324	4567 $\pm$ 234 <sup>f</sup>	
1:8	9707 $\pm$ 1014 <sup>c</sup>	15048 $\pm$ 1219	14340 $\pm$ 677	11245 $\pm$ 1005 <sup>g</sup>	
1:16	10184 $\pm$ 784 <sup>d</sup>	15367 $\pm$ 533	15485 $\pm$ 1248	13034 $\pm$ 1369	
GIU <sub>50</sub> /ml	> 160	28.1	22.9	78.5	

(1) Cada valor es la media de 3-6 experimentos, excepto Medio solo (n=12) y para la dilución 1:2 de MCC 2000 mm<sup>3</sup> y MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX -3 (n=2)

**a**:  $P < 0.05$  vs normal y  $P < 0.02$  vs MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

**b**:  $P < 0.001$  vs normal y MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

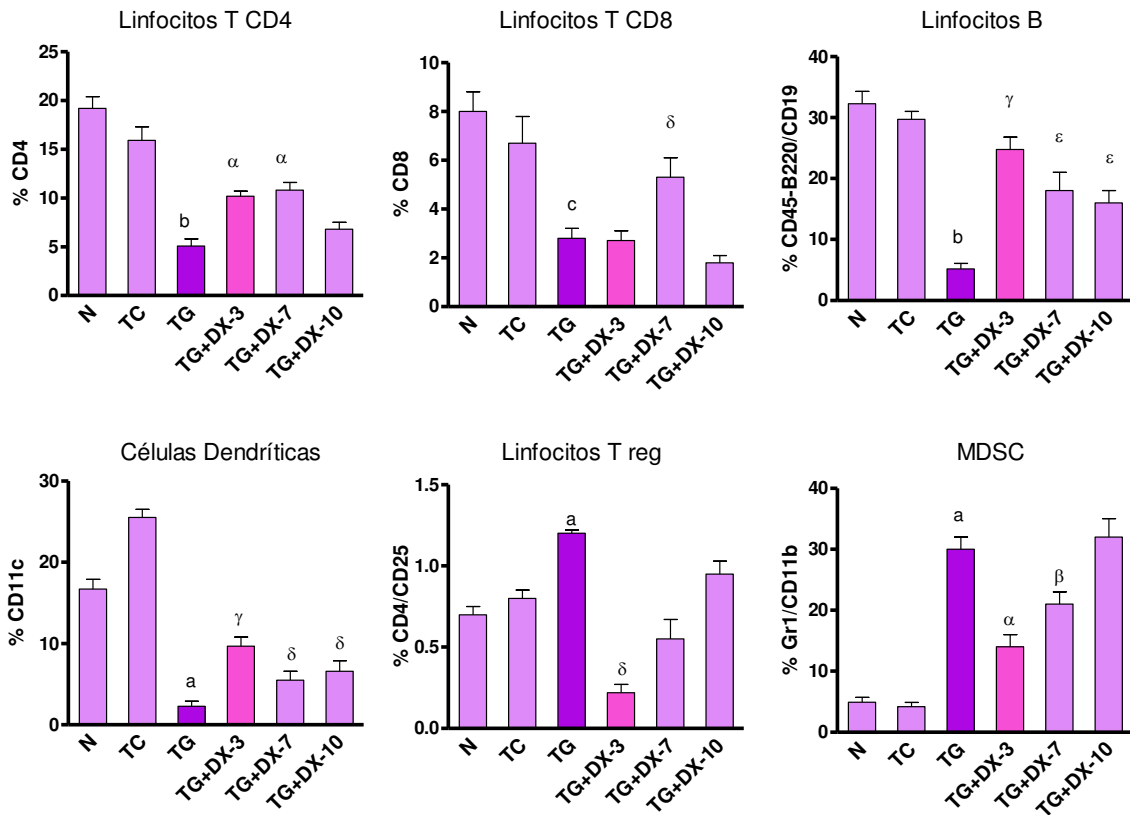
**c**:  $P < 0.05$  vs normal y  $P < 0.01$  vs MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

**d**:  $P < 0.001$  vs normal y  $P < 0.05$  vs MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

**e**:  $P < 0.001$  vs normal y MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

**f**:  $P < 0.01$  vs normal y MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3

**g**:  $P < 0.05$  vs MCC 2000 mm<sup>3</sup> + DX-3



**Figura 14: Evaluación de las distintas poblaciones esplénicas durante el crecimiento del tumor MCC luego del tratamiento con dexametasona.** Porcentaje de distintas poblaciones esplénicas obtenidas de ratones normales (N), ratones con tumor chico (TC, volumen < 500mm<sup>3</sup>), ratones con tumor grande (TG, volumen > 500mm<sup>3</sup>) y ratones con tumor grande en donde 10, 7 y 3 días antes de la extracción del bazo se les aplicó una dosis de dexametasona i.p. (0.75 mg/kg, DX-10, DX-7, DX-3, respectivamente). Comparación entre TG vs. N: a  $p < 0.001$ ; b  $p < 0.01$ ; c  $p < 0.05$ . Comparación entre TG+DX-3 o TG+DX-7 vs. TG:  $\alpha$   $p < 0.002$ .  $\beta$   $p < 0.02$ ;  $\gamma$   $p < 0.001$ ;  $\delta$   $p < 0.05$ ;  $\epsilon$   $p < 0.01$ . Los resultados representan la media  $\pm$  ES de 4 experimentos independientes. Los números absolutos de esplénocitos por bazo fueron similares TG  $[(5.53 \pm 0.80) \times 10^8, n=4$  experimentos] y TG + DX-3, TG + DX-7 y TG + DX-10  $[(5.37 \pm 0.82) \times 10^8, n=12]$ . Para propósitos comparativos, los datos de N, TC y TG fueron reproducidos de la figura 4.

### **3.4. El tratamiento anti-inflamatorio con dexametasona revierte el eclipse inmunológico**

Uno de los métodos más sencillos y directos para medir la respuesta inmune anti-tumoral en un ratón portador de tumor es medir la inmunidad concomitante contra un tumor secundario. Cuando el tumor primario MCC es menor o igual a  $500 \text{ mm}^3$ , un implante es rechazado en el 100% de los casos. Sin embargo cuando se hace un implante secundario en un ratón portador de tumor que ha superado los  $500 \text{ mm}^3$ , éste implante secundario crece en todos los casos, indicando que el organismo ha perdido la respuesta inmune antitumoral que había montado durante el crecimiento temprano del tumor: se dice entonces que el animal ha entrado en un estado de “eclipse inmunológico”. Ahora bien, para evaluar si un tratamiento anti-inflamatorio era capaz de revertir tal eclipse se llevó a cabo el siguiente experimento.

Ratones portadores de un tumor MCC grande ( $1500\text{-}2000 \text{ mm}^3$ ), que no habían recibido ningún tratamiento adicional o que habían sido inoculados con DX ( $0.75 \text{ mg/kg}$  por vía i.p) tres días antes, recibieron en el flanco contralateral del tumor primario, un implante secundario de células tumorales MCC ( $5 \times 10^5$ ).

Aunque el tratamiento con corticoides es inmunosupresor si se lo realiza en altas dosis y en forma continuada, la utilización de una sola dosis baja, ha demostrado ser eficaz para revertir la tolerancia a ciertos antígenos (Yoshihiko, 1989) y para aumentar la inmunidad antitumoral en otros modelos de ratón (Yoichiro, 1987).

Como se muestra en la **Figura 15A**, se observó una inhibición significativa del tumor secundario en ratones tratados con DX, comparados con ratones controles. La reversión del eclipse inmunológico mediada por DX dependía de la interacción de DX con los receptores de glucocorticoides, ya que ratones con DX que recibieron al mismo tiempo RU-486 (antagonista de receptores de glucocorticoides) no exhibieron tal reversión (**Figura 15A**).

A modo comparativo, también se utilizaron dos agentes anti-inflamatorios distintos, la indometacina y el receptor dimérico de TNF- $\alpha$  (TNFR), inoculados 1 o

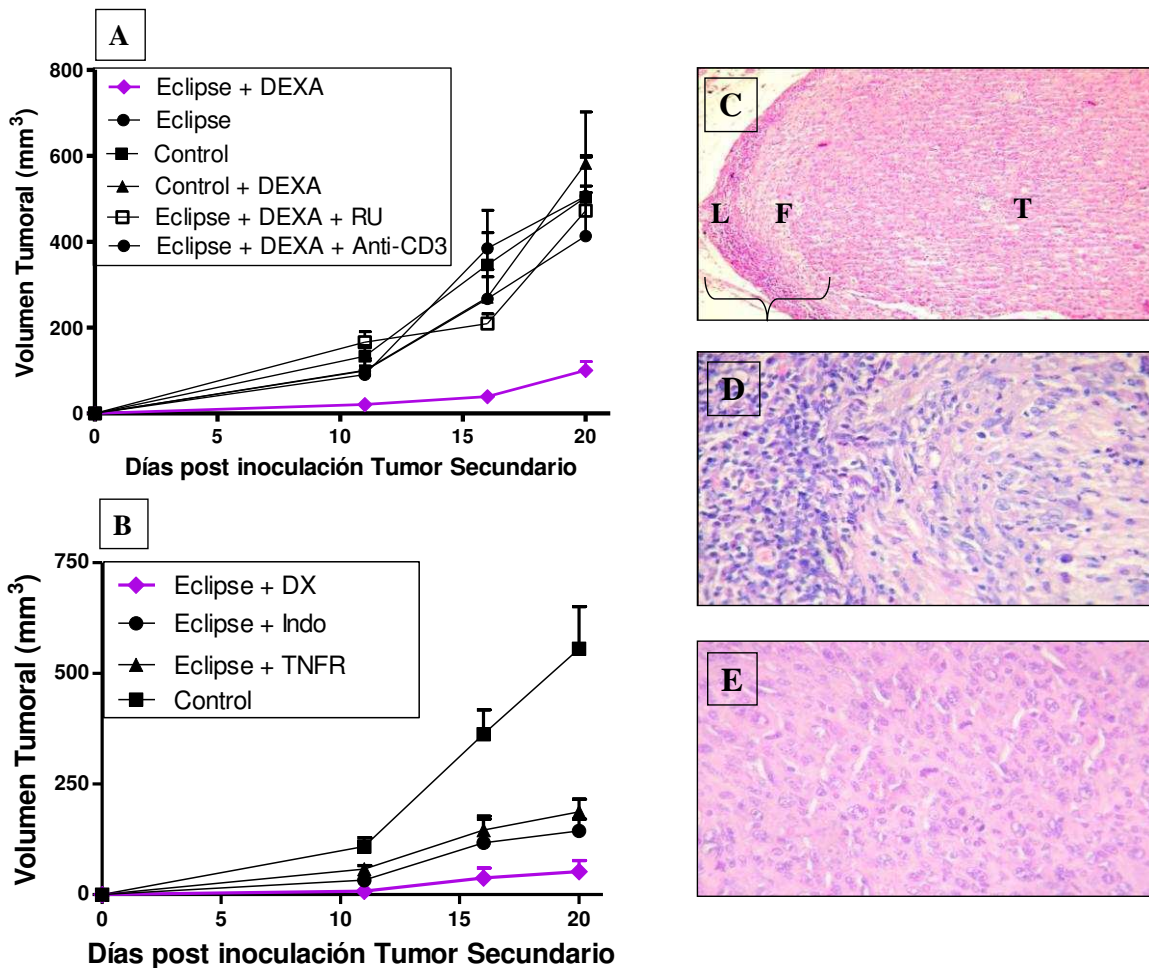
3 días, respectivamente, antes del implante secundario del tumor. Ambos revertieron parcialmente el eclipse inmunológico, pero la inhibición del implante secundario no fue tan marcada como la observada con DX (**Figura 15B**), paralelamente a su menor efecto anti-inflamatorio (ver punto 3.3).

La reversión del eclipse en ratones tratados con DX fue evidenciada además por los siguientes hechos:

- Estudios histológicos mostraron una infiltración abundante de células mononucleares en el tumor secundario (**Figuras 15C, D**) mientras que, por otro lado, en los ratones portadores de tumor sin tratar, el tumor secundario creció sin infiltración linfocitaria (**Figura 15E**).
- La inhibición del implante secundario fue específica, ya que cuando los ratones fueron desafiados con dos tumores no relacionados inmunológicamente (el fibrosarcoma MC-B y el linfoma LB) no se observó tal inhibición (Chiarella, Vulcano et al. 2008).
- Células esplénicas de estos mismos ratones recobraron la habilidad para transferir inmunidad antitumoral a ratones naïve. En efecto, el índice de supervivencia de los ratones que recibieron el implante de células tumorales MCC s.c. más la inoculación i.p. de células esplénicas de ratones portadores de tumor tratados con DX, fue significativamente mayor ( $97,8 \pm 6.0$  días; n=3 experimentos) que el de ratones que recibieron MCC y células esplénicas de ratones portadores de tumor sin tratar ( $62.5 \pm 4.0$  días; n=3 experimentos;  $p < 0.01$ ).
- La inhibición dependió de la presencia de células T. En efecto, en los ratones portadores de tumor tratados con DX que recibieron 100  $\mu$ l de mAb anti-CD3 dos días después de la inoculación de DX y luego dos veces por semana hasta terminar el experimento, no se observó inhibición del crecimiento del segundo implante tumoral (ver **Figura 15A**). La depleción selectiva de células T fue confirmada por citometría de flujo.
- Los niveles de p56<sup>lck</sup> (una proteína de transducción de señales que se expresa en células T y que es activada – fosforilada – después de que el ligando se ha

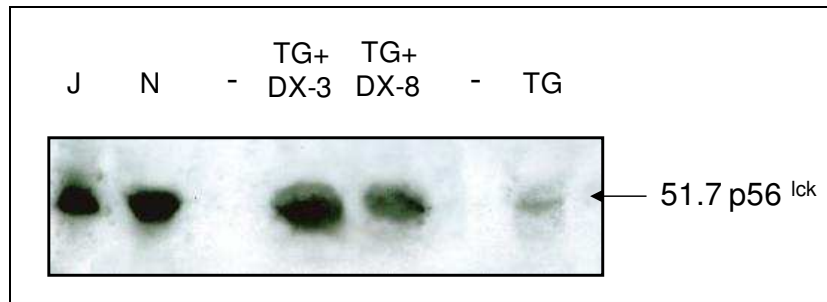


unido a su TCR) fueron normalizados o casi normalizados en células T esplénicas después del tratamiento con DX. En efecto, usando Western Blotting, pudimos demostrar que mientras los esplenocitos T de ratones portadores de tumor exhibían un bajo nivel de p56<sup>lck</sup> comparado con ratones normales, estos valores fueron aumentados a valores normales o casi normales 3 y 8 días después de tratamiento con DX (**Figura 16**).



**Figura 15: Tratamiento con DX retarda el crecimiento del tumor MCC. (A)** Reversión del eclipse inmunológico mediante DX evidenciado por la restauración de la capacidad de ratones portadores de tumor grande MCC para retrasar el crecimiento de un implante tumoral secundario MCC (inmunidad concomitante). Ratones portadores de tumor MCC de 1500-2000 mm<sup>3</sup> (tumor primario), que habían recibido una dosis de DX (0.75 mg/kg por vía i.p) tres días antes, fueron

desafiados con  $5 \times 10^5$  células tumorales MCC (tumor secundario) en el flanco contralateral (eclipse + DX, n=14). Ratones con tumor primario sin tratar (eclipse, n=16), como también ratones normales sin tratar (control, n=16) o tratados con DX (control + DX, n=10) fueron también desafiados con  $5 \times 10^5$  células tumorales MCC. El crecimiento del tumor secundario también fue evaluado en ratones portadores de tumor que recibieron además de DX, un antagonista de glucocorticoide, RU-486 (eclipse + DX + RU; n=3) o anticuerpos anti-CD3 (eclipse + DX + anti-CD3; n=6). La comparación estadística entre el grupo Eclipse + DX y los otros grupos al día 11 son:  $P < 0.01$  vs eclipse y control + DX;  $P < 0.001$  vs control y eclipse + DX + RU;  $P < 0.02$  vs eclipse + DX + anti-CD3. Día 16:  $P < 0.001$  vs todos los otros grupos. Día 20:  $P < 0.01$  vs control;  $P < 0.002$  vs eclipse y control + DX;  $P < 0.001$  vs eclipse + DX + anti-CD3 y eclipse + DX + RU. **(B)** Reversión del eclipse inmunológico mediante la utilización de indometacina (eclipse + indo) y el receptor del factor de necrosis tumoral (eclipse + TNFR) como evidencia de la restauración de la capacidad de los ratones portadores de tumor grande (1500–2000 mm<sup>3</sup>) para retrasar el crecimiento de un implante tumoral secundario de  $5 \times 10^5$  células tumorales MCC vía s.c. La comparación estadística entre el grupo Eclipse + DX vs Control: día 11:  $p < 0.01$ ; día 16:  $p < 0.001$ ; día 20:  $p < 0.002$ . Entre Eclipse + DX vs Eclipse + TNFR: días 11, 16 y 20:  $p < 0.01$ . Entre Eclipse + DX vs Eclipse + indo: día 20:  $p < 0.05$ . Entre Eclipse + TNFR y Eclipse + indo vs control: días 16 y 20:  $p < 0.05$ . **(C)** Histología de una sección de piel donde se produjo el rechazo de un implante tumoral MCC secundario en el grupo de ratones Eclipse + DX (25 días después del implante secundario). En la figura se puede observar una densa infiltración linfocitaria (L) seguido por una densa área fibrótica (F) rodeando el tumor MCC (T) (HE, X100). **(D)** Aumento de la figura C mostrando una reacción inmunológica con abundantes células mononucleares infiltrando el tumor (HE, X400). **(E)** Tumor MCC secundario en un ratón portador de tumor MCC sin tratar (25 días después de la implantación del tumor secundario). Se pueden observar células tumorales viables con alto grado de mitosis y sin infiltración de linfocitos (H&E, X400).



**Figura 16:** Normalización o cuasinormalización de los niveles de  $p56^{lck}$  en células T esplénicas de animales portadores de tumor MCC ( $1500-2000 \text{ mm}^3$ ), 3 y 8 días post tratamiento con DX. Calles: J=células Jurkat (control positivo de expresión de  $p56^{LCK}$ ), N=esplénocitos T de ratones normales, TG= esplénocitos T de ratones portadores de tumor grande ( $1,500-2,000 \text{ mm}^3$ ), TG + DX-3 y TG + DX-8: esplénocitos T de ratones portadores de tumor MCC grande pre-tratados con DX 3 u 8 días antes, respectivamente.

### **Conclusión Parcial**

El estado de eclipse inmunológico observado en ratones portadores de tumores de más de  $500 \text{ mm}^3$  fue correlacionado temporalmente con un estado de inflamación sistémica tipificado por un aumento en la concentración de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda circulantes y de PMN y MDSC en circulación y bazo. Tratamientos anti-inflamatorios basados en DX y en menor medida en Indometacina y TNFR consiguieron disminuir las manifestaciones del eclipse inmunológico.

## CAPITULO 4

### 4. TRATAMIENTOS INMUNOTERAPUETICOS PARA REVERTIR EL CRECIMIENTO TUMORAL

El fibrosarcoma MCC es un tumor fuertemente inmunogénico dado que diferentes estrategias de vacunación fueron capaces de impedir el crecimiento de implantes de ese tumor (ver punto 1.3 y tabla 1). No obstante, la mayoría de estas estrategias fueron incapaces de inhibir o aún de retardar mínimamente el crecimiento de MCC una vez que éste se encuentra establecido. En nuestra experiencia, solo CDs estimuladas con extracto acelular de MCC *in vitro* lograron retardar el crecimiento del tumor cuando fueron inoculadas en ratones portadores de MCC de 10-70 mm<sup>3</sup>. Sin embargo, como mostramos ya en el punto 1.3, ninguno de estos tratamientos, incluido el de CDs, pudo afectar el crecimiento de tumores MCC > 100 mm<sup>3</sup>.

Ahora bien, la causa de esta refractariedad a los tratamientos inmunológicos, no puede atribuirse ni a la falta de inmunogenicidad del tumor (ya que, según vimos en el capítulo 1, punto 1.3, éste es fuertemente inmunogénico), ni tampoco a la pérdida de sus antígenos por mutación una vez que el tumor ha superado cierto tamaño, ya que independientemente del tamaño del tumor del cual nosotros obtenemos células tumorales, hemos demostrado que éstas son eficientemente eliminadas *in vitro* por esplenocitos de ratones inmunes al tumor MC-C e *in vivo* en animales previamente inmunizados contra el tumor MC-C (ver **Figura 3**).

Es probable que, el inicio de la refractariedad a los tratamientos inmunológicos esté asociado al establecimiento del estado de inmunosupresión conocido como “eclipse inmunológico” caracterizado por una pérdida o bloqueo de la respuesta inmune antitumoral después de que el tumor MCC ha superado cierto volumen crítico (Franco, Bustuoabad et al. 1996). A su vez, como hemos visto en el

capítulo anterior, el inicio del eclipse se correspondió con el comienzo de un proceso de inflamación sistémica progresiva.

Sobre la base de que esta inflamación sistémica podría ser uno de las causas del eclipse y consecuentemente de la refractariedad a las terapias inmunológicas observada en los ratones portadores de tumor, decidimos realizar un tratamiento anti-inflamatorio con dexametasona como paso previo a una terapia inmunológica basada en CDs, ya que como vimos en el capítulo 3 y en la **Figura 15B**, DX fue el agente anti-inflamatorio más eficaz (entre los que probamos) y con el que obtuvimos la mayor reversión del eclipse inmunológico. Como terapia inmunológica, decidimos utilizar células dendríticas estimuladas con extracto acelular del tumor MCC, ya que como mencionamos anteriormente, fue la estrategia de vacunación más eficaz entre todas las que ensayamos.

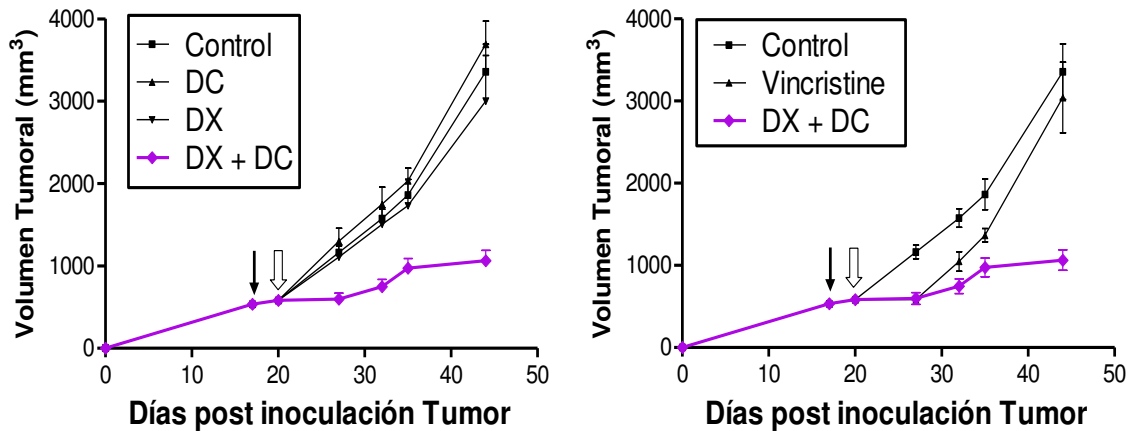
#### ***4.1. Terapia mixta de dexametasona y células dendríticas estimuladas con lisado de tumor MCC***

El efecto terapéutico de un tratamiento combinado con dexametasona y células dendríticas fue evaluado en dos condiciones experimentales que simulaban dos situaciones clínicas.

En el primer experimento, ratones portadores de MCC de  $550 \text{ mm}^3$  (en una etapa donde ya se ha hecho claramente manifiesto el eclipse inmunológico) recibieron DX y tres días después células dendríticas estimuladas con extracto de tumor, cuando el tumor había alcanzado  $600 \text{ mm}^3$ . Como se observa en la **Figura 17A** los ratones que recibieron este tratamiento combinado mostraron una profunda inhibición del crecimiento tumoral. De hecho, en los primeros 7-10 días de iniciado el tratamiento, el tumor virtualmente no creció. A partir de los 10-12 días comenzó a hacerlo pero a un ritmo mucho más lento que el de los otros grupos resultando en una sobrevida de  $90.5 \pm 3.0$  días (n=6) lo que excedió significativamente ( $p < 0.001$ ) la sobrevida de los grupos tratados sólo con células dendríticas ( $50.0 \pm 2.8$  días, n=8), sólo con dexametasona ( $57.2 \pm 5.2$  días, n=6) o con solución

fisiológica ( $50.5 \pm 0.6$  días,  $n=11$ ). Adicionalmente, cabe notar que en los ratones que recibieron sólo células dendríticas, el tumor creció más rápido en la semana posterior al tratamiento que en aquéllos que recibieron sólo dexametasona o solución fisiológica ( $p<0.05$ , día 27), lo que sugiere que bajo ciertas condiciones, cuando el tumor ha alcanzado cierto tamaño y el eclipse inmunológico no ha sido eliminado, una terapia inmunológica puede exacerbar el crecimiento del tumor de acuerdo a las predicciones de la teoría inmunoestimuladora de Prehn (Prehn 2006).

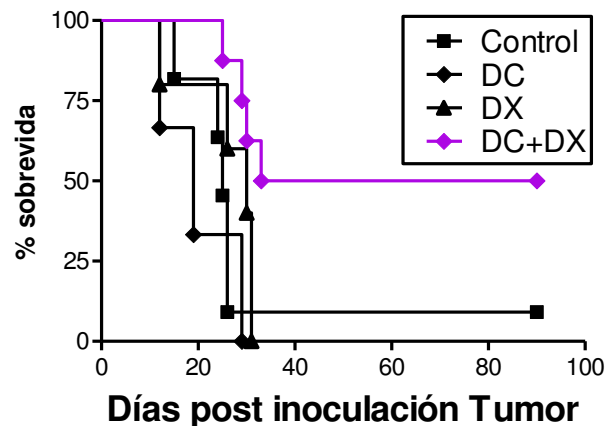
Para comparar la eficacia del protocolo de inmunoterapia en dos pasos con un tratamiento quimioterapéutico estándar, se agregó un grupo de ratones portadores de tumor de  $600 \text{ mm}^3$  el cual fue tratado con una sola dosis de vincristina (1mg/kg por peso de ratón) por la vía i.p. La vincristina es usada como tratamiento convencional contra fibrosarcomas murinos (Meyvisch, Storme et al. 1983; Teicher, Holden et al. 1990). Como se muestra en la **Figura 17B**, la quimioterapia fue capaz de retrasar el crecimiento del tumor durante 7 días luego del tratamiento, similar a lo que ocurre con nuestro protocolo inmunoterapéutico. Sin embargo, en los ratones que recibieron quimioterapia, el crecimiento del tumor se reinició luego de 7 días, siguiendo una cinética similar a la de los controles, mientras que, en los ratones que recibieron el protocolo de inmunoterapia en dos pasos, el crecimiento del tumor permaneció retardado, lo cual significa que en nuestro modelo el procedimiento de inmunoterapia fue más efectivo que la quimioterapia. En efecto, aunque los ratones tratados con vincristina tuvieron una mayor sobrevida ( $65.6 \pm 6.1$  días,  $n=10$ ) que los controles ( $50.5 \pm 0.6$  días,  $n=11$ ,  $p<0.02$ ) y los tratados con CDs sólo ( $50.0 \pm 2.8$ ,  $n=8$ ,  $p<0.05$ ), exhibieron una significativamente menor sobrevida que los ratones tratados con DX + CDs ( $90.5 \pm 3.0$  días,  $n= 6$ ;  $p<0.01$ ).



**Figura 17) (A) Esquema de inmunoterapia en dos pasos contra un tumor establecido MCC usando un tratamiento de DX seguido de una vacunación con células dendríticas.** Ratones portadores de tumor MCC de  $550 \text{ mm}^3$  recibieron DX y tres días después (cuando el tumor alcanzó un volumen de  $600 \text{ mm}^3$ ) CDs previamente estimuladas *in vitro* con extracto acelular de tumor MCC (DX+CD,  $n=6$ ). Los grupos controles fueron: ratones con tumor MCC sin tratar (control,  $n=11$ ), ratones con tumor MCC que recibieron sólo DX (DX,  $n=6$ ) y ratones con tumor MCC que recibieron solo CDs (CD,  $n=8$ ). Se evaluó el crecimiento tumoral en todos los grupos. Evaluación estadística entre los distintos grupos fue: DX+CD al día 27:  $p < 0.001$  vs Control,  $p < 0.01$  vs DC; y  $p < 0.02$  vs DX; día 32:  $p < 0.001$  vs Control,  $p < 0.01$  vs DC y DX; día 35:  $p < 0.01$  vs Control,  $p < 0.001$  vs DC y  $p < 0.05$  vs DX; día 44:  $p < 0.001$  vs Control y DC y  $p < 0.01$  vs DX. Además CD vs Control y DX al día 27:  $p < 0.05$ . ↓ : día de inoculación DX; ↓↓ : día de inoculación de CD.

**B) Comparación entre los efectos terapéuticos de la terapia de dos pasos (DX+CD) y una quimioterapia convencional usando vincristina contra el tumor establecido MCC.** Aunque el tratamiento con vincristina (Vincristina,  $n=10$ ), así como también el de DX, CD, DX+CD y el control fueron estudiados simultáneamente, para mayor claridad, los datos de vincristina son mostrados en un grafico aparte (B). Para propósitos comparativos, los datos de DX+CD y control mostrados en (A), fueron reproducidos en (B). Evaluación estadística entre vincristina vs control:  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  los día 27, 32 y 35, respectivamente. Comparación entre Vincristina vs DX + DC:  $p < 0.02$  y  $p < 0.01$  los 35 y 44, respectivamente. ↓ : día de inoculación DX; ↓↓ : día de inoculación de CD o vincristina.

En el segundo experimento, se utilizaron ratones a los que se había extirpado quirúrgicamente un tumor MCC de gran tamaño (alrededor de 2500 mm<sup>3</sup>). Cuando se opera un tumor de este tamaño el eclipse inmunológico no desaparece al menos hasta cuatro meses después de la operación (como hemos comprobado en experimentos previos, (Chiarella, Reffo et al. 2008)) y la cirugía es habitualmente no curativa ya que, transcurridos 7-10 días después de la operación, se presentan recidivas locales en la mayoría de los casos (**Figura 18**). En general los tumores que recidivan son más agresivos que el tumor original y matan rápidamente al hospedador. Esta situación no varió sensiblemente cuando los ratones fueron tratados sólo con dexametasona o sólo con células dendríticas. Sin embargo, la aplicación combinada de dexametasona tres días antes de la extirpación del tumor y células dendríticas dos días después de la misma, disminuyó significativamente la incidencia de recidivas y los ratones que exhibieron recidivas murieron más tardíamente que los de los otros grupos (**Figura 18**).



**Figura 18: Porcentaje de supervivencia en animales a los cuales se les operó un tumor MCC de 2500 mm<sup>3</sup>.** La muerte del animal (si ocurre) fue asociada a la recurrencia del tumor local. La figura muestra el porcentaje de supervivencia de los diferentes grupos: Control (n=11): ratones operados sin ningún tratamiento adicional. DX (n=10): ratones que recibieron DX 3 días antes de la operación. CDs (n=6): ratones que recibieron CDs (previamente estimuladas *in vitro* con extracto tumoral MCC) dos días después de la operación. DX+CDs (n=8): ratones que recibieron DX y CDs, 3 días antes y 2 días después de la operación, respectivamente. Evaluación estadística entre DX+CD vs control y CD; p<0.01; vs



*DX,  $p < 0.05$ . Los ratones que no generaron recidivas en el protocolo de inmunoterapia de dos pasos (DX+CD, n=4 de 8), permanecieron sin tumor hasta finalizar el estudio (180 días post cirugía).*

Estos dos experimentos demuestran que un tratamiento inmunológico basado en células dendríticas, que por sí mismo era absolutamente ineficaz para controlar el crecimiento de un tumor establecido de considerable tamaño o de prevenir la aparición de recidivas en animales a los que se había extirpado un tumor de gran tamaño, generó una profunda inhibición del tumor establecido y previno la aparición de recidivas cuando fue precedido por un tratamiento antiinflamatorio que eliminó o redujo la inflamación sistémica y el eclipse inmunológico asociado a ella.

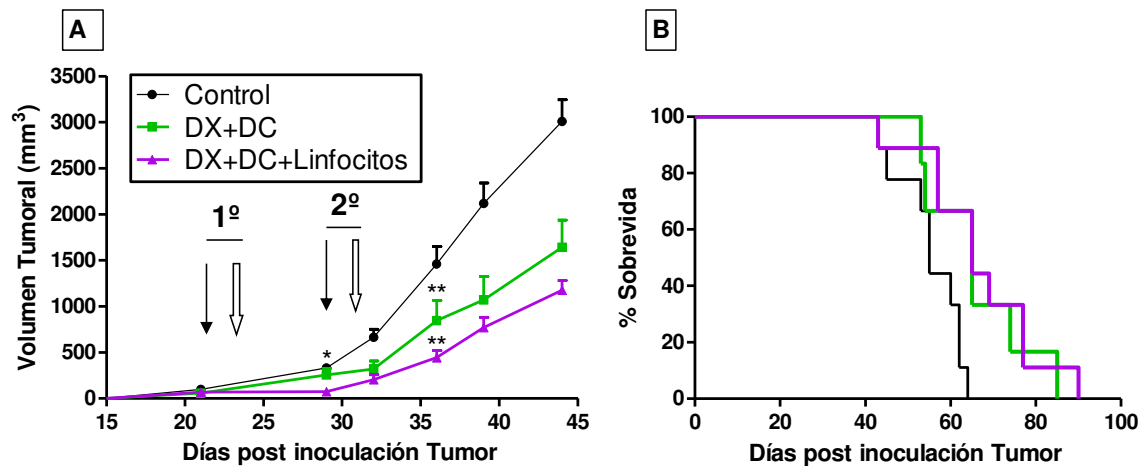
#### **4.2. *Combinación de terapia en dos pasos (DX+CD) con transferencia adoptiva de linfocitos***

Si bien la terapia combinada de DX y CDs fue efectiva, ya que no solo retardó el crecimiento tumoral, sino además aumentó la supervivencia de los animales, no logró detener por completo el crecimiento del tumor. Cuando se dieron dos rondas de DX+CDs separadas por una semana, el resultado fue ligeramente mejor que con una sola ronda de DX+CDs, pero el agregado de nuevas rondas no mejoró en absoluto los resultados (datos no mostrados).

Es posible que luego de cierto volumen tumoral la mayoría de los linfocitos potencialmente reactivos contra el tumor, presentes en los animales portadores de tumor, se encuentren tolerizados. De este modo las CDs no podrían activar a estos linfocitos y no se podría generar una buena respuesta anti-tumoral, debido al microambiente desfavorable generado por el tumor.

Es por ello que decidimos agregarle a la terapia de dos pasos una transferencia adoptiva de linfocitos naïve, obtenidos de bazo de ratones normales, al momento de la inoculación de las CDs (previamente maduras con el extracto acelular de

tumor). Se especuló que de este modo las CD tendrían la capacidad de estimular estos linfocitos naïve transferidos, que no se encontrarían tolerizados como los presentes en el animal portador de tumor. Si bien la terapia DX+CD+Linfocitos pareció ser más efectiva que la de DX+CDs, ya que se encontraron diferencias significativas en los días 29 y 36, luego, a medida que los tumores fueron creciendo no se observaron diferencias entre los dos tratamientos, ni en el crecimiento tumoral (**Figura 19A**) ni la sobrevida de los animales (**Figura 19B**).



**Figura 19: Inmunoterapia combinada de DX+CD complementando con transferencia adoptiva de linfocitos naïve.** Ratones portadores de tumor MCC chico (aproximadamente 300 mm<sup>3</sup> volumen tumoral) recibieron DX y tres días después se inocularon CD pulsadas con lisado de tumor MCC ( $3 \times 10^5$ ) y simultáneamente se inocularon linfocitos naïve de ratones normales ( $1 \times 10^6$ ) (DX+CD+Linfocitos, n=11). Este protocolo se repitió 7 días después de la inoculación con DX. Los grupos controles fueron: ratones con tumor MCC sin tratar (control, n=11), ratones con tumor MCC tratados con DX y CD pero sin la transferencia adoptiva de linfocitos (DX+DC, n=6). A todos los grupos se le evaluó el crecimiento tumoral en el transcurso de los días (A), así como también la sobrevida (B). Evaluación estadística: DX+CD vs DX+CD+Linfocitos: al día 26: \* $p < 0.01$ ; al día 36: \*\* $p < 0,001$  Tanto DX+CD como DX+CD+Linfocitos vs Control a partir del día 33 hasta finalizar el experimento la diferencia fue significativa con un  $p < 0,001$ . Las flechas señalizan el momento de la inoculación de DX, y de ahí tres días después fueron inoculadas las CD y los linfocitos, en ambos casos.

↓ : día de inoculación DX; ↓↓ : día de inoculación de CDs o CDs + linfocitos.

#### **4.3. Combinación de terapia en dos pasos (DX+CDs) con estrategia para diferenciar células mieloides supresoras (MDSC)**

Es posible que aún los linfocitos naïve transferidos sean de algún modo tolerizados por un ambiente inmunosupresor generado por el tumor, lo cual explicaría por qué no se observaron mejores resultados cuando se utilizó una terapia en tres pasos basada en DX+CDs+Linfocitos naïve respecto de la terapia de DX+CDs solo.

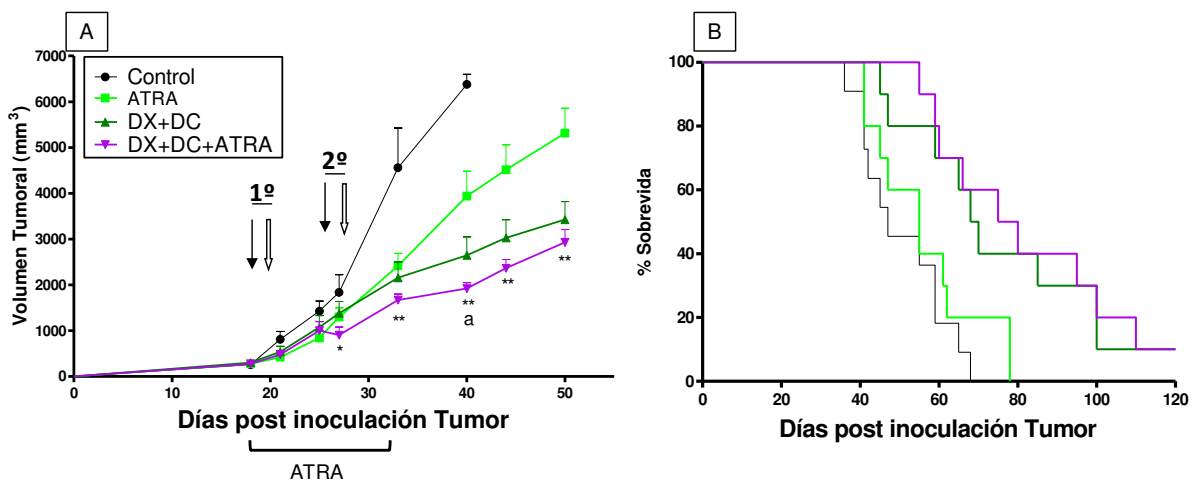
En los últimos años se ha ido incrementando la idea de que las MDSC pueden cumplir un papel significativo en la inmunosupresión asociada al crecimiento tumoral. De hecho el tratamiento con DX previo al de CDs disminuyó significativamente muchos de los parámetros inflamatorios incluido el número de MDSC en circulación y en bazo. Sin embargo el tratamiento con DX no consiguió eliminar todas las MDSC. En un intento para disminuir aun más el número de estas células potencialmente inmunosupresoras, se apeló a un tratamiento que ha recibido gran atención en los últimos años y que consiste en tratar de diferenciar las MDSC en células mieloides maduras (como macrófagos y CDs) que ya no poseen funciones supresoras.

La vitamina A ha sido identificada como un compuesto que puede mediar este efecto, ya que metabolitos de ésta, como el ácido *all-trans* retinoico (ATRA), pueden estimular la diferenciación de las MDSC tanto *in vitro* como *in vivo*, reduciendo sustancialmente su número en pacientes con cáncer y en ratones portadores de tumor. (Almand, Clark et al. 2001; Gabrilovich, Velders et al. 2001; Kusmartsev, Cheng et al. 2003; Hengesbach and Hoag 2004). El principal mecanismo del ATRA para mediar la diferenciación implica una regulación al iniciar la síntesis del glutatión, que finalmente lleva a una reducción de los niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) producidas por MDSC (Nefedova, Fishman et al. 2007).

Sobre la base de las consideraciones anteriores nosotros ensayamos un esquema de terapia combinada en tres pasos utilizando DX+CDs+ATRA.

El esquema de terapia combinada con DX y CD es el mismo utilizado hasta el momento (dos dosis de DX y CD con un intervalo de 7 días). La droga ATRA fue suministrada vía oral diariamente a partir de la primer dosis de DX y la última dosis fue suministrada 5 días después de la segunda dosis de CD (ver esquema).

Como puede observarse en la **Figura 20** los ratones tratados solo con ATRA exhibieron una modesta reducción del crecimiento tumoral pero no mostraron una mayor sobrevida que los controles. Por otro lado, la terapia de DX+CDs+ATRA resultó en una significativa reducción del crecimiento tumoral y en una mayor sobrevida respecto de los controles. Sin embargo no hubo grandes diferencias con la terapia con DX+CDs (**Figura 20A y B**), salvo una ligera reducción en el crecimiento tumoral entre los días 25 y 40.



**Figura 20: Inmunoterapia combinada de DX+CD complementando con ATRA.** Ratones portadores de tumor MCC chico (aproximadamente 300 mm<sup>3</sup> volumen tumoral) recibieron DX y tres días después fueron inoculados con CD estimuladas con lisado de tumor MCC ( $3 \times 10^5$ ). Luego de 7 días post inoculación de DX, el esquema de terapia fue repetido. Diariamente durante 15 días a partir de la primera dosis de DX (1º) se suministró la droga ATRA vía oral. Los grupos controles fueron: ratones con tumor MCC sin tratar (control, n=11), ratones con tumor MCC tratados con DX y CD (DX+DC, n=6) y ratones con tumor a los cuales se les suministro solamente la droga ATRA. A todos los grupos se le evaluó el crecimiento tumoral en el transcurso de los días (**A**), así como también la sobrevida (**B**). Evaluación estadística en (A): DX+CD vs DX+CD+ATRA: al día 40: a:  $p < 0.01$ . DX+CD+ATRA vs Control y DX+CD+ATRA vs. ATRA a partir del día 28 hasta finalizar el experimento la diferencia fue significativa: \*  $p < 0,01$ ; \*\*

*p<0.001. Evaluación estadística en (B): tanto DX+CD como DX+CD+ATRA mostraron ser significativamente diferentes con respecto al control y ATRA (p<0.0001 y p<0.001 respectivamente). La primera flecha señala el momento de la inoculación de DX, y la segunda flecha señala que tres días después fueron inoculadas las CDs. El ATRA fue suministrado vía oral entre los días 18 (al momento de la 1° dosis de DX) y hasta el día 33 (tres días después de la 2° dosis de CDs).*

### **Conclusión parcial**

La estrategia de dos o tres pasos de inmunoterapia antitumoral presentada aquí demuestra que es necesario eliminar o disminuir el estado de inmunosupresión asociado al crecimiento tumoral (eclipse inmunológico) como condición previa para que un procedimiento inmunoterapéutico pueda ser eficaz. En este capítulo se demostró que el sistema inmune sería capaz de inhibir el crecimiento tanto de tumores establecidos como de células tumorales residuales después de la extirpación de grandes tumores, pero sólo cuando el eclipse inmunológico hubiera sido previamente eliminado o disminuido. Se mostró también que en algunos casos la inmunoterapia puede ser más efectiva que la quimioterapia convencional para tratar tumores sólidos. Por último el hecho de que aún cuando las estrategias utilizadas por nosotros aumentaron significativamente la supervivencia de los ratones portadores de tumor, éstos tumores no regresaron y los individuos terminaron muriendo a causa de aquéllos. Esto podría significar que aún utilizando diversas estrategias (DX, linfocitos naïve o ATRA) para restablecer la competencia inmunológica no hemos podido alcanzar completamente este objetivo y que muchas condiciones inmunosupresoras todavía persisten en animales portadores de tumor.

# **DISCUSSION**

## **Discusión**

En 1957, Prehn y Main iniciaron su clásico trabajo en el Journal of the National Cancer Institute (Prehn and Main 1957), con la siguiente frase: “La historia de los intentos de inmunización contra el cáncer es una larga historia de frustraciones”. Sin embargo, a pesar del desaliento acumulado desde las primeras décadas del siglo XX hasta 1957, Prehn y Main fueron capaces de demostrar, que ratones a los que se implantaba y luego se extirpaba un fibrosarcoma inducido por el carcinógeno químico metilcolantreno (técnica de vacunación conocida como implantación y extirpación de tumor) quedaban inmunes a ese tumor, es decir que posteriores desafíos con células de ese tumor eran incapaces de crecer en esos ratones, mientras que lo hacían progresivamente en ratones no vacunados. Esto significaba que era posible vacunar al menos contra algunos tipos de tumores malignos. Desde entonces, se desarrollaron numerosos intentos de inmunización para prevenir el crecimiento de implantes de diversos tumores experimentales, así como también ensayos *in vitro* para evaluar las propiedades antigénicas de células malignas de animales y seres humanos (Janeway CA 2003; Arbyn and Dillner 2007; Sioud 2007). Los promisorios resultados obtenidos alentaron a investigadores y médicos a aplicar esquemas inmunológicos no ya de manera preventiva sino terapéutica para tratar tumores establecidos en animales y seres humanos, lo que había sido el sueño de los pioneros de la inmunología tumoral a principio del siglo XX. Sin embargo, más de 50 años después de los hallazgos de Prehn y Main, nosotros podemos citar la misma frase inicial de su célebre trabajo, pero ahora aplicada a los procedimientos inmunoterapéuticos contra el cáncer: la historia de los intentos de inmunoterapia contra los ensayos clínicos es una larga historia de frustraciones.

El fracaso de los diferentes esquemas de inmunoterapia contra el cáncer observado en la clínica podría atribuirse, a primera vista, a una débil o indetectable antigenicidad de la mayoría de los tumores humanos, sobre la base de que los tumores espontáneos de ratones y ratas (que presumiblemente serían los más parecidos a los tumores humanos) tienen, en general, una significativamente

menor inmunogenicidad que los tumores experimentales inducidos en animales por dosis masivas de carcinógenos químicos o virales (Hewitt, Blake et al. 1976; Ruggiero, Bustuoabad et al. 1985; Franco, Bustuoabad et al. 1996; Speiser, Miranda et al. 1997).

Sin embargo, aunque una débil o indetectable inmunogenicidad podría ser una explicación para los fracasos de la inmunoterapia contra el cáncer humano, otras causas pueden jugar también un papel importante (Willimsky and Blankenstein 2005), ya que en animales de experimentación, las estrategias de vacunación terapéuticas han demostrado ser ineficaces no sólo contra tumores de baja o indetectable inmunogenicidad sino también contra tumores inmunogénicos cuando éstos se encuentran ya establecidos. Similarmente, la inmunoterapia tampoco ha resultado eficaz, en general, para tratar tumores renales y melanomas humanos que se consideran dos de los cánceres más inmunogénicos en el hombre (Cranmer, Trevor et al. 2004; Mocellin, Mandruzzato et al. 2004; Chiarella, Vulcano et al. 2007; Vieweg, Su et al. 2007).

En esta Tesis hemos estudiado un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno (llamado MCC) similar a aquellos utilizados por Prehn y Main en su trabajo de 1957. Nosotros fuimos capaces de demostrar que los mismos procedimientos inmunológicos que prevenían exitosamente el crecimiento de implantes de células de ese tumor (implantación y extirpación del tumor, dosis subletales, vacunación con células tumorales irradiadas o muertas por calor, inoculación de CDs estimuladas con extracto acelar de MCC o células MCC irradiadas o transferencia pasiva de linfocitos inmunes) fueron completamente ineficaces para erradicar, inhibir, o aún retardar el crecimiento de las mismas células tumorales cuando el tumor superaba los 500 mm<sup>3</sup>. Los fracasos de las técnicas inmunológicas para obtener aún un mínimo efecto contra tumores establecidos se correlacionaron en nuestro modelo con la aparición de un estado de inmunodepresión contra los antígenos tumorales conocido históricamente como “eclipse inmunológico”. En rigor, la refractariedad a cualquier intento de inmunoterapia fue observada cuando el tratamiento fue iniciado aún antes del



comienzo del eclipse (cuando el tumor tenía alrededor de  $100 \text{ mm}^3$ ). Sin embargo esta discrepancia puede ser más aparente que real. En efecto, los ratones portadores de tumor pueden no estar en estado de eclipse cuando la terapia es iniciada, pero este estado podría ser alcanzado antes de que el tratamiento inmunológico tuviera una chance para generar una fuerte respuesta inmune antitumoral. Alternativamente, condiciones inmunosupresivas que podrían operar en el sitio del crecimiento tumoral podrían preceder al establecimiento de una inmunosupresión antitumoral sistémica (Mansoor, Gilham et al. 2005; Adler 2007). Durante el estado de eclipse, todos los marcadores inmunológicos de una respuesta antitumoral, que se encuentran elevados durante el crecimiento temprano del tumor, virtualmente desaparecen cuando éste supera los  $500 \text{ mm}^3$ . Sin embargo, la mera ausencia de una respuesta inmune no es el único o aún el mayor problema, porque si éste fuere el caso, la falta de competencia inmunológica podría ser solucionada con una simple transferencia pasiva de inmunidad. El principal problema sugerido por experimentos de parabiosis entre ratones inmunes y portadores de tumor en estado de eclipse, radica en la aparición de un mecanismo que activamente suprime la respuesta inmune antitumoral montada en el organismo contra el tumor. Esto podría explicar la refractariedad de los tumores establecidos tanto en animales como en seres humanos hacia las terapias inmunológicas, porque cualquier mecanismo presente en un individuo portador de tumor, que suprime activamente su propia respuesta inmune antitumoral, es lógico que también esterilice cualquier intento de inmunoterapia antitumoral pasiva o activa.

Se han reportados diferentes mecanismos asociados etiológicamente con el eclipse inmunológico, todos los cuales podrían limitar o impedir la eficacia de una inmunoterapia antitumoral. Algunos de estos mecanismos pueden estar asociados directamente a la célula tumoral, incluyendo la pérdida de expresión de MHC clase-I, la expresión aumentada de VCAM-1 (molécula de adhesión 1 de las células vasculares), IDO (enzima tolerogénica indeoleamina 2,3-dioxigenasa) y de STAT3 activado (factor de traducción de señales y activador de la transcripción)

(Wang, Niu et al. 2004; Nefedova, Cheng et al. 2005) en las células tumorales y en las células del estroma o la producción de factores potencialmente inhibitorios de la respuesta inmune como IL-10, TGF- $\beta$  o galectina-1 (Waldman 2003; Rubinstein, Alvarez et al. 2004; Zheng, Koropatnick et al. 2006; Lin, Lu et al. 2007). Otros mecanismos estarían asociados con una serie de fenómenos inmunoregulatorios negativos, entre los cuales pueden incluirse la expresión anómala de la molécula CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4*, molécula inhibitoria que compite con CD28 por la unión de las moléculas co-estimuladoras B7.1 y B7.2) o PD-1 (*programmed death-1*) en linfocitos T citotóxicos o la expresión aumentada de células Treg (CD4/CD25/Foxp3), NKT (Waldman 2003), o MDSC (células mieloides inmaduras supresoras (Gr1/CD11b) (Gabrilovich and Nagaraj 2009). Sin embargo, aunque la disminución o eliminación de estos mecanismos inmunosupresivos fueron efectivos para prevenir el crecimiento de un implante tumoral o para el tratamiento de tumores incipientes, hasta hoy, de acuerdo a nuestro conocimiento, no ha sido eficaz contra tumores una vez que estos han crecido más allá de un tamaño crítico (Orentas, Kohler et al. 2006; Yu, Rowley et al. 2006), que en nuestro modelo se ubica alrededor de los 500 mm<sup>3</sup>.

En nuestro modelo, el inicio del eclipse inmunológico coincidió con el comienzo de una condición de inflamación sistémica, cuya intensidad fue proporcional al tamaño tumoral. Esta inflamación sistémica fue caracterizada por un alto número de PMN y MDSC activados (liberadores de grandes cantidades de especies reactivas del oxígeno), tanto en circulación como en bazo y por un aumento en la concentración sérica de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 y de las proteínas de fase aguda CRP (proteína C reactiva) y SAA (proteína A Amiloide del suero). Aunque un ambiente inflamatorio es necesario para que se desarrolle una respuesta inmune eficiente (Nathan 2002), bajo ciertas condiciones, por ejemplo, cuando la inflamación llega a ser sistémica y/o crónica, pueden inducirse diferentes efectos nocivos sobre el sistema inmune, ya sea en forma directa, por la propia condición inflamatoria anómala, o en forma indirecta, a través de mecanismos anti-inflamatorios compensadores (Ward 1975; Nathan 2002;

Muller and Scherle 2006; Nelson and Ganss 2006). En efecto, durante la progresión de tumores en animales y seres humanos, la acumulación de MDSC, tanto en sangre como en bazo se ha visto correlacionada con una disminución en el número de células dendríticas (CDs), con la ausencia de una respuesta antitumoral mediada por células T y con la acumulación de macrófagos supresores asociados a tumor (TAM) (Pekarek, Starr et al. 1995; Bronte, Wang et al. 1998; Bronte, Chappell et al. 1999; Salvadori, Martinelli et al. 2000; Di Carlo, Forni et al. 2001; Kuang, Wu et al. 2007). En esta Tesis hemos visto que factores derivados del tumor afectan la diferenciación de precursores de médula ósea lo cual se tradujo en una acumulación de MDSC y en una disminución de CDs. Estos factores fueron obtenidos *in vitro* de medio condicionado de células tumorales e *in vivo* de suero de ratones portadores de tumor. La ausencia de diferenciación de las CDs podría afectar significativamente la respuesta inmune antitumoral mediada por células T. Trabajos anteriores han sugerido que la falta de diferenciación de los precursores de medula ósea parece estar asociada a la activación de la cascada de señalización de Jak/STAT3, afirmación que evaluaremos en futuros experimentos. Del mismo modo, la sobreproducción de algunas citoquinas pro-inflamatorias estarían implicadas en una amplia gama de condiciones patológicas (Watson 2002) que podrían afectar el sistema inmune. En nuestro modelo, la proliferación *in vitro* de células esplénicas inmunes al tumor MCC, incubadas con antígenos tumorales, fue inhibida por el co-cultivo con sueros de ratones portadores de tumor MCC de más de 500 mm<sup>3</sup>, que exhibían una elevada concentración de citoquinas pro-inflamatorias y proteínas de fase aguda, pero no con suero normal o con sueros de ratones portadores de tumor de menos de 500 mm<sup>3</sup>. Las consideraciones anteriores sugieren que diversos factores celulares y humorales, asociados directa o indirectamente a la condición inflamatoria sistémica, podrían contribuir al establecimiento y al mantenimiento del eclipse inmunológico.

El tratamiento de ratones portadores de tumor con una sola dosis baja (0.75 mg/kg) del corticoide sintético dexametasona (DX), redujo significativamente el número de células MDSC y PMN tanto en circulación como en bazo, así como

también la concentración sérica de algunas citoquinas pro-inflamatorias circulantes y proteínas de fase aguda. Este efecto anti-inflamatorio mediado por DX, que dependería, al menos en parte, de la inducción de fosfatasa I (Abraham, Lawrence et al. 2006), se vio acompañado con un aumento en el número de células dendríticas y linfocitos, y con la pérdida de actividad inhibitoria del suero sobre la proliferación de células esplénicas inmunes incubadas con antígenos tumorales. Además, los efectos anti-inflamatorios mediados por DX se correlacionaron con la reversión del eclipse inmunológico, hecho que fue evidenciado por la restauración de la inmunidad concomitante específica (dependiente de células T) y de la capacidad de las células del bazo de transferir actividad anti-tumoral a ratones *nāive* y también por la recuperación de marcadores de transducción de señales (p56<sup>lck</sup>) asociados a la activación de una respuesta inmune mediada por células T.

A primera vista, la restauración de la capacidad inmune antitumoral por DX parece paradójica puesto que los corticoides se han asociado generalmente a inmunosupresión. Sin embargo, esto último se ha observado al usar dosis farmacológicas altas de corticoides ( $\geq$  de 3 mg/kg), mientras que efectos inmunoestimulantes han sido observados usando dosis menores (Wilckens and De Rijk 1997). Evidencias recientes sugieren que el efecto inmunoestimulador producido por DX podría estar generado, al menos en parte, a través de la expresión aumentada de GITR (receptor de la familia de TNF inducido por glucocorticoides) y de la activación de la vía de señalización asociado a GITR en las células T. En efecto, luego del tratamiento con un agonista específico de GITR se observó una activación de células T en respuesta a antígenos tumorales o patógenos virales, que no había sido observada en ausencia de la activación de GITR. Esto sugiere que la interacción GITR-GITR ligando co-estimula a las células T y permite su escape de mecanismos inmunosupresivos (Ko, Yamazaki et al. 2005; Shevach and Stephens 2006). Otros autores sugieren que los glucocorticoides podrían estimular la respuesta inmune mediante el aumento de expresión del receptor tipo toll-2 (Imasato, Desbois-Mouthon et al. 2002), pero todavía hay mucho por aprender de este mecanismo.

Otros dos tratamientos utilizando anti-inflamatorios no esteroideos, como el receptor dimérico de TNF- $\alpha$  o la indometacina, también revierten parcialmente el eclipse inmunológico, aunque los resultados no fueron tan efectivos como los observados con DX, sugiriendo que DX tendría un mayor potencial para revertir la tolerancia inmune asociada al crecimiento tumoral.

En conjunto, los resultados mencionados anteriormente sugieren que la pérdida de la inmunidad anti-tumoral que ocurre luego de que el tumor crece más allá de los 500 mm<sup>3</sup> no es un evento irreversible y que la inflamación sistémica asociada a la progresión tumoral encubriría la existencia de células T anti-tumorales. Es posible que el aumento de p56<sup>lck</sup> observado en linfocitos T luego del tratamiento con DX se debiera a la muerte de células T anormales (que expresaban un bajo nivel de p56<sup>lck</sup>) y a su posterior reemplazo por células T normales (con un alto nivel de p56<sup>lck</sup>). Sin embargo, la rapidez de la respuesta sugiere que las mismas células que expresaban un bajo nivel de p56<sup>lck</sup> recuperaron el nivel normal después del tratamiento con DX.

Ahora bien, aunque la reversión del eclipse inmunológico mediante tratamientos anti-inflamatorios fue un logro alentador, no fue suficiente para inhibir por sí sólo el crecimiento del tumor primario. Con el objetivo de atacar a un tumor primario durante el estado de eclipse inmunológico, utilizamos una estrategia de dos pasos, que consistió en inocular, en primer lugar, DX para revertir el eclipse y tres días más tarde, CDs estimuladas con antígenos tumorales, como refuerzo de la respuesta inmune anti-tumoral (DX+CDs).

Cuando ratones portadores de tumores de 600 mm<sup>3</sup> aproximadamente, recibieron este tratamiento combinado, se observó un significativo efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral. Durante los primeros 7-10 días después de la inoculación con CDs, los tumores virtualmente detuvieron su crecimiento, y más tarde, cuando éste fue reiniciado, fue significativamente más lento que el observado en ratones controles que no recibieron ningún tratamiento o que recibieron sólo DX, o sólo CDs (maduradas con antígeno tumoral). Esto se vio reflejado en la sobrevida de

los ratones tratados con DX+CDs que casi duplicó la supervivencia de los controles. De la misma manera, el tratamiento combinado con DX+CDs fue capaz de prevenir parcialmente las recidivas tumorales locales observadas después de la operación de tumores de gran tamaño.

Si bien la terapia en dos pasos aumentó la supervivencia de los animales portadores de tumor en estado de eclipse inmunológico, no pudo generar la regresión de ninguno de ellos. Por lo tanto decidimos agregar a esta terapia una transferencia adoptiva de linfocitos *náïve*, ya que como mencionamos anteriormente, los tumores pueden generar diversos mecanismos para tolerizar a las células T. Esta terapia que incluye tres pasos (DX+CDs+Linfocitos) retardó el crecimiento inicial de los tumores respecto de los tratados con DX+CDs, aunque esto no se tradujo en una mayor supervivencia.

Asimismo, buscando nuevos perfeccionamientos terapéuticos, agregamos a la terapia de dos pasos el uso de ATRA (ácido *all-trans* retinoico), que permite la diferenciación de MDSC a CD8 y macrófagos, eliminando un potencial elemento supresor (Kusmartsev and Gabrilovich 2006). Esta terapia (DX+CDs+ATRA), al igual que la terapia con DX+CDs+Linfocitos, retardó inicialmente el crecimiento tumoral respecto de los ratones tratados con DX+CDs, pero tampoco mejoró la supervivencia.

Las estrategias de inmunoterapia contra el tumor presentadas en esta Tesis demuestran que es necesario eliminar o disminuir el eclipse inmunológico como condición previa para permitir que cualquier procedimiento de inmunización sea efectiva. Esto puede explicar por qué la inmunoterapia sola no es generalmente eficaz en casos clínicos incluso contra un número relativamente pequeño de células tumorales residuales que hayan quedado en el organismo después de que el tumor fuera tratado con cirugía, radiación o quimioterapia. Por otra parte, el uso de terapias inmunológicas sin eliminar el eclipse podría acelerar bajo ciertas circunstancias el crecimiento del tumor según las predicciones de la teoría inmunostimulatoria propuesta por Prehn y luego por otros autores (Prehn 1972;

Prehn 1993; Dunn, Bruce et al. 2002; Dunn, Old et al. 2004; Prehn 2007). En efecto, en nuestro laboratorio, cuando una estrategia de vacunación basada en CDs fue aplicada como terapia única para tratar tumores establecidos, se observó un estímulo leve pero significativo del crecimiento tumoral, a pesar de que la misma estrategia de vacunación es muy eficiente para prevenir el crecimiento de implantes tumorales o retrasar el crecimiento de tumores incipientes (Chiarella, Reffo et al. 2008; Chiarella, Vulcano et al. 2008).

Si bien la inmunoterapia tiene la ventaja teórica de la especificidad y de una toxicidad baja o nula, se piensa generalmente que es menos eficaz que la quimioterapia para tratar tumores establecidos. Sin embargo, esta comparación se ha hecho habitualmente entre la quimioterapia y los procedimientos inmunológicos aplicados en solitario, es decir, sin previa eliminación del eclipse inmunológico. En esta Tesis hemos comparado el tratamiento estándar de quimioterapia con vincristina (Meyvisch, Storme et al. 1983; Teicher, Holden et al. 1990) y distintos tratamientos inmunoterapéuticos sobre un fibrosarcoma murino. Nuestros resultados demuestran que, aunque la quimioterapia retardó el crecimiento del fibrosarcoma murino MCC y prolongó la supervivencia de los ratones con tumores con respecto a ratones no tratados o tratados solo con CDs, estos efectos inhibitorios fueron perceptiblemente menos importantes que aquellos alcanzados por los protocolos de inmunoterapia en dos o tres pasos utilizados en nuestro trabajo. Esto significa que en nuestro modelo, estos procedimientos inmunoterapéuticos fueron más eficientes que la quimioterapia convencional.

En conclusión, e incluso con las limitaciones que tienen los modelos murinos para predecir la eficacia de cualquier terapia inmunológica o no inmunológica sobre tumores humanos (Talmadge, Singh et al. 2007), algunas conclusiones interesantes pueden ser esbozadas:

- El sistema inmune sería capaz de inhibir tanto el crecimiento de tumores establecidos como de células tumorales residuales después de la extirpación de grandes tumores establecidos, pero sólo cuando el eclipse inmunológico haya sido previamente eliminado ;
- En nuestro modelo, el eclipse inmunológico parecería estar asociado, directa o indirectamente, a algunos componentes celulares y humorales de la condición inflamatoria sistémica exhibida en los ratones portadores de tumores establecidos (más de 500 mm<sup>3</sup>);
- Los protocolos de inmunoterapia fueron aplicados sistémicamente, evitando las limitaciones de una terapia intra-tumoral que puede ser impráctica en muchos casos clínicos;
- En algunos casos, la terapia inmune contra un tumor sólido puede ser más eficaz que la quimioterapia convencional.
- Aunque la inmunoterapia en 2 o 3 pasos aplicada contra el tumor MCC prolongó significativamente la sobrevida de los ratones portadores de ese tumor, no consiguió su erradicación definitiva. Ello no significa que nuestro modelo conceptual sea incorrecto. Por el contrario nosotros creemos que este modelo es adecuado y que mejorando las estrategias para eliminar el eclipse inmunológico (lo cual se basará en una comprensión más profunda del eclipse) permitirá conseguir el objetivo de curar al organismo de un tumor establecido.



# **BIBLIOGRAFIA**

## **Bibliografía**

- Abbas AK, and Lichtman A. (2004). "Inmunología Molecular y Celular." Elsevier **1**(5).
- Abraham, S. M., T. Lawrence, et al. (2006). "Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1." J Exp Med **203**(8): 1883-9.
- Adler, A. J. (2007). "Mechanisms of T cell tolerance and suppression in cancer mediated by tumor-associated antigens and hormones." Curr Cancer Drug Targets **7**(1): 3-14.
- Adler, H. S. and K. Steinbrink (2007). "Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe!" Eur J Dermatol **17**(6): 476-91.
- Agius, L. (2005). "Paracrine transformation to autocrine autonomy in tumor cell proliferation and spread. Is the neoplastic blood supply a functional determinant of clonality in inducing biologic tumor progressiveness? ." Int. J Mol Med Adv Sciences **1**: 317-323
  
- Almand, B., J. I. Clark, et al. (2001). "Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer." J Immunol **166**(1): 678-89.
- Arbyn, M. and J. Dillner (2007). "Review of current knowledge on HPV vaccination: an appendix to the European Guidelines for Quality Assurance in Cervical Cancer Screening." J Clin Virol **38**(3): 189-97.
- Ardavin, C., L. Wu, et al. (1993). "Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population." Nature **362**(6422): 761-3.
- Arrieta, O., N. Hernandez-Pedro, et al. "Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer." Neurology **77**(10): 987-95.
- Arrieta, O., C. Villarreal-Garza, et al. "High response of second-line chemotherapy with pemetrexed or gemcitabine combined with carboplatin in patients with non-small-cell lung cancer experiencing progression following 6 months after concluding platinum-based chemotherapy." Med Oncol **28**(1): 300-6.
- Asselin-Paturel, C., A. Boonstra, et al. (2001). "Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology." Nat Immunol **2**(12): 1144-50.
- Attia, M. A. and D. W. Weiss (1966). "Immunology of spontaneous mammary carcinomas in mice. V. Acquired tumor resistance and enhancement in strain A mice infected with mammary tumor virus." Cancer Res **26**(8): 1787-800.
- Badovinac, V. P., K. A. Messingham, et al. (2005). "Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination." Nat Med **11**(7): 748-56.
- Bailar, J. C., 3rd and H. L. Gornik (1997). "Trends in cancer mortality: perspectives from Italy and the United States." Med Lav **88**(4): 274-86.
- Ballestrero, A., D. Boy, et al. (2008). "Immunotherapy with dendritic cells for cancer." Adv Drug Deliv Rev **60**(2): 173-83.
- Bancroft, G. J., R. D. Schreiber, et al. (1991). "Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse." Immunol Rev **124**: 5-24.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.

- Banchereau, J., B. Schuler-Thurner, et al. (2001). "Dendritic cells as vectors for therapy." Cell **106**(3): 271-4.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Bauman, S. K., G. B. Huffnagle, et al. (2003). "Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response." Infect Immun **71**(1): 68-74.
- Belkaid, Y. (2008). "Role of Foxp3-positive regulatory T cells during infection." Eur J Immunol **38**(4): 918-21.
- Benson, M. J., K. Pino-Lagos, et al. (2007). "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation." J Exp Med **204**(8): 1765-74.
- Berard, F., P. Blanco, et al. (2000). "Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells." J Exp Med **192**(11): 1535-44.
- Braathen, L. R. and E. Thorsby (1980). "Studies on human epidermal Langerhans cells. I. Allo-activating and antigen-presenting capacity." Scand J Immunol **11**(4): 401-8.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brocker, T., M. Riedinger, et al. (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-50.
- Bromberg, J. F., C. M. Horvath, et al. (1996). "Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7673-8.
- Bronte, V., D. B. Chappell, et al. (1999). "Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation." J Immunol **162**(10): 5728-37.
- Bronte, V., M. Wang, et al. (1998). "Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells." J Immunol **161**(10): 5313-20.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Burnet, F. M. (1957). "Biology and medicine." Med J Aust **44**(13): 406-10.
- Burnet, F. M. (1959). "Biological approach to carcinogenesis." Acta Unio Int Contra Cancrum **15**(1): 31-4.
- Bustuoabad, O. D., R. A. Ruggiero, et al. (2005). "Tumor transition zone: a putative new morphological and functional hallmark of tumor aggressiveness." Oncol Res **15**(3): 169-82.
- Cairns (1976). "El problema del Cáncer." Investigación y Ciencia **1**(88).
- Cairos (1978). "Cancer: Science and Society." WS Freeman & Co, San Francisco, USA.

- Carbone, M., G. Klein, et al. (2004). "Modern criteria to establish human cancer etiology." Cancer Res **64**(15): 5518-24.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Cimini, A. and R. Ippoliti "Innovative Therapies against Human Glioblastoma Multiforme." ISRN Oncol **2011**: 787490.
- Coligan J, K. A., Margulies D, Shevach E, Warren S (1994). "In vitro assays for mouse lymphocyte function." Current protocols in immunology, National Institute of Health, USA. Wiley, New York: 3.20:3–3.20:4.
- Coughlin, C. M., K. E. Salhany, et al. (1998). "Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis." Immunity **9**(1): 25-34.
- Cranmer, L. D., K. T. Trevor, et al. (2004). "Clinical applications of dendritic cell vaccination in the treatment of cancer." Cancer Immunol Immunother **53**(4): 275-306.
- Croft, M., D. D. Duncan, et al. (1992). "Response of naive antigen-specific CD4+ T cells in vitro: characteristics and antigen-presenting cell requirements." J Exp Med **176**(5): 1431-7.
- Curiel, T. J., G. Coukos, et al. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." Nat Med **10**(9): 942-9.
- Chiarella, P., V. Reffo, et al. (2008). "Therapeutic anti-tumor vaccines: from tumor inhibition to enhancement." Clin Med Oncol **2**: 237-45.
- Chiarella, P., M. Vulcano, et al. (2008). "Anti-inflammatory pretreatment enables an efficient dendritic cell-based immunotherapy against established tumors." Cancer Immunol Immunother **57**(5): 701-18.
- Chiarella, P., M. Vulcano, et al. (2007). "[Reversion of the immunological eclipse and therapeutic vaccination against cancer in an experimental model]." Medicina (B Aires) **67**(1): 44-8.
- Dhodapkar, M. V., J. Krasovsky, et al. (2002). "T cells from the tumor microenvironment of patients with progressive myeloma can generate strong, tumor-specific cytolytic responses to autologous, tumor-loaded dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(20): 13009-13.
- Di Carlo, E., G. Forni, et al. (2001). "The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions." Blood **97**(2): 339-45.
- Dubsky, P., H. Ueno, et al. (2005). "Human dendritic cell subsets for vaccination." J Clin Immunol **25**(6): 551-72.
- Dunn, G. P., A. T. Bruce, et al. (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." Nat Immunol **3**(11): 991-8.
- Dunn, G. P., L. J. Old, et al. (2004). "The three Es of cancer immunoediting." Annu Rev Immunol **22**: 329-60.
- Egen, J. G., M. S. Kuhns, et al. (2002). "CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy." Nat Immunol **3**(7): 611-8.
- Ehrlich (1909). "Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. ." Ned Tijdschr Geneeskde **5**: 73–290.
- Elkord, E., P. E. Williams, et al. (2005). "Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells." Immunology **114**(2): 204-12.

- Ewing, J. (1930). "The Problems of Melanoma." Br Med J **2**(3646): 852-6.
- Fainboim, L. G., J (2005). "Introduccion a la inmunologia humana 5<sup>a</sup> ed." Medica Panamericana, Buenos Aires.
- Fallarino, F., U. Grohmann, et al. (2006). "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 **176**(11): 6752-61.
- Finn, O. J. (2004). "Tumor immunology at the service of cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **16**(2): 127-9.
- Finn, O. J. (2008). "Cancer immunology." N Engl J Med **358**(25): 2704-15.
- Foss, F. M. (2002). "Immunologic mechanisms of antitumor activity." Semin Oncol **29**(3 Suppl 7): 5-11.
- Franco, M., O. D. Bustuoabad, et al. (1996). "A serum-mediated mechanism for concomitant resistance shared by immunogenic and non-immunogenic murine tumours." Br J Cancer **74**(2): 178-86.
- Franco, M., O. D. Bustuoabad, et al. (2000). "Two different types of concomitant resistance induced by murine tumors: morphological aspects and intrinsic mechanisms." Oncol Rep **7**(5): 1053-63.
- Fujii, S., K. Fujimoto, et al. (1999). "Presentation of tumor antigens by phagocytic dendritic cell clusters generated from human CD34+ hematopoietic progenitor cells: induction of autologous cytotoxic T lymphocytes against leukemic cells in acute myelogenous leukemia patients." Cancer Res **59**(9): 2150-8.
- Fukuda, K., Y. Saikawa, et al. "Antitumor effect of cetuximab in combination with S-1 in EGFR-amplified." Int J Oncol.
- Gabrilovich, D. I. and S. Nagaraj (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." Nat Rev Immunol **9**(3): 162-74.
- Gabrilovich, D. I., M. P. Velders, et al. (2001). "Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells." J Immunol **166**(9): 5398-406.
- Gallucci, S. and P. Matzinger (2001). "Danger signals: SOS to the immune system." Curr Opin Immunol **13**(1): 114-9.
- Geissmann, F., P. Revy, et al. (1999). "TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells." J Immunol **162**(8): 4567-75.
- Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, et al. (2002). "Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells." J Exp Med **195**(3): 327-33.
- Ghiringhelli, F., N. Larmonier, et al. (2004). "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): 336-44.
- Ghiringhelli, F., P. E. Puig, et al. (2005). "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation." J Exp Med **202**(7): 919-29.
- Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, et al. (2003). "Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4+ and CD8+ T cell immunity against B16 melanoma." J Immunol **171**(11): 5940-7.
- Gotay, C. and J. Dunn "Adherence to long-term adjuvant hormonal therapy for breast cancer." Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res **11**(6): 709-15.
- Greenwald, R. J., G. J. Freeman, et al. (2005). "The B7 family revisited." Annu Rev Immunol **23**: 515-48.

- Guernonprez, P., J. Valladeau, et al. (2002). "Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells." Annu Rev Immunol **20**: 621-67.
- Hahn, W. C. and R. A. Weinberg (2002). "Rules for making human tumor cells." N Engl J Med **347**(20): 1593-603.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Heath, W. R. and F. R. Carbone (2001). "Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity." Annu Rev Immunol **19**: 47-64.
- Hellstrom, I. and K. E. Hellstrom (1969). "Studies on cellular immunity and its serum mediated inhibition in Moloney-virus-induced mouse sarcomas." Int J Cancer **4**(5): 587-600.
- Hengesbach, L. M. and K. A. Hoag (2004). "Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice." J Nutr **134**(10): 2653-9.
- Hewitt, H. B., E. R. Blake, et al. (1976). "A critique of the evidence for active host defence against cancer, based on personal studies of 27 murine tumours of spontaneous origin." Br J Cancer **33**(3): 241-59.
- Heystek, H. C., B. den Drijver, et al. (2003). "Type I IFNs differentially modulate IL-12p70 production by human dendritic cells depending on the maturation status of the cells and counteract IFN-gamma-mediated signaling." Clin Immunol **107**(3): 170-7.
- Hodge-Dufour, J., P. W. Noble, et al. (1997). "Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages." J Immunol **159**(5): 2492-500.
- Hoffmann, T. K., N. Meidenbauer, et al. (2000). "Generation of tumor-specific T-lymphocytes by cross-priming with human dendritic cells ingesting apoptotic tumor cells." Cancer Res **60**(13): 3542-9.
- Horner MJ, Ries LAG, et al. (2009). "SEER Cancer Statistics Review 1975-2006." National Cancer Institute, Bethesda
- Imasato, A., C. Desbois-Mouthon, et al. (2002). "Inhibition of p38 MAPK by glucocorticoids via induction of MAPK phosphatase-1 enhances nontypeable Haemophilus influenzae-induced expression of toll-like receptor 2." J Biol Chem **277**(49): 47444-50.
- Inaba, K., M. Inaba, et al. (1992). "Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." J Exp Med **176**(6): 1693-702.
- Inaba, K., J. P. Metlay, et al. (1990). "Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ." J Exp Med **172**(2): 631-40.
- Inaba, K., R. M. Steinman, et al. (1983). "Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(19): 6041-5.
- Janeway, C. A., Jr. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.
- Janeway CA, T. P., Walport M (2003). Inmunobiología.
- Janeway C (2005). "Immunobiology: the immune system in health and disease, 6th edn." Garland Science.

- Jenne, L., J. F. Arrighi, et al. (2000). "Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis." Cancer Res **60**(16): 4446-52.
- Kadowaki, N., S. Antonenko, et al. (2000). "Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity." J Exp Med **192**(2): 219-26.
- Karasuyama, H. and F. Melchers (1988). "Establishment of mouse cell lines which constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5, using modified cDNA expression vectors." Eur J Immunol **18**(1): 97-104.
- Khong, H. T. and N. P. Restifo (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." Nat Immunol **3**(11): 999-1005.
- Klein, G., H. O. Sjogren, et al. (1960). "Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host." Cancer Res **20**: 1561-72.
- Ko, K., S. Yamazaki, et al. (2005). "Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells." J Exp Med **202**(7): 885-91.
- Koch, F., U. Stanzl, et al. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." J Exp Med **184**(2): 741-6.
- Koide, S. L., K. Inaba, et al. (1987). "Interleukin 1 enhances T-dependent immune responses by amplifying the function of dendritic cells." J Exp Med **165**(2): 515-30.
- Kotera, Y., K. Shimizu, et al. (2001). "Comparative analysis of necrotic and apoptotic tumor cells as a source of antigen(s) in dendritic cell-based immunization." Cancer Res **61**(22): 8105-9.
- Kuang, D. M., Y. Wu, et al. (2007). "Tumor-derived hyaluronan induces formation of immunosuppressive macrophages through transient early activation of monocytes." Blood **110**(2): 587-95.
- Kumar, A., M. Commane, et al. (1997). "Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases." Science **278**(5343): 1630-2.
- Kusmartsev, S., F. Cheng, et al. (2003). "All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination." Cancer Res **63**(15): 4441-9.
- Kusmartsev, S. and D. I. Gabrilovich (2006). "Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer." Cancer Immunol Immunother **55**(3): 237-45.
- Lajer, C. B. and C. von Buchwald "The role of human papillomavirus in head and neck cancer." APMIS **118**(6-7): 510-9.
- Larsson, M., J. F. Fonteneau, et al. (2002). "Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus." AIDS **16**(10): 1319-29.
- Lesterhuis, W. J., E. H. Aarntzen, et al. (2008). "Dendritic cell vaccines in melanoma: from promise to proof?" Crit Rev Oncol Hematol **66**(2): 118-34.
- Levin, D., S. Constant, et al. (1993). "Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo." J Immunol **151**(12): 6742-50.
- Lewkowich, I. P., N. S. Herman, et al. (2005). "CD4+CD25+ T cells protect against experimentally induced asthma and alter pulmonary dendritic cell phenotype and function." J Exp Med **202**(11): 1549-61.

- Li, Z., A. Menoret, et al. (2002). "Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation." Curr Opin Immunol **14**(1): 45-51.
- Lin, K. Y., D. Lu, et al. (2007). "Ectopic expression of vascular cell adhesion molecule-1 as a new mechanism for tumor immune evasion." Cancer Res **67**(4): 1832-41.
- Liyanage, U. K., T. T. Moore, et al. (2002). "Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma." J Immunol **169**(5): 2756-61.
- Loeb, L. A., K. R. Loeb, et al. (2003). "Multiple mutations and cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 776-81.
- Lotze, M. T. and M. Papamichail (2004). "A primer on cancer immunology and immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **53**(3): 135-8.
- Luft, T., P. Luetjens, et al. (2002). "IFN-alpha enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells." Int Immunol **14**(4): 367-80.
- Luster, A. D. and P. Leder (1993). "IP-10, a -C-X-C- chemokine, elicits a potent thymus-dependent antitumor response in vivo." J Exp Med **178**(3): 1057-65.
- Lutz, M. B. and G. Schuler (2002). "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol **23**(9): 445-9.
- MacPherson, G. G., C. D. Jenkins, et al. (1995). "Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF dependence." J Immunol **154**(3): 1317-22.
- Maglioco, A., D. Machuca, et al. "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 Immunol Immunother **60**(3): 389-99.
- Manfred B. Lutz, N. R. and a. A. Steinkasserer (2006). "Handbook of Dendritic Cells. Biology, Diseases, and Therapies." WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Mansoor, W., D. E. Gilham, et al. (2005). "Engineering T cells for cancer therapy." Br J Cancer **93**(10): 1085-91.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.
- Maugh, T. H., 2nd (1975). "Leukemia: a second human tumor virus." Science **187**(4174): 335-6.
- Mayordomo, J. I., T. Zorina, et al. (1995). "Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity." Nat Med **1**(12): 1297-302.
- McDevitt, H., S. Munson, et al. (2002). "Multiple roles for tumor necrosis factor-alpha and lymphotoxin alpha/beta in immunity and autoimmunity." Arthritis Res **4 Suppl 3**: S141-52.
- Melief, C. J. (2008). "Cancer immunotherapy by dendritic cells." Immunity **29**(3): 372-83.
- Meyvisch, C., G. A. Storme, et al. (1983). "Invasiveness and tumorigenicity of MO4 mouse fibrosarcoma cells pretreated with microtubule inhibitors." Clin Exp Metastasis **1**(1): 17-28.
- Middle, J. G. and M. J. Embleton (1981). "Naturally arising tumors of the inbred WAB/Not rat strain. II. Immunogenicity of transplanted tumors." J Natl Cancer Inst **67**(3): 637-43.



- Mocellin, S., S. Mandruzzato, et al. (2004). "Part I: Vaccines for solid tumours." Lancet Oncol **5**(11): 681-9.
- Mohler, K. M., D. S. Torrance, et al. (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." J Immunol **151**(3): 1548-61.
- Morelli, A. E. and A. W. Thomson (2007). "Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance." Nat Rev Immunol **7**(8): 610-21.
- Mosca, P. J., A. C. Hobeika, et al. (2000). "A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment." Blood **96**(10): 3499-504.
- Muller, A. J. and P. A. Scherle (2006). "Targeting the mechanisms of tumoral immune tolerance with small-molecule inhibitors." Nat Rev Cancer **6**(8): 613-25.
- Munn, D. H., M. D. Sharma, et al. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." Science **297**(5588): 1867-70.
- Nakanishi, T., J. E. Karp, et al. (2003). "Quantitative analysis of breast cancer resistance protein and cellular resistance to flavopiridol in acute leukemia patients." Clin Cancer Res **9**(9): 3320-8.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." Nature **420**(6917): 846-52.
- Nefedova, Y., P. Cheng, et al. (2005). "Activation of dendritic cells via inhibition of Jak2/STAT3 signaling." J Immunol **175**(7): 4338-46.
- Nefedova, Y., M. Fishman, et al. (2007). "Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells." Cancer Res **67**(22): 11021-8.
- Nelson, D. and R. Ganss (2006). "Tumor growth or regression: powered by inflammation." J Leukoc Biol **80**(4): 685-90.
- Nestle, F. O., S. Alijagic, et al. (1998). "Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells." Nat Med **4**(3): 328-32.
- O'Garra, A. and N. Arai (2000). "The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation." Trends Cell Biol **10**(12): 542-50.
- Old, L. J. and E. A. Boyse (1964). "Immunology of Experimental Tumors." Annu Rev Med **15**: 167-86.
- Onishi, Y., Z. Fehervari, et al. (2008). "Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(29): 10113-8.
- Orentas, R. J., M. E. Kohler, et al. (2006). "Suppression of anti-cancer immunity by regulatory T cells: back to the future." Semin Cancer Biol **16**(2): 137-49.
- Palucka, A. K., H. Ueno, et al. (2007). "Taming cancer by inducing immunity via dendritic cells." Immunol Rev **220**: 129-50.
- Pardoll, D. (2003). "Does the immune system see tumors as foreign or self?" Annu Rev Immunol **21**: 807-39.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells." Science **299**(5609): 1033-6.
- Pekarek, L. A., B. A. Starr, et al. (1995). "Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes." J Exp Med **181**(1): 435-40.
- Perruche, S., P. Zhang, et al. (2008). "CD3-specific antibody-induced immune tolerance involves transforming growth factor-beta from phagocytes digesting apoptotic T cells." Nat Med **14**(5): 528-35.

- Pitot, H. C. (1978). "Interactions in the natural history of aging and carcinogenesis." Fed Proc **37**(14): 2841-7.
- Prehn, R. T. (1972). "The immune reaction as a stimulator of tumor growth." Science **176**(4031): 170-1.
- Prehn, R. T. (1993). "Two competing influences that may explain concomitant tumor resistance." Cancer Res **53**(14): 3266-9.
- Prehn, R. T. (2006). "An immune reaction may be necessary for cancer development." Theor Biol Med Model **3**: 6.
- Prehn, R. T. (2007). "Immunostimulation and immunoinhibition of premalignant lesions." Theor Biol Med Model **4**: 6.
- Prehn, R. T. and J. M. Main (1957). "Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas." J Natl Cancer Inst **18**(6): 769-78.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." Nat Immunol **6**(3): 280-6.
- Qin, Z. and T. Blankenstein (2000). "CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells." Immunity **12**(6): 677-86.
- Robinson, J. a. B., G (1998). "Phagocyte function: A Guide for Research and Clinical Evaluation."
- Roncarolo, M. G., S. Gregori, et al. (2006). "Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans." Immunol Rev **212**: 28-50.
- Rubinstein, N., M. Alvarez, et al. (2004). "Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege." Cancer Cell **5**(3): 241-51.
- Ruggiero, R. A. and O. D. Bustuoabad (2006). "The biological sense of cancer: a hypothesis." Theor Biol Med Model **3**: 43.
- Ruggiero, R. A., O. D. Bustuoabad, et al. (1985). "'Concomitant immunity' in murine tumours of non-detectable immunogenicity." Br J Cancer **51**(1): 37-48.
- Ruggiero, R. A., O. D. Bustuoabad, et al. (1990). "Correlation between seric antitumor activity and concomitant resistance in mice bearing nonimmunogenic tumors." Cancer Res **50**(22): 7159-65.
- Rutella, S., S. Danese, et al. (2006). "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age." Blood **108**(5): 1435-40.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." Nat Immunol **6**(4): 345-52.
- Salgaller, M. L. (2001). "Advances in oncology--cancer immunology." IDrugs **4**(12): 1343-5.
- Salvadori, S., G. Martinelli, et al. (2000). "Resection of solid tumors reverses T cell defects and restores protective immunity." J Immunol **164**(4): 2214-20.
- Sallusto, F., M. Cella, et al. (1995). "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**(2): 389-400.
- Sallusto, F., C. R. Mackay, et al. (2000). "The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses." Annu Rev Immunol **18**: 593-620.

- Sauma, D., P. Michea, et al. (2004). "Interleukin-4 selectively inhibits interleukin-2 secretion by lipopolysaccharide-activated dendritic cells." Scand J Immunol **59**(2): 183-9.
- Schulz, O., A. D. Edwards, et al. (2000). "CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal." Immunity **13**(4): 453-62.
- Shankaran, V., H. Ikeda, et al. (2001). "IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-11.
- Shevach, E. M. and G. L. Stephens (2006). "The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity?" Nat Rev Immunol **6**(8): 613-8.
- Shi, S., W. Yao, et al. "Combinational Therapy: New Hope for Pancreatic Cancer?" Cancer Lett.
- Shimizu, K., E. K. Thomas, et al. (2001). "Enhancement of tumor lysate- and peptide-pulsed dendritic cell-based vaccines by the addition of foreign helper protein." Cancer Res **61**(6): 2618-24.
- Sioud, M. (2007). "An overview of the immune system and technical advances in tumor antigen discovery and validation." Methods Mol Biol **360**: 277-318.
- Society, A. C. (2010). "Cancer Facts and Figures 2010. ." American Cancer Society, Atlanta, GA
- Sonnenschein, C. and A. M. Soto (2000). "Somatic mutation theory of carcinogenesis: why it should be dropped and replaced." Mol Carcinog **29**(4): 205-11.
- Speiser, D. E., R. Miranda, et al. (1997). "Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy." J Exp Med **186**(5): 645-53.
- Spisek, R., P. Chevallier, et al. (2002). "Induction of leukemia-specific cytotoxic response by cross-presentation of late-apoptotic leukemic blasts by autologous dendritic cells of nonleukemic origin." Cancer Res **62**(10): 2861-8.
- Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol **20**: 395-425.
- Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). "Taking dendritic cells into medicine." Nature **449**(7161): 419-26.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution." J Exp Med **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M. and M. Dhodapkar (2001). "Active immunization against cancer with dendritic cells: the near future." Int J Cancer **94**(4): 459-73.
- Steinman, R. M., D. Hawiger, et al. (2003). "Tolerogenic dendritic cells." Annu Rev Immunol **21**: 685-711.
- Steinman, R. M. and M. D. Witmer (1978). "Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **75**(10): 5132-6.
- Sternlicht, M. D. and Z. Werb (2001). "How matrix metalloproteinases regulate cell behavior." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 463-516.
- Stingl, G., S. I. Katz, et al. (1978). "Immunologic functions of Ia-bearing epidermal Langerhans cells." J Immunol **121**(5): 2005-13.

- Suss R, K. V., and Scribner JD. (1973). "Cancer. Experiments and concepts." Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin.: 124-145.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, et al. (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-58.
- Tada, Y., A. Asahina, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta up-regulates CD40-engaged IL-12 production of mouse Langerhans cells." Eur J Immunol **31**(1): 294-300.
- Takahashi, T., Y. Kuniyasu, et al. (1998). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." Int Immunol **10**(12): 1969-80.
- Talmadge, J. E., R. K. Singh, et al. (2007). "Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer." Am J Pathol **170**(3): 793-804.
- Teicher, B. A., S. A. Holden, et al. (1990). "Classification of antineoplastic treatments by their differential toxicity toward putative oxygenated and hypoxic tumor subpopulations in vivo in the FSaIIC murine fibrosarcoma." Cancer Res **50**(11): 3339-44.
- Thornton, A. M. and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production." J Exp Med **188**(2): 287-96.
- Thornton, C. A., J. W. Upham, et al. (2004). "Functional maturation of CD4+CD25+CTLA4+CD45RA+ T regulatory cells in human neonatal T cell responses to environmental antigens/allergens." J Immunol **173**(5): 3084-92.
- Trinh, X. B., L. Sas, et al. "A phase II study of the combination of endocrine treatment and bortezomib phase II study of the combination of endocrine treatment and bortezomib in patients with endocrine-resistant metastatic breast cancer." Oncol Rep.
- Trumpfheller, C., J. S. Finke, et al. (2006). "Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine." J Exp Med **203**(3): 607-17.
- Tsai WL, C. R. (2010). "Viral hepatocarcinogenesis." Oncogene **29**: 2309-2324.
- Vicari, A. P. and C. Caux (2002). "Chemokines in cancer." Cytokine Growth Factor Rev **13**(2): 143-54.
- Vieweg, J., Z. Su, et al. (2007). "Reversal of tumor-mediated immunosuppression." Clin Cancer Res **13**(2 Pt 2): 727s-732s.
- Vita, F., S. Siracusano, et al. "BCG prophylaxis in bladder cancer produces activation of recruited neutrophils." Can J Urol **18**(1): 5517-23.
- von Boehmer, H. (2005). "Mechanisms of suppression by suppressor T cells." Nat Immunol **6**(4): 338-44.
- Vulink, A., K. J. Radford, et al. (2008). "Dendritic cells in cancer immunotherapy." Adv Cancer Res **99**: 363-407.
- Waldman, T. (2003). "Immunotherapy: past, present and future." Nat Med **3**: 269-277.
- Walker, L. S., A. Chodos, et al. (2003). "Antigen-dependent proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells in vivo." J Exp Med **198**(2): 249-58.
- Wang, L., K. Pino-Lagos, et al. (2008). "Programmed death 1 ligand signaling regulates the generation of adaptive Foxp3+CD4+ regulatory T cells." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(27): 9331-6.
- Wang, T., G. Niu, et al. (2004). "Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells." Nat Med **10**(1): 48-54.

- Ward, P. (1975). "Inflammation." Principles of Pathology, 2nd edn. Oxford University Press, New York: 97-140.
- Watson, B. (2002). "TNF inhibitors: a review of the recent patent literature." IDrugs **5**(12): 1151-61.
- Wen, Y. J., R. Min, et al. (2002). "Tumor lysate-specific cytotoxic T lymphocytes in multiple myeloma: promising effector cells for immunotherapy." Blood **99**(9): 3280-5.
- Westwood, J. A., L. J. Berry, et al. "Enhancing adoptive immunotherapy of cancer." Expert Opin Biol Ther **10**(4): 531-45.
- Westwood, J. A., L. J. Berry, et al. (2010). "Enhancing adoptive immunotherapy of cancer." Expert Opin Biol Ther **10**(4): 531-45.
- Wilckens, T. and R. De Rijk (1997). "Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers." Immunol Today **18**(9): 418-24.
- Willimsky, G. and T. Blankenstein (2005). "Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance." Nature **437**(7055): 141-6.
- Winn, H. J. (1961). "Immune mechanisms in homotransplantation. II. Quantitative assay of the immunologic activity of lymphoid cells stimulated by tumor homografts." J Immunol **86**: 228-39.
- Wrenshall, L. E., R. B. Stevens, et al. (1999). "Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans." J Leukoc Biol **66**(3): 391-400.
- Yamazaki, S., T. Iyoda, et al. (2003). "Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells." J Exp Med **198**(2): 235-47.
- Yu, P., D. A. Rowley, et al. (2006). "The role of stroma in immune recognition and destruction of well-established solid tumors." Curr Opin Immunol **18**(2): 226-31.
- Zajicek, G. (1996). "A new cancer hypothesis." Med Hypotheses **47**(2): 111-5.
- Zheng, X., J. Koropatnick, et al. (2006). "Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference." J Immunol **177**(8): 5639-46.
- Zhou, Y., M. L. Bosch, et al. (2002). "Current methods for loading dendritic cells with tumor antigen for the induction of antitumor immunity." J Immunother **25**(4): 289-303.