

Tesis Doctoral

# Vacunación con células dendríticas y regulación de la respuesta inmune en melanoma experimental

Mac Keon, Soledad

2014-07-16

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:

Mac Keon, Soledad. (2014-07-16). Vacunación con células dendríticas y regulación de la respuesta inmune en melanoma experimental. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Mac Keon, Soledad. "Vacunación con células dendríticas y regulación de la respuesta inmune en melanoma experimental". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-07-16.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**  
**Departamento de Química Biológica**

## **Vacunación con células dendríticas y regulación de la respuesta inmune en melanoma experimental**

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

**Soledad Mac Keon**

**Director de tesis: Dra. Rosa Wainstok**

Consejero de estudios: Dra. Rosa Wainstok

Lugares de Trabajo:

Laboratorio de Biología Tumoral, Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA (IQUIBICEN-CONICET).

Laboratorio de Cancerología, Fundación Instituto Leloir (IIBBA-CONICET).

*Buenos Aires, 2014*

*Fecha de Defensa de Tesis: 16/07/14*

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	-
<b>SUMMARY</b>	-
<b>PUBLICACIONES</b>	-
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	-
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. CANCER</b>	<b>2</b>
1.1. Desarrollo del cáncer	3
1.2. Melanoma	6
<b>2. CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA REGULACIÓN INMUNE</b>	<b>10</b>
2.1. Células presentadoras de antígeno	10
2.2. Células dendríticas (CDs)	13
2.2.1. Origen y subtipos de células dendríticas murinas	13
2.2.2. Captación antigénica	16
2.2.3. Inducción de la maduración	17
2.2.4. Plasticidad y presentación antigénica	19
2.2.5. Células apoptóticas, necróticas, y CPAs	22
2.3. Tejidos linfoides	24
<b>3. INMUNOTERAPIAS PARA EL CÁNCER</b>	<b>25</b>
3.1. Inmunología del cáncer	25
3.2. Desarrollo de inmunoterapias para el cáncer	28
3.3. Modelo murino B16-F1 y antecedentes de la línea de trabajo	30
<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
<b>1. MODELOS ANIMALES Y CULTIVOS CELULARES</b>	<b>35</b>
1.1. Animales	35
1.1.1. Desarrollo de melanoma cutáneo en ratones de la cepa C57BL/6	35
1.1.2. Ratones transgénicos OT-I	35
1.1.3. Cepa Balb/c	35
1.2. Líneas celulares y cultivos primarios	35
1.2.1. B16-F1 y B16-F1 OVA	35
1.2.2. Células dendríticas derivadas de médula ósea (CDs)	36
1.3. Detección de micoplasma	37

1.4. Irradiación de las líneas celulares B16-F1 y B16-F1 OVA	37
1.5. Marcación con CFSE	38
1.6. Marcación de membrana con PKH26	38
1.7. Marcación con la sonda fluorescente DiR	39
1.8. Separación magnética de células CD11c <sup>+</sup> de CD11c <sup>-</sup> o PDCA1 <sup>+</sup> de PDCA1 <sup>-</sup>	39
<b>2. VACUNACIÓN</b>	<b>39</b>
2.1. Preparación de la vacuna CD-Apo/Nec	39
2.1.1. Vacuna CD-Apo/Nec o CD-Apo/Nec OVA	39
2.1.2. Vacuna CD-Apo/Nec con el agregado de cóctel de citoquinas	40
2.1.3. Vacuna CD-Apo/Nec con el agregado de ligandos de TLR	40
2.2. Esquemas de vacunación y desafío tumoral	40
2.2.1. Vacuna CD-Apo/Nec	40
2.2.2. Vacuna CD-Apo/Nec IMI	41
2.2.3. Prueba de toxicidad de la ciclofosfamida	41
2.2.4. Vacuna CD-Apo/Nec CIC	41
2.2.5. Vacuna CD-Apo/Nec CIC post	41
<b>3. DISGREGACIÓN DE TEJIDOS ANIMALES</b>	<b>41</b>
3.1. Ganglios linfáticos	41
3.2. Ganglios linfáticos II	42
3.3. Bazo	42
3.4. Tumor	42
3.5. Sitio de inyección	43
<b>4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CD-APO/NEC O DE LAS CÉLULAS PROVENIENTES DE RATONES VACUNADOS</b>	<b>43</b>
4.1. Expresión de marcadores de superficie	43
4.2. Captación de células Apo/Nec por CDs	44
4.3. Migración <i>in vivo</i> de las células de la vacuna CD-Apo/Nec	45
4.4. Análisis del cocultivo de CDs con Apo/Nec por microscopía electrónica de transmisión	45
4.5. Cuantificación de vesículas lipídicas neutras en CDs	45
<b>5. RESPUESTA HUMORAL</b>	<b>46</b>
5.1. ELISA para detección de anticuerpos anti-B16-F1	46
<b>6. RESPUESTA CELULAR</b>	<b>46</b>
6.1. Proliferación <i>in vivo</i> de linfocitos CD8 <sup>+</sup> OVA-específicos	46
6.2. Inducción de linfocitos T regulatorios (Treg) <i>in vivo</i>	47
6.3. Reacción linfocitaria mixta <i>in vitro</i>	47
6.4. Eliminación <i>in vivo</i> de células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	48
<b>7. PROCESADO DE MUESTRAS DE PIEL PARA INMUNOFLUORESCENCIA O INMUNOHISTOQUÍMICA</b>	<b>49</b>
7.1. Inclusión de muestras de piel en parafina	49
7.2. Procesado de muestras de piel para corte por criostato	49

7.3. Inmunofluorescencia de los sitios de inyección	49
7.4. Inmunohistoquímica para detección de la expresión de PNA <sub>d</sub>	50
<b>8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS</b>	<b>51</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC</b>	<b>52</b>
1.1. Cocultivo de CDs con Apo/Nec: características ultraestructurales de las CDs y porcentaje de fagocitosis.	52
1.2. Heterogeneidad de las CDs utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec	58
1.3. La generación de protección antitumoral requiere de la interacción entre células CD11c <sup>+</sup> y otras células provenientes de médula ósea presentes en la vacuna	59
<b>CAPÍTULO II: MECANISMO DE INMUNOPROTECCIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC</b>	<b>63</b>
2.1. Respuesta sistémica antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec	63
2.2. Detección de micrometástasis latentes en animales protegidos por la vacunación con CD-Apo/Nec.	64
2.3. Estabilidad de la protección antitumoral	66
2.4. El esquema completo de vacunación con CD-Apo/Nec induce la producción de anticuerpos anti-B16-F1	67
2.5. Baja migración de células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes 24 horas post-inyección	69
2.6. El 77% de las células que componen la vacuna CD-Apo/Nec son retenidas en el sitio de vacunación hasta 120 horas post-inyección	71
2.7. Análisis comparativo de los sitios de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec, CDs, Apo/Nec o CD+Apo/Nec	74
2.8. Reclutamiento inmune en el sitio de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec	77
2.9. Formación de tejido terciario linfoide en el sitio de vacunación	79
2.10. La vacunación con CD-Apo/Nec no induce la diferenciación a linfocitos T regulatorios en el ganglio drenante	80
2.11. Proliferación <i>in vivo</i> de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> naïve B16-F1-específicos	81
2.12. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T en animales vacunados protegidos y no protegidos	84
<b>CAPÍTULO III: BÚSQUEDA DE CONDICIONES QUE POTENCIEN LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LA VACUNA CD-APO/NEC</b>	<b>88</b>
3.1. Preacondicionamiento del huésped a la vacunación	88

3.2. La capacidad inmunoestimuladora <i>in vitro</i> de las células CD-Apo/Nec no se incrementa al agregar cóctel de citoquinas inflamatorias	91
3.3. La capacidad inmunoestimuladora <i>in vitro</i> de las células Apo/Nec no se incrementa al agregar agonistas de receptores de tipo Toll	93
3.4. Diferenciación <i>in vitro</i> de CDs: Efecto de la densidad inicial de células de médula ósea sobre los niveles de maduración y el número de CDs obtenidas	95
3.5. Acumulación de lípidos neutros en las CDs durante el cocultivo con las Apo/Nec	97
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>112</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>113</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	-
<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS</b>	-

## RESUMEN

### VACUNACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS Y REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE EN MELANOMA EXPERIMENTAL

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue explorar el mecanismo mediante el cual la vacuna CD-Apo/Nec, constituida por células dendríticas cocultivadas con células apoptóticas y necróticas del melanoma murino B16-F1, genera protección antitumoral, y establecer condiciones que potencien la capacidad inmunoestimuladora de la misma.

En el trabajo de Tesis que se presenta se demuestra que la protección generada por la vacuna es sistémica, evitando el desarrollo s.c. de melanoma B16-F1 y controlando micrometástasis latentes. Se detectó en el sitio de vacunación la novedosa formación de una estructura linfoide terciaria, la cual no se evidenció con otras vacunas que no desarrollan protección antitumoral. En esta estructura se observaron vénulas con expresión de Adresina de Nódulo Linfático Periférico y el reclutamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en estrecho contacto con células dendríticas. Para la formación de la estructura linfoide terciaria fue necesario el cocultivo *ex vivo* durante 24 horas de las células dendríticas con células Apo/Nec. En los ganglios linfáticos drenantes, la vacunación no indujo la acumulación de linfocitos T regulatorios, pero sí fue posible detectar allí el reclutamiento y proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes B16-F1-específicos. Se determinó al finalizar el esquema de vacunación la producción anticuerpos IgM/IgG anti-B16-F1, que podrían actuar opsonizando células B16-F1.

Se ensayaron diferentes estrategias de maduración *in vitro* de las células CD-Apo/Nec. Sin embargo, no fue posible generar un aumento significativo en su capacidad inmunoestimuladora. Se dedujo que las células apoptóticas y necróticas de melanoma inducen una pérdida en la capacidad funcional de las células dendríticas. Se comprobó la acumulación de lípidos neutros en las células dendríticas, que podría estar afectando el procesamiento y presentación de antígenos tumorales.

En este trabajo de Tesis se logró determinar diferentes aspectos de la respuesta inmune anti-tumoral gatillados en los animales vacunados con CD-Apo/Nec. Creemos que las células de

melanoma irradiadas son una fuente completa de antígenos de melanoma, y que este trabajo contribuye a planear nuevas aproximaciones y estrategias de combinación que logren mejorar las terapias anti-melanoma existentes.

**Palabras clave**

Inmunoterapia, cáncer, células dendríticas, tejido linfoide terciario, vacunación, melanoma.



## SUMMARY

### **DENDRITIC CELL VACCINATION AND IMMUNE RESPONSE REGULATION IN EXPERIMENTAL MELANOMA**

The aim of this Ph.D. Thesis was to explore the mechanisms of antitumor protection elicited by DC-Apo/Nec vaccine, constituted by dendritic cells charged with apoptotic and necrotic murine B16-F1 melanoma cells, and to establish new conditions to enhance its immunostimulatory capacity.

In this PhD Thesis it is demonstrated that the DC-Apo/Nec vaccine generates systemic protection against s.c. B16-F1 melanoma and dormant micrometastasis.

The neoformation of a tertiary lymphoid structure was described at the vaccination site, which was not evidenced with other vaccines lacking antitumor capacity. Within this structure the expression of Peripheral Lymph Node Addressin and the recruitment of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes, in close contact with dendritic cells, were observed. For the tertiary lymphoid structure to be formed, a 24 hour coculture of dendritic cells with apoptotic and necrotic melanoma cells was required. In draining lymph nodes, B16-F1 specific T CD8<sup>+</sup> lymphocyte recruitment and proliferation was detected, and regulatory T lymphocytes were not induced. Anti-B16-F1 antibodies were detected, which could be assisting by opsonization in the immune detection of B16-F1 melanoma cells.

New maturation approaches for DC-Apo/Nec cells were assayed, but it was not possible to enhance significantly their immunostimulatory capacity. It was deduced that during the coculture period the apoptotic and necrotic melanoma cells induce a loss in the functional properties of dendritic cells. Lipid accumulation was shown in these dendritic cells, which could be affecting the processing and presentation of tumoral antigens.

Different aspects of the antitumor response elicited by DC-Apo/Nec vaccination were determined in this Ph.D. Thesis. We believe that apoptotic and necrotic melanoma cells are an

complete melanoma antigen source, and that this work contributes on the search for new approximations and combination strategies to improve actual anti-melanoma therapies.

**Key words**

Immunotherapy, cancer, dendritic cells, tertiary lymphoid structure, vaccination, melanoma.

## PUBLICACIONES

**Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:**

**Mac Keon S.**, Gazzaniga S., Mallerman J., Bravo A.I., Mordoh J., Wainstok R. *Vaccination with dendritic cells charged with apoptotic/necrotic B16 melanoma induces the formation of subcutaneous lymphoid tissue.* Vaccine, 2010. 28 :8162-8168.

Campisano S., **Mac Keon S.**, Gazzaniga S., Ruiz S., Dodes Traian M., Mordoh J., Wainstok R. *Vaccinal capacity of CD11c positive and negative populations present in GM-CSF cultures derived from bone marrow precursors.* Vaccine, 2013. 31 (2): 354-361.

Ruiz M.S., **Mac Keon S.**, Campisano S., Bravo A.I., Gazzaniga S., Wainstok R. *CD207<sup>+</sup> cells recruitment to vaccination site and draining lymph nodes after CD-Apo/Nec vaccination in mice.* Vaccine, 2014, 5;32(11): 1229-32.

**Mac Keon S.**, Berguer P.M., Mordoh J., Wainstok R. *Lipid-laden dendritic cells in protective melanoma immunotherapy.* Cancer Immunology Immunotherapy (Enviado a publicación).

## AGRADECIMIENTOS

La escritura de esta tesis simboliza el cierre de una larga etapa, que fue sumamente positiva a nivel profesional y personal. No hubiera podido lograrlo sin la ayuda de muchísimas personas que me guiaron y acompañaron durante su desarrollo. No quisiera dejar de agradecerles a todas ellas su importante aporte a mi vida y a mi carrera.

A la Dra. Rosa Wainstok, por haber confiado en mí para realizar este proyecto. Por su tarea de dirección y sus muchos consejos. Y sobre todo por su buena predisposición y cariño permanentes.

Al Dr. José Mordoh por mostrarme con su ejemplo que el trabajo científico es un camino arduo pero gratificante. Por abrirme las puertas de su laboratorio y por tantos años de interés, paciencia, enseñanzas y supervisión.

A la Universidad de Buenos Aires, por brindarme una completa formación y dirigirme hacia la investigación, y siempre darme un lugar, en todas las etapas de mi carrera. Al Departamento de Química Biológica por admitirme a la carrera de Doctorado y por su seguimiento. A sus secretarios, especialmente a Ayelén, por su buena predisposición para resolver todos los problemas.

A la Fundación Instituto Leloir, por permitirme realizar mi trabajo de tesis Doctoral, otorgándome todas herramientas necesarias, a nivel equipamiento, de acceso a información, y por proveer de un inigualable ambiente de trabajo. También por darme la oportunidad de profundizar en el idioma inglés y de aprender el alemán en el Goethe Institut. A todo el personal de apoyo que con su buena predisposición hicieron mi trabajo más fácil: a Ana, Mari, Claudia, al personal de biblioteca, Juan, Mónica y Marcos, a los chicos del bioterio que me tuvieron tanta paciencia, Adriana, Sonia, Leandro, Nico y Jimena, y a todo el personal administrativo y de mantenimiento. A los miembros de mi Comité de Seguimiento, los Doctores Fernanda Ceriana, Pablo Wappner y Paula Berguer por su tiempo y sus propuestas.

A la Dra. Inés Bravo por su colaboración y sus enseñanzas sobre patología.

A mis compañeras de laboratorio, comenzando por Cora que me guió en los primeros pasos en la mesada y con quien compartí tan lindos momentos dentro y fuera del laboratorio. A Sil, que

aunque muchas veces a la distancia, me ayudó muchísimo con sus buenos consejos y propuestas. A Juli, valiosa compañera con quien fuimos aprendiendo juntas a trabajar en el laboratorio. A Marina, a quién recuerdo con mucho cariño de los primeros tiempos, y que me abrió las puertas de su casa siempre que lo necesité. A Flor y Ceci, que siempre sabias me ayudaron todos los días con pequeños y grandes gestos, y junto con Marie, Laura y Anto hicieron de los días en el laboratorio mucho más interesantes. A Caro, que aunque estuvo poquito en el laboratorio, me acompañó muchísimo en el tiempo en el que el laboratorio era solitario con su increíble buen humor. A Sol, compañera de tema invaluable, que me enseñó muchísimo y con quien compartí congresos y buenas charlas. A Sabri, por su colaboración y por tenerme mucha paciencia. A Juan, que se animó a trabajar entre medio de tantas mujeres y me alentó a seguir esforzándome. A todos mis compañeros del Centro de Investigaciones Oncológicas del Instituto Alexander Fleming, quienes me enseñaron mucho, estuvieron siempre dispuestos a ayudarme, y con quienes compartí muchos buenos encuentros fuera del laboratorio.

A mis tantos amigos de la facultad, por ayudarme a transitar este camino complementando, primero el estudio y luego el trabajo, con numerosas charlas, mates y divertidas reuniones.

A todas las increíbles personas que me fueron enseñando desde los comienzos. Por empezar a Victoria Vázquez y Silvia Cerdeira, mis profesoras del colegio, que me mostraron el mundo de las ciencias. A Ana María Buzaleh, con su mucha paciencia durante mi primera experiencia en un laboratorio, y quien me siguió teniendo siempre en cuenta.

Al CONICET, por otorgarme las becas que me permitieron realizar la carrera de Doctorado. A todas las entidades que financiaron este proyecto: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la Universidad de Buenos Aires, la Fundación SALES, la Fundación Calderón de la Barca y al CONICET.

A mis padres y hermanos, las personas más importantes en mi vida, por su apoyo y su confianza en mí, y por aguantarme durante los difíciles períodos de mucho trabajo y estudio. A Clari por su ayuda con las ilustraciones. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible. ¡Gracias!

A mis abuelos, que siempre me valoraron tanto, sobre todo al abuelo Enrique por su ejemplo de vida, por su energía puesta a buscar siempre respuestas y su curiosidad inagotable.

A Agustín, que con su amor me incentivó a superarme cada día más y sin quien este trabajo hubiese sido mucho más difícil de realizar.

¡Muchas gracias a todos!

## INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes éxitos de la medicina ha sido la vacunación para la prevención de enfermedades (Nabel 2013; Palucka and Banchereau 2013). Las vacunas preventivas están diseñadas para bloquear la dispersión de la infección, mientras que las vacunas terapéuticas buscan eliminar al agente causante de una determinada enfermedad que ya se encuentra establecida, por ejemplo eliminar células infectadas con virus o células tumorales (Palucka and Banchereau 2013).

La actividad de las vacunas preventivas se correlaciona con la inducción de anticuerpos específicos y linfocitos B de memoria. Estas vacunas también pueden inducir respuestas celulares, especialmente las compuestas por microbios atenuados (Pulendran and Ahmed 2011). Las vacunas preventivas han sido la herramienta más económica y efectiva contra las infecciones, pero irónicamente, la gran mayoría se han desarrollado empíricamente, con poco conocimiento de los mecanismos inmunológicos subyacentes (Pulendran and Ahmed 2011). Por otro lado, la generación de vacunas terapéuticas para enfermedades crónicas presenta importantes desafíos. Actualmente se están realizando grandes esfuerzos para desarrollar vacunas para enfermedades infecciosas persistentes como el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la hepatitis, la tuberculosis, la malaria, o enfermedades crónicas como el cáncer.

El cáncer es una enfermedad crónica, y como tal se encuentra asociada a un compartimiento T de memoria alterado, conteniendo linfocitos T CD8<sup>+</sup> anérgicos (Freeman et al. 2006). Idealmente, las vacunas terapéuticas deberían activar linfocitos T vírgenes y reprogramar linfocitos T de memoria existentes, induciendo la transición de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con perfil tolerogénico a linfocitos T CD8<sup>+</sup> capaces de responder como linfocitos T citotóxicos efectivos (Palucka and Banchereau 2013). El objetivo de la vacunación contra el cáncer es generar linfocitos T CD8<sup>+</sup> efectores que eliminen las células tumorales, y linfocitos T CD8<sup>+</sup> de memoria de larga vida que actúen previniendo la recurrencia de la enfermedad. Numerosas estrategias de vacunación contra el cáncer están siendo ensayadas, puestas en evidencia por el gran número de éstas que se encuentran en fase II o fase III de ensayos clínicos (Palucka and Banchereau 2013).

El descubrimiento que en ciertos tipos de cáncer hay microorganismos patogénicos involucrados ha llevado al desarrollo de vacunas preventivas efectivas. Uno de los recientes logros

en este campo ha sido la prevención del cáncer cervical causado por el virus del papiloma humano (HPV) al vacunar con una cápside viral recombinante (Lowy and Schiller 2006). La vacunación contra la hepatitis B ha logrado prevenir a su vez el desarrollo de carcinoma hepatocelular (Plymoth et al. 2009).

Por el lado de las vacunas terapéuticas, *Provenge (sipuleucel-T)*, vacuna para el cáncer de próstata, ha demostrado un aumento de 4 meses en la sobrevida de pacientes en fase III de ensayos clínicos (Kantoff et al. 2010). Esta vacuna está constituida por células dendríticas (CDs) cargadas con la proteína antigénica fosfatasa ácida prostática (PAP). Aunque posee un efecto moderado en la sobrevida, demuestra que la inmunoterapia puede gatillar una respuesta antitumoral en pacientes con tumores establecidos, y su aprobación por la FDA (Food and Drug Administration de los Estados Unidos) en 2010 es uno de los mayores logros de la nueva era de la inmunoterapia del cáncer, ya que se trata de la primera vacuna terapéutica aprobada en este campo. Esta vacuna ha demostrado también que es posible utilizar vacunas a base de CDs para el tratamiento del cáncer.

Un paso crítico de las estrategias de vacunación antitumoral es la eficiente presentación de los antígenos tumorales a las células T. Las CDs son un componente esencial de la vacunación, por su habilidad para capturar, procesar y presentar antígenos a las células T (Banchereau and Steinman 1998). Son las células especializadas en presentar antígenos tumorales a linfocitos T vírgenes a través de vías que involucran señales positivas y negativas (Dranoff 2011). Entender cómo se regula la acción antitumoral de las CDs *in vivo* resulta fundamental para el desarrollo de nuevas vacunas antitumorales. En este trabajo de Tesis se utiliza un modelo experimental murino de melanoma para el estudio de la vacunación antitumoral utilizando células dendríticas cargadas con células apoptóticas y necróticas de melanoma.

## 1. CÁNCER

La era moderna de la investigación en cáncer comenzó en el siglo 19 con el desarrollo por varios investigadores, especialmente Rudolf Virchow, del concepto que el cáncer es una enfermedad de las células (Weinstein and Case 2008). Los últimos 100 años han sido los más prolíficos, y hoy en día es posible obtener importantes tasas de cura y sobrevida para muchos tipos de cáncer cuando son tratados en estadios tempranos de la enfermedad, y prevenir el cáncer



asociado a ciertas enfermedades infecciosas, como el HPV (Lowy and Schiller 2006) o el virus de la hepatitis B (Plymoth et al. 2009). Sin embargo, todavía queda camino por recorrer para poder tratar efectivamente esta enfermedad, y el mayor desafío resulta prevenir las metástasis a órganos distantes de las células tumorales, que son las que finalmente acortan la vida de los pacientes.

### 1.1. Desarrollo del cáncer

Los tejidos normales controlan la producción y liberación de las señales que promueven el crecimiento celular, instruyendo la entrada y progresión de las células que lo conforman a través del ciclo celular, asegurando de esta manera la homeostasis en el número de células y manteniendo la arquitectura y función del tejido (Hanahan and Weinberg 2011).

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular desregulada y la diseminación de las células tumorales desde el sitio de origen o primario a tejidos distantes. El cáncer se clasifica por el tejido y el tipo celular del cual se origina, ya que las células tumorales retienen características que reflejan su tejido de origen. Aproximadamente el 85% de los cánceres se generan en células epiteliales y se clasifican como carcinomas. Los derivados de células mesodérmicas se denominan sarcomas, y los del tejido glandular se denominan adenocarcinomas. En cada tejido son diferentes los factores principales involucrados en el desarrollo del cáncer. También difieren según el del tejido de origen los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis y el patrón de diseminación desde el sitio primario (Pecorino 2012).

A pesar de que las vías celulares y moleculares en el desarrollo de cada tipo de cáncer son distintas, el resultado final parece ser el mismo. Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg 2011) han identificado luego de un fino estudio capacidades compartidas por la mayoría, sino todos, los tipos de cáncer (**Fig. 1**). Estas capacidades serían: autonomía de factores de crecimiento, evasión de señales de inhibición de crecimiento, evasión de la muerte celular, potencial replicativo ilimitado, capacidad angiogénica, capacidad de invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético, y evasión de la destrucción por parte del sistema inmune. Las dos últimas características son consideradas capacidades emergentes, ya que se han descripto en numerosos tipos de cáncer pero todavía no se han generalizado y validado por completo. Las capacidades adquiridas por las células tumorales se ven favorecidas por dos capacidades

habilitantes de las células tumorales: la inestabilidad genómica, que dota a las células de alteraciones genéticas; y la inflamación, que puede llevar a un microambiente pro-tumoral (Hanahan and Weinberg 2011).

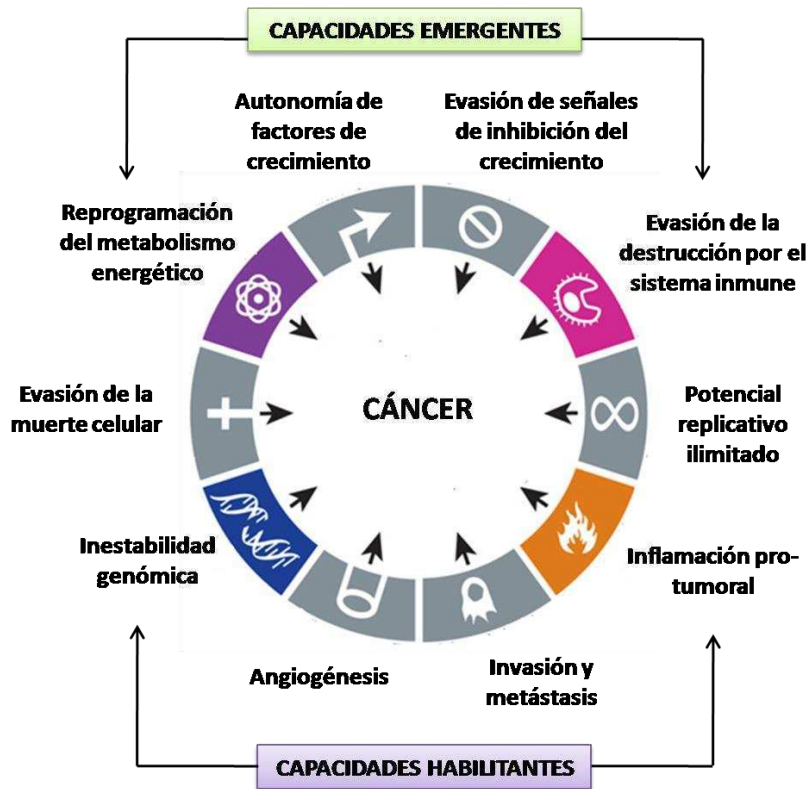


Fig. 1: Capacidades del cáncer. Adaptado de Hanahan D. y Weinberg R.A, 2011 (Hanahan and Weinberg 2011).

Las células tumorales adquieren la capacidad de sostener la señal proliferativa constitutivamente encendida desregulando señales proliferativas por diferentes mecanismos. Por un lado, las células tumorales son capaces de producir ligandos de receptores de factores de crecimiento, y de sobre-expresar estos receptores específicos, haciéndolas altamente respondedoras a bajos niveles de ligando y generando una estimulación proliferativa autocrina. Las células tumorales pueden a su vez estimular células estromales asociadas al tumor para que éstas liberen factores de crecimiento (Bhowmick et al. 2004). La activación de estas vías proliferativas puede ser también gatillada por mutaciones que generan la activación constitutiva de circuitos de señalización. Por ejemplo más del 60% de los melanomas humanos contienen mutaciones afectando la estructura de la proteína B-Raf (Davies et al. 2002), resultando en la

activación constitutiva de la vía de las MAPK (proteínas kinasas activadas por mitógeno) e induciendo señales proliferativas. Esta misma respuesta se puede obtener alterando estructuralmente las moléculas de los receptores, facilitando su activación en ausencia del ligando (Hanahan and Weinberg 2011).

Por otro lado, las células tumorales pueden poseer alteradas las vías que llevan a la apoptosis y senescencia. Los genes supresores tumorales codifican proteínas que poseen funciones críticas en la regulación de los circuitos que llevan a la proliferación o alternativamente a la senescencia o apoptosis celular. Las proteínas RB (retinoblastoma) y p53 son dos proteínas codificadas por genes supresores tumorales, y su alteración lleva a la evasión de la apoptosis y a la replicación inadecuada de las células. Existen otros mecanismos por los cuales las células tumorales son capaces de evadir la apoptosis, como la expresión aumentada de reguladores anti-apoptóticos o de señales de supervivencia, disminución de la expresión de factores pro-apoptóticos, o incluso el gatillado del proceso de autofagia para reciclar catabolitos celulares y utilizarlos para la biosíntesis de diversas macromoléculas y para el metabolismo energético, permitiendo la supervivencia en ambientes de estrés y limitantes en nutrientes. Para evadir la senescencia y adquirir un potencial replicativo ilimitado (inmortalización) la gran mayoría de las células tumorales comienzan a expresar constitutivamente telomerasa, enzima que previene el acortamiento de los telómeros mediante la adición de fragmentos repetitivos en los extremos de los cromosomas, previniendo la entrada en crisis celular (Hanahan and Weinberg 2011).

Las células tumorales poseen alteraciones a nivel genético y también epigenético del genoma. Alteraciones genómicas como mutaciones puntuales, deleciones, fusiones, amplificaciones y rearrreglos cromosómicos se pueden ir acumulando a lo largo del tiempo. Puede ocurrir a su vez la desregulación de la expresión génica por mecanismos epigenéticos, incluyendo la metilación aberrante del ADN, modificación de histonas y cambios en el posicionamiento nucleosomal. La sumatoria de cambios genéticos, citogenéticos y epigenéticos, sobre los que actúan los procesos de competencia y selección natural, van dotando a las células de mayor capacidad proliferativa, angiogénica e invasiva (Podlaha et al. 2012). Tradicionalmente se consideraba que estas alteraciones surgían de manera secuencial, dando lugar a fenotipos cada vez más agresivos e invasivos. Sin embargo, hoy en día este paradigma se ha expandido para abarcar la disrupción de mecanismos regulatorios epigenéticos, que pueden surgir causados por

mutaciones genéticas en modificadores epigenéticos. Estos cambios conducirían a una expresión génica anormal e inestabilidad genética, predisponiendo al cáncer (You and Jones 2012).

Peligrosamente, estos cambios pueden otorgar a una célula una ventaja selectiva sobre las células normales del tejido. De esta forma se originan acumulaciones celulares, llamadas tumores o neoplasias. Según su evolución, las neoplasias pueden caracterizarse en benignas o malignas. Las neoplasias benignas poseen baja tasa de crecimiento y solo producen alteraciones locales. Las neoplasias malignas o cáncer, en cambio, poseen alta tasa de crecimiento y la capacidad de migrar a otros tejidos e invadirlos, formando tumores secundarios o metástasis (Pecorino 2012).

La evolución de células normales a células con cada vez mayor fenotipo neoplásico ocurre a través del proceso denominado progresión tumoral. Es un consenso generalizado que el cáncer posee un origen monoclonal, esto quiere decir que todas las células del tumor derivan de una única célula ancestral común. Sin embargo, puede finalmente contener una población celular genética y fenotípicamente heterogénea, debido a los cambios sucesivos y aditivos que se generan en el genoma durante la progresión tumoral (Weinberg 2014).

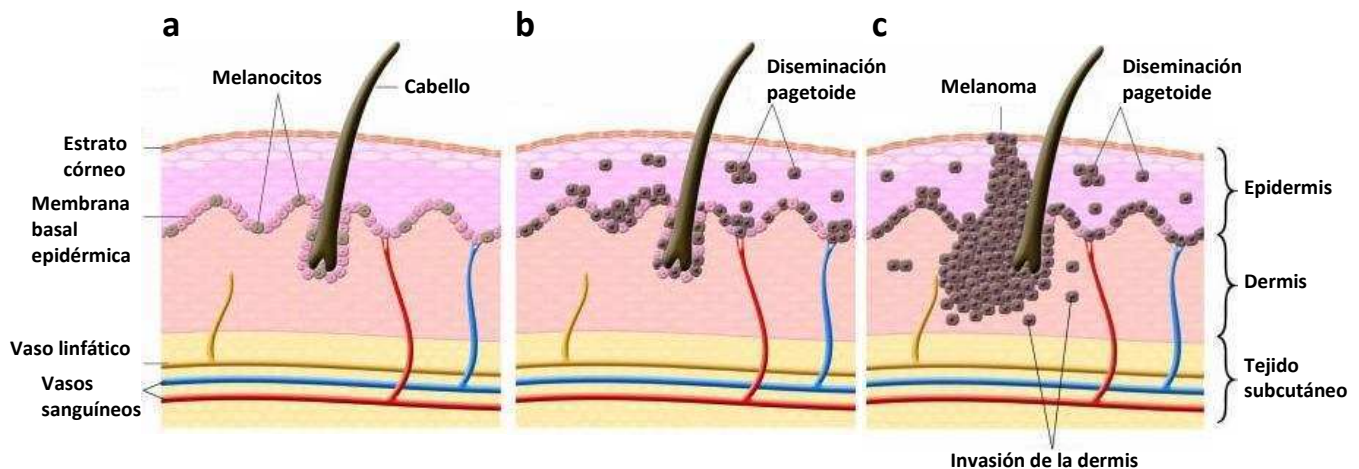
### **1.2. Melanoma**

El melanoma cutáneo (MC) es una forma potencialmente letal de cáncer de piel, y representa la neoplasia maligna con la tasa de incidencia de mayor crecimiento a nivel mundial (Siegel et al. 2011), siendo responsable del 75 % de muertes debidas al cáncer de piel (Shenenberger 2012). El MC es un cáncer generado por la transformación maligna de los melanocitos, células productoras del pigmento melanina derivadas de la cresta neural, que residen en la capa basal de la epidermis, en la base de los folículos pilosos de la dermis, y en la retina. La biosíntesis de melanina involucra varias enzimas de la familia de proteínas relacionadas a tirosinasa (Trp), incluyendo Trp1, dopacromo tautomerasa o Trp2 y tirosinasa. La melanina está contenida dentro de organelas llamadas melanosomas, que se asocian a microtúbulos y son transportados a los queratinocitos, protegiéndolos del daño al ADN generado por la radiación ultravioleta (UV) (Aris 2010).

La causa de la transformación maligna de los melanocitos es multifactorial, e incluye daño debido a la radiación ultravioleta (UV) y susceptibilidad genética. El riesgo de desarrollar MC está asociado a la exposición solar intensa e intermitente, y se ve incrementada en personas de piel y cabellos claros (Chudnovsky et al. 2005). Datos clínicos han evidenciado que en aproximadamente

la mitad de los casos, el MC se genera en nevos (Weatherhead et al. 2007). Los nevos son conjuntos benignos de células con morfología melanocítica que pueden ser congénitos o adquiridos a lo largo de la vida. Los nevos poseen distintos patrones de crecimiento, y son considerados una consecuencia de mutaciones genéticas subyacentes e influencias locales en el crecimiento celular y supervivencia. Mutaciones en *N-ras* son frecuentes en nevos congénitos, mientras que mutaciones en *B-raf* están presentes en nevos adquiridos (Ichii-Nakato et al. 2006; Bauer et al. 2007). Sin embargo, el melanoma puede desarrollarse a partir de piel normal, sin requerir un nevo precursor (Bevona et al. 2003).

El MC progresa desde una forma de crecimiento radial (diseminación pagetoide) a una fase de crecimiento vertical. Durante la fase de crecimiento vertical el melanoma invade la dermis y es metastáticamente competente (Chudnovsky et al. 2005). El siguiente esquema muestra las fases de desarrollo del MC (**Fig. 2**).



**Fig. 2: Fases de la progresión melanocítica tumoral. (a)** Piel normal. Hay distribución de los melanocitos en la capa basal epidérmica. **(b)** Melanoma *in situ*. Las células de melanoma migraron a la epidermis superior (diseminación pagetoide) y se encuentran dispersas entre las células epiteliales. Las células de melanoma muestran atipia citológica, con tamaño citoplasmático aumentado. Los núcleos son grandes e irregulares. **(c)** Melanoma invasivo. Las células de melanoma muestran diseminación pagetoide y han penetrado la membrana basal.

El MC puede dividirse clínicamente en cinco estadios (Balch et al. 2009). El estadio 0 o melanoma *in situ* designa cuando las células anormales se encuentran confinadas en la epidermis. En el estadio I no hay evidencias de diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos o sitios distantes, y puede dividirse en dos subclases: IA e IB. En el estadio IA el espesor del tumor (índice de Breslow) es menor a 1 mm, no hay ulceración, y se detecta menos de una mitosis por  $\text{mm}^2$ . En

el estadio IB el tumor no mide más de 1 mm de espesor y está ulcerado, o mide entre 1 y 2 mm y no está ulcerado pero se detecta una o más mitosis por  $\text{mm}^2$ . En el estadio II tampoco hay evidencias de diseminación a ganglios linfáticos o sitios distantes, y se divide en las subclases IIA, IIB y IIC. En el estadio IIA el tumor mide entre 1 y 2 mm y está ulcerado, o mide entre 2 y 4 mm y no está ulcerado. En el estadio IIB el tumor mide entre 2 y 4 mm y está ulcerado, o mide más de 4 mm y no está ulcerado. En el estadio IIC el tumor tiene más de 4 mm y está ulcerado. En el estadio III el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales pero no hay evidencias de metástasis a distancia. En el estadio IV el cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como pulmón, hígado, cerebro, hueso, tejidos blandos, tracto gastrointestinal, o incluso a sitios de la piel alejados del tumor primario.

Los casos de MC tempranamente diagnosticados (Estadio 0 y IA) pueden ser curados por escisión quirúrgica del tumor primario. Una vez que el melanoma ha invadido la dermis con mayor profundidad, o si el tumor está ulcerado, el pronóstico se torna más desfavorable. La supervivencia a 10 años de pacientes varía del 93% en el estadio IA, al 39% para el estadio IIC, aunque en ninguno de estos estadios haya evidencias de diseminación a ganglios linfáticos o sitios distantes (Balch et al. 2009). Esto muestra el gran potencial invasivo de las células de melanoma. En el estadio III, donde las células tumorales han metastatizado a ganglios linfáticos regionales, la supervivencia a 5 años varía del 70 % en el estadio IIIA temprano al 39% en el estadio IIIC avanzado. Por último, cuando se han detectado metástasis a sitios distantes del tumor primario, la supervivencia a un año varía entre el 33% y 62% dependiendo del grado de avance de la enfermedad.

Luego de la remoción del tumor primario, el tratamiento convencional es la ampliación del margen quirúrgico si el mismo se demostró insuficiente en la biopsia. Luego de la remoción del tumor en los estadios IIB, IIC y III existe riesgo de metástasis a distancia no detectadas. Es en estos casos que deben utilizarse estrategias alternativas de tratamiento para evitar la recurrencia del melanoma. El MC no responde a terapias convencionales como la quimioterapia sin blancos específicos. El fracaso de agentes quimioterápicos como la dacarbazina, o combinaciones con cisplatino, vinblastina y carmustina (Atkins et al. 2008), podría deberse a falta de respuesta primaria a estas drogas por las células tumorales o a resistencia adquirida, mecanismo llamado multi-resistencia a drogas (La Porta 2007). Por otro lado, la resistencia a drogas puede estar dada por alteraciones en las vías involucradas en la supervivencia celular y apoptosis. La mayoría de las drogas citotóxicas inducen apoptosis mediante la liberación de citocromo C mitocondrial y

activación de la caspasa 9. La resistencia del melanoma a la quimioterapia se ha atribuido en parte a la sobreexpresión de Bcl-2, proteína anti-apoptótica que inhibe la liberación del citocromo C (Aris 2010).

El fracaso de los regímenes quimioterápicos ha conducido a dar mayor relevancia a tratamientos inmunoterapéuticos para el melanoma. Actualmente se está indicando para los estadios IIB, IIC y III el tratamiento con altas dosis de interferón (IFN)  $\alpha$ -2b, que aunque aumenta el período libre de enfermedad, puede generar severas toxicidades (Algazi et al. 2010). Para el estadio IV, donde el tumor ha metastatizado a sitios distantes, se ha comenzado a usar recientemente el anticuerpo monoclonal Ipilimumab, que hace blanco en la molécula inmunosupresora CTLA-4 (Ascierto 2013). Por otro lado, más del 60% de los melanomas humanos poseen mutaciones en *B-Raf*, y en particular en la posición V600E (Davies et al. 2002), que genera un aumento de aproximadamente 500 veces en la actividad kinasa (Weinberg 2014). En pacientes en estadios IIC y IV positivos para la mutación BRAF V600E el inhibidor de B-Raf Vemurafenib está siendo utilizado con un importante efecto sobre la sobrevida (Chapman et al. 2011).

El concepto de que los tumores expresan antígenos específicos fue demostrado en los años 1950s (Foley 1953; Prehn and Main 1957). Desde entonces, el campo de la inmunoterapia tumoral ha avanzado enormemente, y actualmente ya existe un tratamiento para el cáncer de próstata (*Sipuleucel-T*) aprobado por la FDA basado en la vacunación con CDs (Kantoff et al. 2010). Con respecto al melanoma, los trabajos pioneros utilizaron células de melanoma irradiadas junto con bajas dosis de ciclofosfamida (Berd and Mastrangelo 1988; Berd and Mastrangelo 1988). A lo largo de los años se han hallado varios antígenos de diferenciación melanocíticos, entre los cuales se encuentran MelanA/MART-1 (Kawakami et al. 1994), gp100/PMEL17 (Kawakami et al. 1994), Tyr (Brichard et al. 1993), Trp-2 (Wang et al. 1996), MELOE-1 (Godet et al. 2008) y antígenos de la superfamilia cáncer-testis, tales como MAGE y NY-ESO-1 (van der Bruggen et al. 1991; Chen et al. 1997), expresados por células tumorales de diversos orígenes histológicos pero no en tejido normal, exceptuando testículos. Se ha demostrado que la vacunación con antígenos de diferenciación melanocítica purificados generan pobres respuestas clínicas (Rosenberg et al. 2004; Terando et al. 2007). En nuestro laboratorio se trabaja con estrategias de inmunoterapia para el melanoma desde hace 20 años (Guerra et al. 1989; Mordoh et al. 1997), considerando que el melanoma tiene antígenos conocidos y otros desconocidos, y que es necesario que el sistema inmune desarrolle una respuesta policlonal para evitar el escape tumoral.

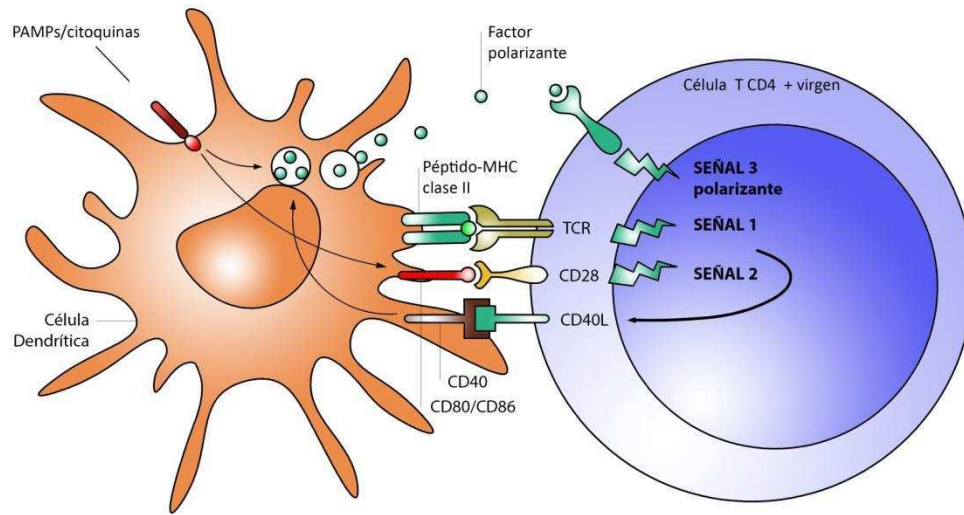
## 2. CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA REGULACIÓN INMUNE

### 2.1. Células presentadoras de antígeno

Las células presentadoras de antígeno (CPAs) son aquellas que poseen la capacidad de presentar en su superficie péptidos a los linfocitos T. Los péptidos deben ser procesados, unidos al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I) y externalizados para ser reconocidos por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, o unidos al complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) para ser reconocidos por linfocitos T CD4<sup>+</sup>. La gran mayoría de las células del organismo poseen proteasas capaces de procesar proteínas citosólicas, y expresan el MHC-I en su superficie. De esta manera, son capaces de activar linfocitos CD8<sup>+</sup> efectoras. Por otro lado, la presentación antigénica a través del MHC-II está restringida a los linfocitos B, macrófagos y CDs. Estas células, capaces de activar a linfocitos T CD4<sup>+</sup> se consideran CPAs. Las CDs son las CPAs más potentes. Poseen altos niveles de expresión de moléculas del MHC-II y de moléculas coestimuladoras, como CD80 y CD86, que las hacen capaces de activar a los linfocitos T vírgenes, por lo que son llamadas CPAs profesionales.

El reconocimiento del péptido específico presentado por el MHC se considera la primera señal necesaria para la activación de los linfocitos T vírgenes. Sin embargo, se necesita una segunda señal, que está dada por la unión de moléculas coestimuladoras en las CDs, como CD80 y CD86, a CD28 en los linfocitos. Finalmente, según las citoquinas o los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) sentidos por las CDs, y la interacción de CD40 en su superficie con CD40L en los linfocitos activados, las CDs liberan diferentes factores polarizantes (señal 3) que influyen el perfil de los linfocitos activados. También poseen la capacidad de producir factores polarizantes que inducen en ellos un perfil de respuesta determinado (**Fig. 3**).





**Fig. 3: Activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes por CDs.** Luego de sentir los estímulos inflamatorios, las CDs maduran y presentan péptidos procesados por medio de las moléculas del MHC-II, que son reconocidos por el TCR de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes (señal 1 requerida para la activación). Por otro lado, para su activación se requiere una segunda señal, que está dada por la unión de moléculas coestimulatorias en las CDs, como CD80 y CD86, a CD28 en los linfocitos. Finalmente, según las citoquinas sensadas por receptores, o los PAMPs sensados por RRP (receptores de reconocimiento de patrones), y la interacción de CD40 en las CDs con CD40L en los linfocitos activados, las CDs liberan diferentes factores polarizantes (señal 3) que influyen el perfil de los linfocitos activados.

Al activarse, los linfocitos T expresan en su superficie el receptor de alta afinidad para IL-2, que media una respuesta proliferativa a bajas concentraciones de IL-2. El clon activado es capaz de expandirse y generar una progenie de 1000 a 10000 células en 5 días. Esta expansión debe ser controlada una vez resuelto el proceso inflamatorio, y existen varios mecanismos que regulan negativamente la respuesta T. El nivel de coestimulación requerido por un linfocito T CD8<sup>+</sup> vírgen para su activación es mayor que el requerido por un linfocito T CD4<sup>+</sup> vírgen. Por lo general, el nivel expresado por las CDs resulta insuficiente, y se necesita primero de la colaboración de las CDs con los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Mediante la interacción de CD40L con CD40 en las CDs, se induce en éstas la expresión incrementada de moléculas coestimulatorias. Cabe destacar que aunque un nivel elevado de coestimulación en las CDs sea suficiente para inducir la activación y expansión clonal de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> independientemente de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se requiere de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> para la generación y mantenimiento de las células T CD8<sup>+</sup> de memoria.

Para ser presentados por el MHC-I o MHC-II los antígenos proteicos deben ser procesados. La degradación y presentación de las proteínas presentes en el citosol (proteínas provenientes de

patógenos que se replican en el citosol o incluso proteínas propias de la célula) ocurren por la vía endógena de presentación. La vía endógena comienza en el citosol, cuando los péptidos provenientes de proteínas degradadas por el complejo multienzimático llamado proteosoma son translocados al interior del retículo endoplasmático rugoso (RER) por el heterodímero TAP1/TAP2 (proteínas asociadas al procesamiento antigénico). Las moléculas del MHC-I también se encuentran en el RER, en un estado parcialmente plegado. La cadena  $\alpha$  del MHC-I se encuentra asociada inicialmente con la cadena  $\beta 2$ -microglobulina. El MHC-I luego se une al péptido, proceso que involucra proteínas accesorias. Se requiere la unión de un péptido de características determinadas a fin de estabilizar al MHC-I, liberar las proteínas accesorias y permitir su transporte a la membrana celular, donde el complejo MHC-I-péptido puede ser reconocido por el receptor de células T (TCR) específico-coreceptor CD8 en linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

Las proteínas internalizadas por fagocitosis o endocitosis, o provenientes de patógenos que se replican dentro de vesículas intracelulares, son presentadas la vía exógena. La vía exógena de presentación antigénica ocurre en los endosomas, y es mediada por un conjunto de proteasas que se activan a pH ácido y degradan a las proteínas en estos compartimientos. Las moléculas del MHC-II se sintetizan en el citosol y se translocan al RER, donde se unen a la denominada cadena invariante que impide la unión prematura de los péptidos presentes en el RER al sitio de unión del MHC-II. Otra función de la cadena invariante es la de dirigir el transporte de las moléculas del MHC-II hasta el compartimiento endosómico. Allí la cadena invariante es clivada por las proteasas catepsinas (difieren según el tejido) hasta que sólo un péptido denominado CLIP (péptido intermediario similar a la corticotropina) queda unido a la molécula MHC-II. CLIP es desplazado para permitir la unión de los péptidos al sitio de unión del MHC-II y su transporte a la superficie celular, donde el complejo MHC-II-péptido puede ser reconocido por el TCR específico-coreceptor CD4 en linfocitos T colaboradores.

Se llama presentación cruzada al proceso mediante el cual péptidos derivados de proteínas exógenas, normalmente presentadas por el MHC-II a linfocitos T CD4<sup>+</sup>, son presentadas por el MHC-I a linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las CD son las principales células capaces de realizar este tipo de presentación *in vivo* (Joffre et al. 2012). La presentación cruzada permite que antígenos incorporados por la vía endocítica o fagocítica sean presentados a linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Sería de particular importancia para la presentación de antígenos derivados de células tumoraes apoptóticas y activación de una respuesta citotóxica antitumoral.

Una tercera vía de presentación está mediada por moléculas CD1. Existen varias isoformas, dependiendo de la especie. Estructuralmente son similares a las moléculas del MHC-I y se encuentran asociadas a  $\beta$ -2 microglobulina. Presentan antígenos a linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ , a linfocitos NKT, y a linfocitos T con TCR $\gamma\delta$ . Como las moléculas del MHC, las moléculas CD1 se localizan en la superficie celular. A diferencia de las moléculas del MHC, las CD1 son luego internalizadas a compartimientos endocíticos específicos, donde pueden unir antígenos lipídicos. Estos incluyen ácidos grasos simples o fosfolípidos, y también glicolípidos más complejos isoprenoides, micolatos y lipopéptidos (Cohen et al. 2009).

## **2.2. Células dendríticas**

### **2.2.1. Origen y subtipos.**

Las CDs fueron descritas por primera vez hace más de 100 años por Paul Lagerhans. Sin embargo, fue recién en el año 1973 que Ralph Steinman reportó a las CDs como a una población presente en los ganglios linfáticos, diferente de los macrófagos (Steinman and Cohn 1973). Cinco años después Ralph Steinman describió la inigualable función de las células dendríticas de activar a los linfocitos T vírgenes. Se ha avanzado mucho desde entonces, y hoy se conoce que las DCs forman una compleja red celular, consistente de subtipos bien diferenciados, con funciones, fenotipo y localización especializada, que sondea los diferentes tejidos del organismo y modula las respuestas inmunes adaptativas.

Las CDs se diferencian en la médula ósea a partir del progenitor de CDs común, en respuesta a factores de crecimiento y de diferenciación, como el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), el ligando del receptor Flt3 (Fms-related tyrosine kinase 3/ tirosina quinasa 3 similar a Fms), y linfotóxina  $\beta$ . Las CDs pueden clasificarse en dos clases, clásicas o convencionales (CDc) y plasmocitoides (CDp), que comparten un mismo origen pero poseen un ciclo de vida muy distinto (Merad et al. 2013). Las CDc pueblan casi todos los tejidos, linfoides y no linfoides. Son presentadoras de antígeno muy efectivas, y muy buenas estimuladoras de linfocitos T, incluso en la ausencia de activación (Steinman 2012). En el estado estacionario su ubicación en los tejidos periféricos y en la zona marginal del bazo les permite adquirir antígenos de los tejidos y de la sangre. Tanto en el estado estacionario como en el estado inflamatorio transportan antígenos a la zona T de los ganglios linfáticos. Las CDp se encuentran mayormente en la sangre y en los tejidos

linfoides, e ingresan a los ganglios linfáticos por la circulación sanguínea. Presentan antígenos ineficientemente en el estado estacionario pero al activarse por patógenos obtienen capacidad presentadora y expresan grandes cantidades de IFNs de tipo I (IFN-I). Expresan a su vez un repertorio acotado de receptores de reconocimiento de patógenos (RRP) que incluyen los receptores de tipo Toll (TLR)7 y TLR8 (Liu 2005; Villadangos and Young 2008). A diferencia de las CDc, las CDp no presentan morfología dendrítica, y tampoco una alta expresión de moléculas del MHC-II. La diferenciación a una u otra clase de CD está finamente regulada por la citoquina Flt3 ligando (Lewis and Reizis 2012), y por los factores de transcripción Batf3, Id2 y IRF8 (Hashimoto et al. 2011).

Las CDs están conformadas por una población heterogénea alojada en distintos órganos, con combinaciones particulares de marcadores de superficie y funciones diferentes. Las CDs se definen como células hematopoyéticas que expresan altos niveles de moléculas del MHC-II (compartido por linfocitos B y macrófagos activados) y de la integrina CD11c (también expresada por algunas poblaciones de macrófagos, linfocitos T y B activados y células NK) (Hashimoto et al. 2011). Recientemente, se ha descrito la expresión del receptor Flt3 como un posible marcador de CDs más específico que el CD11c (Miller et al. 2012; Merad et al. 2013). El receptor Flt3 se expresaría en poblaciones hematopoyéticas y luego se extinguiría de casi todos los linajes celulares con la excepción de los precursores de CDs (Merad and Manz 2009).

En la **Tabla1** están representados los subtipos de CD murinas y su localización, adaptado del review de Miloud T. et al (Miloud et al. 2010).

Órgano	Fenotipo	Tipo de CD
<b>Órganos linfoides</b>		
Médula Ósea	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD103 <sup>+</sup> F4/80 <sup>+</sup>	Residentes
Timo	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> Sirpα <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-/low</sup> Sirpα <sup>+</sup>	Residentes
Bazo	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup>	Residentes
Ganglio linfático	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD4 <sup>+</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>low</sup> CD205 <sup>int</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>low</sup> CD205 <sup>hi</sup>	Residentes Migratorias
<b>Órganos no linfoides</b>		
Piel	<i>CD de Langerhans</i> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD207 <sup>+</sup> CD11b <sup>hi</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD103 <sup>-</sup> F4/80 <sup>+</sup> <i>CD dérmicas</i> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD207 <sup>+</sup> CD11b <sup>low</sup> EpCAM <sup>-</sup> CD103 <sup>+</sup> F4/80 <sup>-</sup>	Migratorias
Intestino	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup>	Migratorias
Riñón	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup>	Migratorias
Hígado	CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>-</sup> CD11c <sup>+</sup> MHC-II <sup>+</sup> CD8α <sup>+</sup>	Migratorias

**Tabla 1: Subtipos y localización de CDs murinas.** Adaptado de Miloud T. et al (Miloud et al. 2010).

En la piel, las CDs se dividen en dos poblaciones mayoritarias, las células de Langerhans (CL) y las CDs dérmicas (CDD). Las CL residen en la capa epidérmica de la piel. Poseen una ontogenia y distribución que las distingue del resto de las CDs. Se desarrollan a partir de precursores embrionarios que son reclutados a la piel antes del nacimiento, y son por lo tanto resistentes a la radiación. En el estado estacionario, se renuevan por proliferación *in situ*, independiente de la médula ósea. Su homeostasis es regulada por TGF-β, producido por ellas mismas y por queratinocitos. En la epidermis, son altamente fagocíticas y poseen una baja expresión de MHC-II, niveles intermedios de CD11c y altos niveles del receptor de lectinas CD207 (langerina). Durante el estado estacionario, un pequeño porcentaje migra a los ganglios linfáticos drenantes. Ante una inflamación severa, aproximadamente un 10-20% de las CL migran a los ganglios linfáticos drenantes (Tay et al. 2014). Allí serían fenotípicamente indistinguibles de otras CDs migratorias (Hashimoto et al. 2011). El rol inmunológico de las CL es todavía controversial. Las CDD en cambio son una población heterogénea, que se mantiene por el continuo aporte de

progenitores provenientes de médula ósea. La mayoría de las CDD son CD11b<sup>hi</sup> CD103<sup>-</sup>, pero también hay subpoblaciones CD11b<sup>low</sup>CD103<sup>+</sup>CD207<sup>+</sup> y CD11b<sup>-</sup> CD103<sup>-</sup> (Tay et al. 2014). Las CDD pueden encontrarse en los ganglios linfáticos drenantes en el estado inflamatorio. A contrario de las CL, las CDD son sumamente móviles, y en un estado inflamatorio son capaces de migrar a los ganglios linfáticos en 24-48 horas, mientras que el pico de migración de las CL se alcanza a los 4 días (Shklovskaya et al. 2008). Serían entonces las responsables de gatillar las respuestas iniciales a los patógenos de la piel.

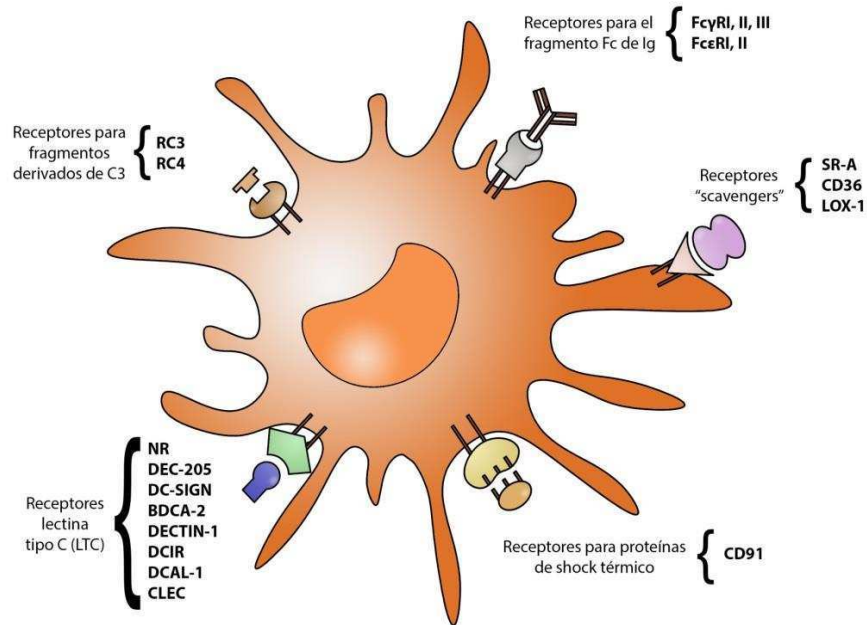
En ratones, los precursores de médula ósea representan la mayor fuente de CDs generadas *in vitro*. El GM-CSF estimula a las células de médula ósea a diferenciarse en CDs derivadas de monocitos, que poseen los marcadores CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup> (Zhu et al. 2012).

### 2.2.2. Captación antigénica

La incorporación de antígenos por las CDs, solubles o formando complejos, involucra varios mecanismos, incluyendo pinocitosis pasiva, fagocitosis activa o translocación por uniones comunicantes (*gap junctions*) (Spel et al. 2013). La presentación cruzada de estos antígenos se ve influenciada por la vía de incorporación.

Las CDs inmaduras expresan una amplia variedad de receptores endocíticos que median la internalización de antígenos (**Fig. 4**). Por un lado expresan receptores para el fragmento Fc (fragmento cristalizante) de las inmunoglobulinas (CD64, CD32, CD16 y CD23) que les permiten fagocitar antígenos que hayan interactuado con anticuerpos específicos. La internalización de antígenos por esta vía conduce a su liberación en el citosol, promoviendo su presentación cruzada por moléculas del MHC-I. Las CD también expresan receptores para componentes del complemento, como el receptor de complemento tipo III (CR3) (CD11b/CD18) y el receptor de complemento tipo IV (CR4) (CD11c/CD18). Por este medio sería posible reconocer e internalizar microorganismos opsonizados y células apoptóticas. Expresan además una gran variedad de receptores lectina de tipo C (RLC). Los RLC reconocen diferentes hidratos de carbono. Dependiendo su linaje y localización, las CDs presentan diferentes patrones de expresión de estos receptores. La internalización de antígenos por receptores RLC conduce a la presentación de antígenos a través de moléculas del MHC-II y también del MHC-I por presentación cruzada. Otro receptor expresado por las CDs es el receptor para  $\alpha$ 2-microglobulina (CD91), capaz de reconocer

e internalizar péptidos asociados a las proteínas de shock térmico hsp70 y/o hsp96, provenientes de células necróticas o apoptóticas. También expresan diferentes receptores scavenger, que pueden reconocer e internalizar diversos componentes presentes en bacterias y parásitos. El CD36 es un receptor scavenger que media la endocitosis de cuerpos apoptóticos provenientes de células infectadas o tumorales y permite la presentación cruzada a linfocitos T citotóxicos.



**Fig. 4:** Familias de receptores endocíticos expresados por las CDs que median la internalización de antígenos.

Las CDs poseen actividad macropinocítica constitutiva. Este mecanismo de endocitosis no involucra receptores y permite tomar muestras del medio que las circunda de forma permanente. Se realiza a través de la proyección de pseudópodos, y las vesículas endocíticas formadas poseen un gran tamaño (1-3  $\mu\text{m}$ ).

### 2.2.3. Inducción de la maduración

Las CDs se encuentran en el estado estacionario de forma inmadura. Residen en los tejidos periféricos, sobre todo en la piel y mucosas, donde ejercen funciones de inmunovigilancia. Migran constantemente a los ganglios linfáticos, aunque la tasa de migración en estas condiciones es baja. Esta migración basal estaría involucrada en la inducción de tolerancia periférica. Las CDs inmaduras son capaces de capturar y procesar antígenos eficientemente, y poseen una baja expresión de moléculas coestimuladoras y de moléculas del MHC-I y MHC-II.

Las CD<sub>s</sub> inmaduras expresan una gran variedad de receptores para citoquinas que les permite censar estímulos inflamatorios. También poseen receptores para PAMPs, como los receptores de tipo Toll (TLR), los RLC, los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de unión a nucleótidos) y receptores tipo RIG-I (gen I inducible por ácido retinoico). Los receptores de tipo Toll (TLR) representan unas de las vías más importantes de inducción de la maduración. Cada TLR detecta diferentes PAMPs derivados de virus, bacterias, micobacterias, hongos y parásitos. Los TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6 se encuentran en la membrana plasmática y reconocen componentes de la membrana microbiana (TLR1, TLR2 y TLR6 reconocen lipoproteínas, el TLR4 lipopolisacárido y el TLR5 flagelina). Los TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se expresan en vesículas intracelulares y reconocen ácidos nucleicos (el TLR3 reconoce ARN doble cadena, el TLR7 y TLR8 ARN simple cadena y TLR9 ADN), permitiendo detectar la incorporación de virus, patógenos intracelulares o células infectadas. El reconocimiento del ligando gatilla eventos de señalización que llevan a la secreción de citoquinas inflamatorias, IFN-I, quimioquinas y péptidos antimicrobiales. Aparte de inducir el reclutamiento de neutrófilos y macrófagos y mediar la muerte de los patógenos, se induce la maduración de las CD<sub>s</sub> (Kawai and Akira 2011).

Al percibir estímulos inflamatorios o componentes microbianos las CD<sub>s</sub> se activan y se induce su maduración. Durante el proceso de maduración se incrementa la expresión del receptor de quimioquinas CCR7, que dirige su migración a los órganos linfáticos secundarios. Por otro lado, disminuye su capacidad endocítica, restringiendo los antígenos presentados a los encontrados en la periferia. Las CD<sub>s</sub> maduras incrementan la expresión de las moléculas coestimuladoras CD40, CD80 y CD86, y también la exposición en superficie de complejos MHC-II-péptido.

A diferencia de las CD<sub>s</sub>, las CD<sub>p</sub> inmaduras se encuentran en la circulación sanguínea y en los órganos linfáticos secundarios, y no se detectan en los tejidos periféricos. Poseen una baja actividad endocítica y una diferente batería de TLR. Al madurar secretan una gran cantidad de IFN-I y cantidades moderadas de factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e IL-6. De esta manera orientan la funcionalidad de los linfocitos T, aunque son incapaces de activar linfocitos T vírgenes. También estimulan a otros tipos celulares. Activan a las células citotóxicas naturales (NK) e inducen la maduración de CD<sub>s</sub> mieloides. También estimulan la funcionalidad de los linfocitos B. Son muy importantes en el desarrollo de la inmunidad antiviral.

Se ha demostrado que las CD<sub>s</sub> son capaces de madurar tanto *in vitro* (Kalinski and Okada 2010) como *in vivo* (Drutman and Trombetta 2010). Un cóctel de maduración ampliamente



utilizado para la maduración de CD<sub>s</sub> ha sido el de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Jonuleit et al. 1997). Aunque la PGE<sub>2</sub> no se considera inflamatoria, se ha visto que su inclusión aumenta la posterior migración de CD<sub>s</sub> a los ganglios linfáticos (Scandella et al. 2002). Se han ensayado más recientemente combinaciones de TLR como agentes de maduración de CD<sub>s</sub>, obteniéndose muy buenos resultados (Warger et al. 2006; Bohnenkamp et al. 2007). Se ha demostrado, por ejemplo, que agonistas de TLR3 y TLR4 actúan en sinergismo con agonistas de TLR7, TLR8 y TLR9 en la inducción de programas Th1 polarizantes en CD<sub>c</sub> (Napolitani et al. 2005).

El imiquimod (IMI) es un agonista del TLR7, receptor asociado a vesículas intracelulares que señala a través de MyD88 activando NF- $\kappa$ B e induciendo la producción de citoquinas inflamatorias como IFN-I (Kawai and Akira 2011). El uso de IMI tópico, agonista del TLR7, ha demostrado aumentar la actividad citotóxica de CD<sub>c</sub> y CD<sub>p</sub> *in vivo* (Stary et al. 2007) y la migración de CL a los ganglios linfáticos (Suzuki et al. 2000). La aplicación tópica de IMI se ha ensayado junto con la inyección intratumoral de CD<sub>s</sub> inmaduras, llevando a una importante regresión de melanoma B16-F10 (Lee et al. 2007).

#### **2.2.4. Plasticidad de las CD y presentación antigénica.**

Las CD maduran a diferentes perfiles, dependiendo de la naturaleza del proceso infeccioso en curso. En función de los diferentes PAMPs activados, y de las citoquinas y mediadores inflamatorios presentes en el sitio de infección, las CD<sub>s</sub> maduran y producen diferentes citoquinas que les permiten direccionar la respuesta T (**Fig. 5**).

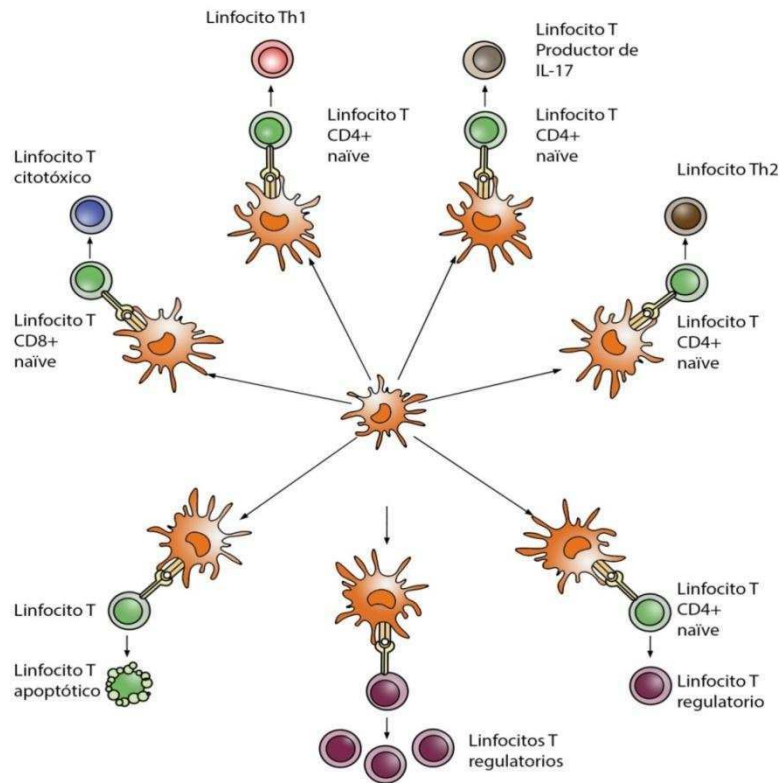


Fig. 5: Plasticidad de las CDs en la inducción de diferentes perfiles de respuesta en los linfocitos T vírgenes.

Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes al activarse proliferan y se diferencian a linfocitos T citotóxicos. Este proceso lleva aproximadamente 5 días, y durante este período las células sintetizan granzimas y perforinas, expresan la molécula FasL en su superficie y cambian el patrón de expresión de moléculas de adhesión de forma de reconocer el endotelio activado y extravasarse hacia el sitio de inyección. El reconocimiento por el TCR del péptido antigénico en una célula diana presentado por moléculas del MHC-I induce la liberación de granzimas y perforinas que llevarán a la apoptosis de la célula diana. Las células T citotóxicas también son capaces de inducir la apoptosis mediante el sistema FasL/Fas. A su vez, los linfocitos T citotóxicas liberan citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, como el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ .

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes en cambio, pueden madurar hacia diferentes perfiles. La IL-12 y otras citoquinas como la IL-18, IL-23 e IL-27, son producidas por CDs y macrófagos, y orientan su diferenciación hacia un perfil Th1. Las células Th1 producen principalmente IL-2 e IFN- $\gamma$ , y también TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ . Estos linfocitos median la respuesta a patógenos intravesiculares o indocitados al compartimiento vacuolar y favorecen la actividad de los linfocitos T citotóxicos. La IL-4 producida por células NKT y mastocitos, y la IL-13 orientan a los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes

hacia un perfil Th2. Los linfocitos Th2 median la respuesta a patógenos extracelulares. Para esto colaboran con los linfocitos B para la generación de una respuesta humoral eficaz. Los linfocitos Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes, en presencia de TGF- $\beta$ , IL-6 o IL-21 se diferencian hacia un perfil productor de IL-17. Estas células llamadas Th17 producen IL-17, IL-17F e IL-22, induciendo una fuerte inflamación de los tejidos, y se han visto involucradas en enfermedades autoinmunes (Korn et al. 2009).

Por otro lado, CD4s que poseen un fenotipo caracterizado por la baja expresión de CD40, CD80 y CD86, baja producción de IL-12 y alta producción de IL-10 median una actividad tolerogénica induciendo en los linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes un perfil regulatorio (linfocitos T regulatorios inducibles). Los linfocitos T regulatorios (Treg) median un efecto inhibitorio sobre la expansión y producción de citoquinas por células Th1, Th2 y T citotóxicos. Producen principalmente IL-10 y TGF- $\beta$ . Son caracterizados por la expresión constitutiva en su superficie de las moléculas CD4 y CD25 (cadena  $\alpha$  del receptor de alta afinidad de la IL-2) y la expresión citoplasmática de Foxp3, un factor transcripcional crucial para el desarrollo y función de los linfocitos T regulatorios. Las CD4s que poseen un bajo tenor coestimulador generan la anergia de linfocitos T vírgenes.

Como mecanismo de control del sistema inmune, los linfocitos T poseen un mecanismo de control que no les permiten proliferar indefinidamente. Al activarse, los linfocitos T expresan la molécula CTLA-4 (36 a 72 horas post-activación). CTLA-4 interactúa con CD80 y CD86 en la superficie de las CPAs, induciendo una fuerte señal inhibitoria que lleva a la apoptosis del linfocito. En los linfocitos T activados también se induce la expresión de PD-1 (Program death-1), cuyos ligandos son PD-L1 y PDL-2 que se expresan en las CPAs activadas. La interacción de PD-1 con sus ligandos conduce también a una señal inhibitoria en el linfocito T. De esta manera las CD4s activadas están también involucradas en la apoptosis de los linfocitos.

Se ha descrito que la acumulación de lípidos (triglicéridos) en las CD4s es capaz de alterar su capacidad de procesar antígenos tumorales y de presentarlos eficientemente a linfocitos T (Herber et al. 2010). Sin embargo, todavía no hay un consenso claro sobre si un alto contenido de lípidos es un marcador de disfunción en las CD4s. Los cuerpos lipídicos o vesículas lipídicas son las organelas citoplasmáticas involucradas en el almacenamiento de lípidos neutros. Están

conformadas por un centro de lípidos neutros rodeadas por una monocapa de fosfolípidos y de diversas proteínas asociadas. Están constitutivamente presentes en adipocitos y células esteroideogénicas y ausentes en casi todos los otros tipos celulares. Sin embargo, se ven incrementadas en células no-adipocíticas en contextos de inflamación ó cáncer (Bozza and Viola 2010). Nuestro grupo ha observado la acumulación de vesículas lipídicas en células de melanoma humanas irradiadas, y ha determinado que CDs derivadas de sangre periférica de pacientes de melanoma, al ser cocultivadas con estas células, se cargan de vesículas lipídicas. Estas CDs no eran capaces de estimular linfocitos alogénicos en ensayos de MLR. Sin embargo, al agregar un cóctel de citoquinas inflamatorias durante el cocultivo las CDs fueron capaces de estimular a los linfocitos T (Pizzurro et al. 2013).

### **2.2.5. Células apoptóticas, necróticas y CPAs.**

En los últimos tiempos se ha avanzado mucho en la caracterización bioquímica y genética de la muerte celular. Se recomienda realizar definiciones moleculares de los procesos de muerte celular complementando observaciones morfológicas. Se ha propuesto recientemente una clasificación funcional de procesos de muerte que incluyen a grandes rasgos: apoptosis extrínseca, apoptosis intrínseca caspasa-dependiente o caspasa-independiente, necrosis, necrosis regulada, muerte por autofagia y catástrofe mitótica (Galluzzi et al. 2012).

El término apoptosis fue utilizado por primera vez para definir el proceso celular activo y programado mediante el cual se logra eliminan células en los tejidos sin generar inflamación y con poco daño, manteniendo de esta forma la homeostasis (Kerr et al. 1972). La apoptosis es un proceso controlado genéticamente, y está acompañada por la disminución del volumen celular, la condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, muy poca modificación de organelas celulares, la lobulación de la membrana plasmática sin pérdida de su integridad y la formación de cuerpos condensados celulares llamados cuerpos apoptóticos. *In vivo*, este proceso finaliza con su incorporación por parte de fagocitos residentes. El término apoptosis esconde una gran heterogeneidad bioquímica y funcional, ya que el mismo fenotipo de muerte puede estar ser iniciado por diferentes vías (por ejemplo mediante las vías intrínseca o extrínseca). La necrosis, por otro lado, está caracterizada morfológicamente por un aumento en el volumen celular (oncosis), hinchamiento de organelas celulares, pérdida de integridad de la membrana plasmática con subsiguiente pérdida de organelas celulares (Kroemer et al. 2009). Por mucho tiempo se consideró una forma de muerte accidental y no controlada, pero se han encontrado evidencias de su

regulación por ciertas vías de transcripción de señales y mecanismos catabólicos (Festjens et al. 2006; Golstein and Kroemer 2007). Vale la pena recalcar que cuando el proceso de apoptosis no se ve acompañado por la fagocitosis, el proceso tiene un final autolítico necrótico. Esta autólisis celular fue llamada necrosis secundaria, para distinguirla de cuando el proceso de necrosis ocurre *ab initio* (necrosis primaria) (Silva 2010).

Las células en procesos de muerte liberan y exponen en su superficie moléculas que actúan como señales para las células del sistema inmune, generando respuestas inflamatorias, o anti-inflamatorias o tolerogénicas. El paradigma tradicional establece que la apoptosis es un proceso controlado e inmunológicamente “silencioso” en el cual no hay liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Los cuerpos apoptóticos suprimirían en células que los fagociten la transcripción de genes de citoquinas inflamatorias, promoverían en ellos la secreción de citoquinas anti-inflamatorias, y la presentación de antígenos por CPAs estaría modificada de tal manera que se favorecería la tolerancia inmunológica. CD8 que incorporan células apoptóticas pueden generar tolerancia antigénica en modelos de hipersensibilidad, autoinmunidad y otras respuestas inmunes (Green et al. 2009). Por otro lado, la necrosis es una forma de muerte celular resultante del daño agudo a los tejidos, y este daño lleva a la exposición de DAMPs y activación de efectores inmunes inflamatorios.

Se ha demostrado sin embargo que antígenos de células apoptóticas gatillan respuestas inmunes eficientes. Se ha comprobado la inmunogenicidad de las células apoptóticas en varios contextos. Por ejemplo, la apoptosis de células tumorales inducida por quimioterapia es capaz de activar la respuesta inmune (Casares et al. 2005). Para varias líneas celulares se ha comprobado que las células apoptóticas eran superiores a las necróticas en la presentación cruzada de antígenos asociados a tumor (Schnurr et al. 2002; Strome et al. 2002). Interesantemente se ha observado que las células apoptóticas tardías serían más inmunogénicas que las apoptóticas tempranas (Brusa et al. 2008). La superior capacidad de realizar presentación cruzada de las células apoptóticas se ha asociado a un almacenamiento más prolongado en ciertos subtipos de CD8 (Reboulet et al. 2010), y a su persistencia en el sitio de vacunación (Scheffer et al. 2003; Jusforgues-Saklani et al. 2008).

Por lo tanto, el paradigma sería una simplificación. Sería la combinación de diferentes moléculas liberadas o expuestas por las células la que determinará una muerte asociada a una

respuesta inmune inflamatoria o anti-inflamatoria (Zitvogel et al. 2010). En nuestro laboratorio se ha observado que células del melanoma murino B16-F1 irradiadas con 70 Gy y cultivadas por 48 horas consisten en 70-80% de células apoptóticas tempranas y un 12-19% de células necróticas. Estas células son incorporadas por CDs derivadas de médula ósea y son capaces de proveer una eficaz respuesta antitumoral a largo plazo (Goldszmid et al. 2003).

### **2.3. Tejidos linfoides**

El sistema linfático está conformado por los órganos linfáticos primarios, secundarios y la linfa que circula por los vasos linfáticos. Los órganos linfáticos primarios son la médula ósea y el timo, donde se generan las células inmunes. En los órganos linfáticos secundarios, los ganglios linfáticos, el bazo y los nódulos linfáticos, ocurre la presentación antigénica a los linfocitos T. Los vasos linfáticos drenan el fluido extracelular de los tejidos periféricos a través de los ganglios linfáticos y hacia el ducto torácico, que luego desemboca en la vena subclavia. La linfa lleva antígenos del tejido periférico hacia los ganglios linfáticos, y a los linfocitos desde los ganglios linfáticos hacia la sangre.

Los ganglios linfáticos son tejidos especializados en captar antígenos y ponerlos en contacto con los linfocitos T vírgenes, de forma de iniciar las respuestas inmunes adaptativas. Son estructuras altamente organizadas donde convergen los vasos linfáticos provenientes de los tejidos periféricos, llevando hacia ellos antígenos o células cargadas de antígeno como macrófagos y células dendríticas. Los linfocitos T y B vírgenes ingresan en los ganglios atravesando las vénulas del endotelio alto (HEV). En estas vénulas se expresa la adhesina de nódulo linfático periférico (PNAd), que interactúa con L-selectina/CD62L expresada en los linfocitos T y B circulantes, mediando su entrada al ganglio linfático. En los ganglios, los linfocitos B se encuentran localizados en folículos, y las células T en áreas paracorticales denominadas zonas T. Algunos de los folículos B incluyen centros germinales, donde las células B proliferan intensamente luego de reconocer su antígeno específico presentado por las CPAs y estimulados por células T colaboradoras. En el centro germinal ocurre la hipermutación somática que da lugar a anticuerpos de mayor afinidad, y el cambio de clase que permite producir anticuerpos de isotipo diferente a la IgM.

Bajo el epitelio de las mucosas y en las cercanías de los vasos linfáticos pueden encontrarse ganglios linfáticos no encapsulados llamados MALT (Tejido linfoide asociado a mucosas), que incluyen a las Placas de Peyer. Los MALT poseen folículos B, zonas T, múltiples

poblaciones de CD y células estromales especializadas, y son capaces de generar respuestas inmunes adaptativas.

Los tejidos linfoides terciarios o ectópicos se desarrollan en respuesta a inflamaciones crónicas, infecciones crónicas o autoinmunidad. Pueden generarse en sitios de inflamación o infección en casi cualquier órgano o tejido. Muchas de las señales involucradas en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios son compartidas por los órganos linfoides terciarios (Carragher et al. 2008). Comparten también características morfológicas con los órganos linfoides secundarios, como la presencia de HEV, regiones discretas de acumulación de linfocitos T y B, y redes de CDs foliculares (Nasr et al. 2007). Existen evidencias del importante rol de las CDs en el desarrollo del tejido linfoide terciario. Un estudio clínico analizando biopsias de piel de pacientes inoculados intradérmicamente con CDs maduras demostró que éstas inducen cambios en el microambiente que permiten el reclutamiento de linfocitos T vírgenes y de memoria al sitio de inoculación (Schrama et al. 2002). También se vio que eran esenciales para el mantenimiento de estos tejidos, por ejemplo en un modelo inducible de tejido linfoide asociado a los bronquios en los pulmones de ratones infectados con influenza (GeurtsvanKessel et al. 2009). El tejido linfoide terciario podría facilitar la interacción entre las células presentadoras de antígeno y los linfocitos, acelerando la cinética de la respuesta inmune en estos sitios. Se observó por ejemplo que al dirigir linfoxina- $\alpha$  a un sitio tumoral de B16-F1 se genera un tejido linfoide terciario local con inducción de una respuesta local específica T que lleva al rechazo tumoral (Schrama et al. 2008).

### **3. INMUNOTERAPIAS PARA EL CÁNCER**

#### **3.1. Inmunología del Cáncer**

Luego de muchos años de debate, actualmente es aceptado que el sistema inmune es capaz de controlar el cáncer, tanto en modelos animales como en humanos (Finn 2008). El sistema inmune juega tres roles centrales en la prevención tumoral. Al suprimir infecciones virales protege al organismo de tumores inducidos por virus. También, al eliminar patógenos y resolver cuadros inflamatorios, previene el establecimiento de un microambiente inflamatorio, que se ha relacionado con la tumorigénesis. Por último, el sistema inmune es capaz de identificar y eliminar células tumorales en base a la expresión de antígenos tumorales o la detección de alteraciones celulares (Swann and Smyth 2007). Este último mecanismo se conoce como inmunovigilancia.

Ha sido difícil obtener evidencia experimental del proceso de inmunovigilancia en humanos, ya que se necesitan grandes números de pacientes y largos períodos de seguimiento. En un estudio que finalizó en el 2004 se evaluó en 905 pacientes, receptores de trasplantes de corazón, pulmón o ambos órganos, el efecto de la inmunosupresión (utilizada para evitar el rechazo de los órganos trasplantados) en la incidencia de cáncer (Roithmaier et al. 2007). Se diagnosticaron 102 casos nuevos de cáncer en estos pacientes, lo que representa 7,1 veces más que en la población general, indicando que el sistema inmune posee un rol importante en el control del cáncer. Otra evidencia importante del proceso de inmunovigilancia fue dada por estudios en cáncer de mama. Los antígenos onconeurales, que se expresan normalmente en las neuronas, también pueden ser expresados por células de cáncer de mama. Algunas pacientes desarrollan fuertes respuestas CD8<sup>+</sup> antígeno-específicas que controlan la expansión tumoral, pero que concomitantemente resultan en enfermedades neurológicas severas generadas por un ataque autoinmune del cerebelo (Albert et al. 1998).

El proceso de eliminación de las células tumorales por el sistema inmune incluye respuestas del sistema inmune innato y adaptativo. Células efectoras del sistema inmune innato, como las células NK, NKT y T $\gamma$  $\delta$  son activadas por citoquinas inflamatorias liberadas por las células tumorales, macrófagos y células estromales de la cercanía tumoral. Estas citoquinas reclutan otras células inmunes que producen citoquinas pro-inflamatorias como IL-12 e IFN- $\gamma$ . Las células NK lisan células tumorales, al liberar perforina, y también a través de los receptores FasL y TRAIL, procesos que liberan al medio más antígenos tumorales. Las células NK interactúan con las CDs, estimulando su migración a los ganglios drenantes al tumor, donde inducen la expansión clonal de linfocitos T citotóxicos tumor-específicos. Estos linfocitos son reclutados al sitio tumoral, donde lisan a las células tumorales y producen más IFN- $\gamma$ .

Sin embargo, ocurren interacciones entre las células inmunes y las células tumorales que van modificando las propiedades de ambas poblaciones. La teoría de la inmunoedición plantea que el sistema inmune está involucrado en el control del número de células tumorales y en su inmunogenicidad, ya que se ha observado que los tumores desarrollados en ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicos (no editados) que tumores similares desarrollados en ratones inmunocompetentes (editados) (Shankaran et al. 2001). Según esta teoría el desarrollo tumoral puede dividirse en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. Durante la fase de eliminación, el sistema inmune innato, especialmente las células NK y el IFN- $\gamma$  liberado, y el



sistema inmune adaptativo, eliminan las células transformadas. En el caso de que no haya eliminación completa, la selección inmune es capaz de inducir la aparición de variantes tumorales menos inmunogénicas que logran resistir al ataque de las células efectoras. Esta es la fase de equilibrio, donde el sistema inmune no logra eliminar a las células tumorales y éstas siguen acumulando cambios, como mutaciones en el ADN o alteraciones en la expresión génica. Aunque se genere una respuesta adaptativa citotóxica contra el tumor, las células tumorales con baja expresión de antígenos tumorales o moléculas del MHC-I y MHC-II, o que expresen factores solubles pro-tumorales lograrán sobrevivir. Finalmente, si la respuesta inmune falla en eliminar a las células tumorales, el proceso resulta en la selección de las variantes que resisten, evitan o suprimen las respuesta inmune, llevando a la fase de escape. Durante la fase de escape el sistema inmune ya no es capaz de contener al tumor, resultando en un progresivo crecimiento tumoral (Kim et al. 2007; Swann and Smyth 2007).

El sistema inmune responde a las células tumorales reaccionando contra antígenos tumor-específicos (moléculas que sólo están presentes en las células tumorales) o antígenos asociados a tumor (moléculas compartidas, cuya expresión varía entre las células normales y las tumorales). Los antígenos tumor-específicos pueden ser productos de mutaciones causadas por la proliferación aberrante de las células tumorales, como por ejemplo la mutación en el gen *B-Raf* en las células tumorales de pacientes con melanoma avanzado (Jakob et al. 2012). En el caso de los tumores inducidos por agentes virales, las proteínas virales pueden actuar como antígenos tumor-específicos, como los productos de los genes *E6* y *E7* del virus del papiloma humano (Finn 2008). Uno de los primeros descubrimientos importantes en la historia de la inmunología tumoral fue la caracterización molecular del primer antígeno de melanoma (MAGE) reconocido por células T (Coulie et al. 1994). Hoy en día se conoce que este antígeno es expresado por tumores histológicamente diferentes y por una pequeña subpoblación de células normales en testículo y placenta, por lo que se trata de un antígeno asociado a tumor. Luego se descubrieron otros antígenos compartidos por células melanocíticas normales y por células de melanoma, y que se encuentran sobreexpresados en las células de melanoma, como el antígeno Melan-A. Se demostró también, en la sangre de pacientes con melanoma, linfocitos T citotóxicos capaces de reconocer estos auto-antígenos (Parmiani et al. 2007).

Uno de los desafíos de la generación de vacunas terapéuticas antitumorales es la selección apropiada de antígenos blanco y la calidad de la respuesta T de memoria pre-existente. Inducir

una respuesta inmune efectiva contra antígenos asociados a tumor significa que se debe por un lado romper la tolerancia pre-existente contra auto-antígenos, y por otro lado generar una respuesta autoinmune. Los clones T de mayor afinidad podrán ser en estos casos suprimidos por selección negativa, y las células de memoria T pre-existentes podrían estar polarizadas hacia un perfil tolerogénico, por lo que habría que inducir una fuerte respuesta tumoral capaz de reprogramar la respuesta inmune existente hacia una respuesta antitumoral, a base de células Th1 productoras de IFN- $\gamma$ . Al elegir antígenos tumor-específicos, no habrá mecanismos de selección negativa contrarrestando la acción antitumoral. El repertorio T no sería suprimido, ya que estos linfocitos no reconocen moléculas propias. En el caso de tumores establecidos, habrá seguramente una polarización de la respuesta T de memoria inducida por el tumor hacia un perfil tolerogénico, que habría que reprogramar hacia una respuesta antitumoral efectiva.

Las células tumorales son por sí mismas pobres CPAs, y se ha demostrado en modelos murinos que la generación de una respuesta antitumoral efectiva depende de la presentación de antígenos tumorales por las CDs (Diamond et al. 2011). La capacidad única de las CDs de coordinar la respuesta inmune innata y adaptativa las han hecho herramienta esencial para el desarrollo de estrategias de vacunación.

### **3.2. Desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer**

Recientemente, se ha comenzado a demostrar que el sistema inmune es capaz de influenciar el desarrollo clínico de pacientes con tumores establecidos. *Provenge (sipuleucel-T)*, vacuna inmunoterapéutica para el cáncer de próstata, constituida por CDs cargadas con la proteína antigénica PAP, ha demostrado un aumento de 4 meses en la supervivencia de pacientes en fase III de ensayos clínicos (Kantoff et al. 2010). Aunque es un efecto moderado, demuestra que la inmunoterapia puede gatillar una respuesta antitumoral en pacientes con tumores establecidos, y su aprobación por la FDA es uno de los mayores logros de la nueva era de la inmunoterapia del cáncer.

Generar la respuesta inmune acertada para combatir el cáncer requiere la participación tanto del sistema inmune innato como del adaptativo, y las CDs son las que actúan como puente decodificando e integrando las señales obtenidas por el sistema inmune innato y transmitiéndoselas al sistema inmune adaptativo. Es por eso que el diseño de vacunas basadas en CDs es tan interesante y desafiante. Es preciso hacer accesible a estas células los antígenos

tumorales, y también se deben administrar las señales correctas que induzcan su maduración. Debido al gran número de CDs del organismo, que difieren en su localización y funcionalidad, ha habido muchas y diversas estrategias de vacunación estudiadas. Una de las principales estrategias es la de generar CDs y cargarlas *ex vivo* con los antígenos tumorales, junto con los estímulos necesarios para su maduración. Otra estrategia reciente ha sido la de dirigir los antígenos directamente a ciertos subtipos de CDs *in vivo*, mediante el uso de proteínas quiméricas compuestas de un anticuerpo con especificidad para algún receptor de membrana de ese subtipo celular, conjugado al antígeno tumoral (Banchereau et al. 2009).

Los mecanismos de inmunosupresión juegan un rol importante en la evasión tumoral del sistema inmune en cáncer. Una de las vías más relevantes está mediada por la molécula inmunosupresora CTLA-4, cuya expresión se ve incrementada en linfocitos T activados. Al unirse a sus blancos, las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, media la inhibición de la proliferación de los linfocitos T y la producción de IL-2 (Brunner et al. 1999). El anticuerpo monoclonal Ipilimumab, antagonista de la molécula CTLA-4, ha sido aprobado para su uso en melanoma metastásico y ha probado ser un tratamiento efectivo (Weber 2009). Otros anticuerpos monoclonales, cuyos blancos son moléculas inmunosupresoras, se encuentran ahora en ensayos clínicos para MC, como los antagonistas de la proteína de muerte programada I (PD-1/ CD279) y el ligando de PD-1 (PD-L1 o B7-H1) (Melero et al. 2013). El receptor inhibitorio PD-1 se encuentra sobre-expresado en linfocitos T con exposición antigénica de largo plazo. Uno de sus ligandos, PD-L1, se encuentra sobre-expresado dentro del microambiente tumoral, por células tumorales o macrófagos infiltrantes, regulando negativamente la respuesta efectora T (Hamid et al. 2013). Estos hallazgos sugieren fuertemente que en el organismo portador de un tumor existen linfocitos específicos antitumorales que se encuentran inactivos y que podrían ser estimulados o reactivados por medio de inmunoterapias.

Otro agente inmunomodulador es la ciclofosfamida. La ciclofosfamida es un agente quimioterapéutico alquilante, utilizado para el tratamiento de leucemias, linfomas y tumores sólidos (Mitchell 2003). La ciclofosfamida posee efectos moduladores en la respuesta inmune innata y adaptativa. Su administración induce linfopenia transitoria, asociada con la proliferación y expansión de linfocitos T antígeno-específicos (Salem et al. 2007), una reducción en el número de T reg (Ghiringhelli et al. 2004; Lutsiak et al. 2005) y aumentando la función de los linfocitos T infiltrantes del estroma tumoral (Ibe et al. 2001). Se ha observado también que la ciclofosfamida

induce niveles incrementados de de IFN-I y de otras citoquinas inflamatorias en suero y la activación de células mieloides CD11b<sup>+</sup> (Schiavoni et al. 2000; Salem et al. 2007). Recientemente se ha observado que la ciclofosfamida genera la movilización sistémica de CDs que se postula mejoraría las respuestas antitumorales (Nakahara et al. 2010; Radojcic et al. 2010; Schiavoni et al. 2011).

En nuestro laboratorio se han desarrollado terapias inmunoterapéuticas contra el MC, una de las cuales se encuentra en fase II/III de ensayos clínicos en pacientes (Ensayo clínico CASVAC 0401). Esta estrategia consiste en la administración de células alogénicas apoptóticas/necróticas de melanoma (CSF470) aplicadas junto con el bacillo Calmette Gurin (BCG) y GM-CSF como adyuvantes (Barrio et al. 2006). En el estudio de fase I se ha observado un aumento significativo en la calidad de vida de los pacientes vacunados con respecto a los tratados con IFN $\alpha$ -2b, y el 67 % sigue libre de enfermedad luego de 11 años de seguimiento (estadios IIB, IIC y III). Por otro lado, se ha realizado un ensayo de fase I con otra estrategia inmunoterapéutica que consiste en CDs autólogas cargadas con células alogénicas apoptóticas/necróticas de melanoma, que resultó segura y que fue capaz de inducir inmunidad específica contra antígenos tumorales (von Euw et al. 2008).

### **3.3. Modelo murino de melanoma B16-F1 y antecedentes de la línea de trabajo**

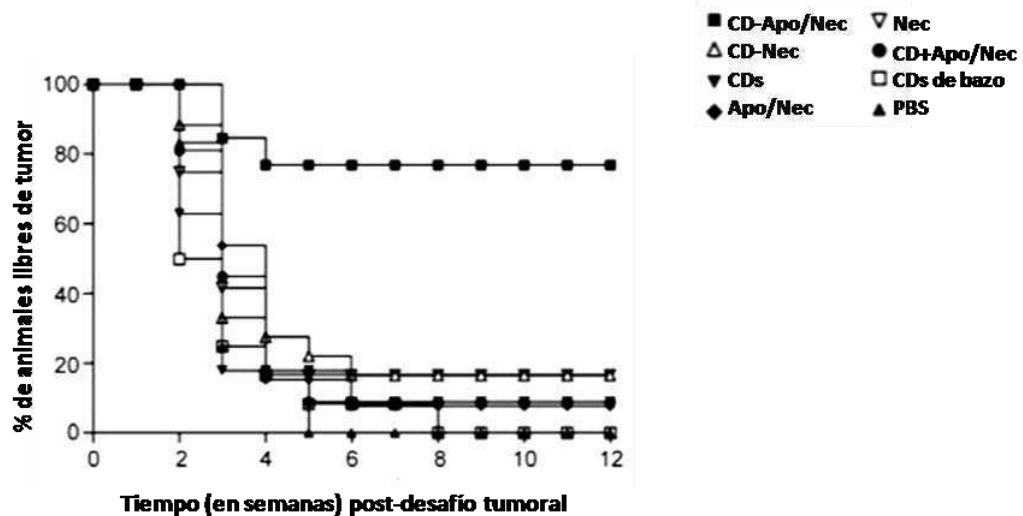
La línea murina B16 fue obtenida de un melanoma espontáneo originada en un ratón C57BL/6 (Fidler and Nicolson 1976). Esta línea es considerada pobremente inmunogénica, ya que expresa bajos niveles de moléculas del MHC-I, dificultando su reconocimiento por linfocitos CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, la línea B16 expresa varios antígenos asociados a tumor, como la proteína Trp-2 o la proteína pmel17 (análogo a gp100 en humanos), que pueden actuar como blanco de linfocitos T. Por medio de inmunoterapias es posible obtener respuestas antitumorales, demostrando la inmunogenicidad de los tumores de B16 (Becker et al. 2010).

La línea B16-F1 fue derivada de metástasis pulmonares producidas por la inyección i.v. de células B16 (Raz et al. 1980). Este modelo de trasplante singeneico en ratones C57BL6 inmunocompetentes resulta apropiado para estudiar o modular respuestas inmunes anti-melanoma.

Sin embargo, hay que considerar que la línea B16-F1 es muy agresiva y que la tasa de crecimiento de los tumores trasplantados es mucho mayor que la tasa de crecimiento de los

tumores en pacientes. Es dificultoso utilizar este modelo para el estudio de estrategias terapéuticas, ya que el crecimiento tumoral le gana a la generación de la respuesta inmune. Por esta razón, en este trabajo se utiliza el modelo de B16-F1 para probar vacunaciones preventivas, es decir primero realizando la vacunación y luego el desafío tumoral. De esta manera se da lugar a una ventana temporal para que se desarrolle la respuesta antitumoral.

En el laboratorio comenzó a trabajar con este modelo experimental de melanoma hace más de 10 años, con el objetivo de diseñar inmunoterapias que pudiesen ser finalmente adaptadas para su uso en pacientes. Se comenzó evaluando diferentes formas de cargar a las CDs con antígenos provenientes de células de melanoma. Se comprobó que la estrategia que daba mayor protección antitumoral era cargando CDs derivadas de médula ósea con células B16-F1 apoptóticas y necróticas de melanoma irradiadas con rayos- $\gamma$  (70 Gy) (**Fig.6**).



**Fig. 6: Protección antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec** (4 dosis de vacuna). Curva de supervivencia por el método de Kaplan Meier de animales vacunados con CDs cocultivadas 24 hs con células (irradiadas con 70 Gy) apoptóticas y necróticas de melanoma (**Apo/Nec**), CDs cocultivadas 24 hs con células necróticas (**CDs-Nec**) obtenidas por congelamiento y descongelamiento, CDs solas (**CDs**), células apoptóticas y necróticas de melanomasolas (**Apo/Nec**), células necróticas solas (**Nec**), CDs junto con Apo/Nec sin previo cocultivo de 24 hs (**CDs+Apo/Nec**), CDs provenientes de bazo, y un grupo control con vehículo (**PBS**).

Las células irradiadas fueron plaquetadas por 48 horas antes de ser utilizadas, y consistían a este tiempo de 70-80% células apoptóticas y 12-19% células necróticas o en apoptosis secundaria. Estas células irradiadas (Apo/Nec) indujeron protección antitumoral, mientras que las células necróticas (Nec) fracasaron. La protección antitumoral generada por la vacuna CD-Apo/Nec fue de

largo plazo, dependiente de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Goldszmid et al. 2003). Sin embargo, al evaluar la migración a ganglios drenantes de CDs ó células CD-Apo/Nec utilizando el modelo de inyección en la almohadilla plantar, se observó una migración de tan sólo el 0,5% de las células inyectadas al ganglio drenante (ganglio poplíteo). Otros trabajos han demostrado que la inyección subcutánea de CDs murinas derivadas de médula ósea induce su migración a los ganglios linfáticos drenantes (Lappin et al. 1999), pero que esta acción es cooperativa y depende del número de CDs inyectadas, llegando a un máximo al inyectar  $2 \times 10^6$  células. El número de CDs maduras que llegan a los ganglios linfáticos determinaría la magnitud de la proliferación de linfocitos T (Martín-Fontecha et al. 2003). En nuestro modelo, donde el porcentaje de células CD-Apo/Nec que migra a los ganglios drenantes es baja, no está claro cómo es que la vacuna logra una eficiente respuesta antitumoral T dependiente.

**OBJETIVOS**

El principal objetivo de este trabajo de Tesis fue analizar el mecanismo de inmunoprotección antitumoral inducido por la vacunación con CD-Apo/Nec.

En la búsqueda de una vacuna más eficiente, otro importante objetivo consistió en buscar condiciones de generación o de aplicación de las células Apo/Nec que potenciaran su capacidad inmunoestimuladora.

**OBJETIVOS ESPECÍFICOS****CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC**

1. Estudiar el proceso de cocultivo de las CDs con células Apo/Nec.
2. Determinar las diferentes poblaciones celulares que constituyen las CDs derivadas de médula ósea.
3. Evaluar la importancia de las poblaciones CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> en la generación de la protección antitumoral.

**CAPÍTULO II: MECANISMO DE INMUNOPROTECCIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC**

4. Determinar si la protección antitumoral generada por la vacunación es sistémica, cualidad necesaria para prevenir metástasis a órganos distantes.
5. Estudiar la presencia de células tumorales remanentes en los sitios de desafío tumoral de animales protegidos y la estabilidad a largo plazo de la protección.
6. Definir si la vacunación genera una respuesta humoral tumor-específica y si esto está asociado con la protección antitumoral.
7. Analizar la migración de las células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes y bazo.
8. Analizar las poblaciones de células inmunes que interactúan con las células CD-Apo/Nec en el sitio de vacunación, comparativamente con vacunas a base de CDs y Apo/Nec que no inducen protección.
9. Analizar la inducción de una respuesta tolerogénica en respuesta a la vacunación.
10. Determinar si la proliferación de linfocitos vírgenes tumor-específicos se produce en los ganglios drenantes y/o en el sitio de vacunación.
11. Estudiar comparativamente las subpoblaciones de linfocitos T en animales vacunados protegidos y no protegidos.

**CAPÍTULO III: BÚSQUEDA DE CONDICIONES QUE POTENCIEN LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LA VACUNA CD-APO/NEC**

12. Ensayar diferentes condiciones de maduración *in vitro* de las CDs y de precondicionamiento del huésped que pudieran incrementar la capacidad inmunoestimuladora y antitumoral de las células CD-Apo/Nec.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. MODELOS ANIMALES Y CULTIVOS CELULARES

#### 1.1. Animales

Los ratones utilizados fueron mantenidos en condiciones libres de patógenos en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir, y los estudios fueron realizados en concordancia con las recomendaciones de las guías éticas utilizadas por la CICUAL del mismo instituto (and and Council 2010).

##### **1.1.1. Desarrollo de melanoma cutáneo en ratones de la cepa C57BL/6**

Durante el trabajo de Tesis Doctoral se utilizó como modelo de melanoma cutáneo la cepa murina C57BL/6 junto con la línea celular de melanoma murino singenético B16-F1. Los ratones de la cepa C57BL/6 fueron adquiridos en el bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Buenos Aires), así como en el bioterio de la Fundación Instituto Leloir (Buenos Aires).

##### **1.1.2. Ratones transgénicos OT-I**

Los ratones transgénicos OT-I se utilizaron para la evaluación de la respuesta antígeno específica de linfocitos CD8<sup>+</sup>. Fueron criados y genotipificados por la Dra. Paula Berguer (Fundación Instituto Leloir). Los ratones OT-I poseen insertos en los genes *Tcra-V2yTcrb-V5*, y poseen solamente un clon de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con TCR específico para el péptido SIINFEKL (residuos 257-264 de la proteína ovoalbúmina) asociado a H-2K<sup>b</sup>. Los ratones OT-I poseen el fondo genético de la cepa C57BL/6.

##### **1.1.3. Cepa Balb/c**

La cepa de ratones Balb/c (H-2<sup>d</sup>) fue utilizada como fuente de linfocitos alogénicos a la cepa C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>). Estos ratones fueron adquiridos en el bioterio de la Fundación instituto Leloir.

#### 1.2. Líneas celulares y cultivos primarios

##### **1.2.1. B16-F1 y B16-F1 OVA**

La línea celular B16-F1 se mantuvo en cultivo en medio DMEM (Sigma), 10% suero fetal bobino (FBS) (Natocor), suplementado con penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (Richet). La

línea B16-F1 OVA, cedida gentilmente por el Dr. Paulo Dellabona (H. San Raffaele Scientific Institute, Milán), se generó a partir de la línea B16-F1, que fue establemente transfectada con un vector de expresión de ovoalbúmina (OVA). Esta línea se mantuvo en cultivo en medio RPMI-1640 (Sigma), 10% FBS, suplementado con penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Para mantener la expresión de OVA en la línea B16-F1 OVA se realizaron ciclos de 2 semanas de crecimiento en medio de cultivo suplementado con higromicina B 100 µg/ml (Invivogen). El cultivo de ambas líneas se realizó en estufa a 37°C, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. En ambas líneas se controló la ausencia de micoplasma por tinción con el colorante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como se describe en Materiales y Métodos (1.3). Para su crecimiento en cultivo se realizaron pasajes con diluciones desde 1/3 a 1/20, levantándose las células cuando se encontraban en un 80%-90% de confluencia. Para levantarlas se extrajo todo el medio condicionado, que fue centrifugado 5 minutos a 300g. Luego se realizó un lavado suave de la base de la placa con PBS y se incubó 5 minutos en estufa a 37°C con EDTA 0,5 mM. Luego se agregó sobrenadante del medio condicionado (tres veces el volumen utilizado anteriormente de EDTA) y se volvieron a sembrar en la dilución necesaria complementando con medio nuevo completo. Para la criopreservación de las líneas, las células se resuspendieron en 70% FBS, 20% del medio de cultivo correspondiente y 10% de DMSO, en una concentración máxima de 1x10<sup>7</sup> células por criotubo de 2 ml. Los criotubos se transportaron en hielo a un freezer de -80°C, donde se mantuvieron por al menos 4 horas envueltos en algodón. Luego se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido libre de micoplasma.

### ***1.2.2. Células dendríticas derivadas de médula ósea (CDs)***

Las CDs murinas se diferenciaron a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 machos, de entre 2 y 3 meses de edad. Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>. En esterilidad (en mesada utilizando un mechero y material quirúrgico esterilizado) se removió la piel y se procedió a extraer el fémur y tibia, que se colocaron en PBS frío. Se transportaron a una campana de flujo laminar, donde se procedió a colocar el fémur y tibia en etanol 70% por 3 minutos. A continuación, utilizando material quirúrgico estéril, se removió el tejido muscular que cubría los huesos con gasa estéril. Luego se volvieron a introducir los huesos otros 3 minutos en etanol 70% y posteriormente se colocaron en una placa con PBS. Se cortaron las epífisis de los extremos, y con una jeringa para insulina 27G se procedió a inyectar PBS en el interior del hueso para extraer el tejido blando. Se transfirió el PBS conteniendo el tejido blando, se dejó reposar aproximadamente 20 segundos para permitir la decantación de las partículas más grandes. Se tomaron las células en suspensión y se realizaron 3 lavados con PBS. Luego las células se

resuspendieron en medio completo para crecimiento de CDs murinas, a una razón de  $3 \times 10^6$  precursores por placa de Petri de bacteriología, en 8 ml de medio completo. El medio completo para CDs consistió en medio RPMI-1640 (Sigma), 10% FBS (Natocor, lote 942), suplementado con penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 ug/ml y GM-CSF murino 0,02  $\mu$ g/ml (Peprotech). Los precursores de CDs se contaron, considerando a todas las células presentes en la médula ósea, exceptuando a los linfocitos y glóbulos rojos. Las placas se mantuvieron en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. A los 3 días se agregaron 8 ml de medio completo por placa de Petri. A los 2 días se tomó la mitad del sobrenadante de cultivo de cada placa, y se centrifugó 5 minutos a 300 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular en igual volumen de medio completo para CDs, agregándose 8 ml por placa de Petri. A los 2 días se consideró completo el proceso de diferenciación (7 días de cultivo totales). Las CDs se extrajeron realizando varios lavados de las placas con PBS.

### **1.3. Detección de Micoplasma**

En esterilidad se preparó una placa de Petri de 35 mm de diámetro, en cuyo interior se colocó un cubreobjetos previamente flameado en alcohol. Se sembraron las células a ser analizadas sobre el portaobjetos, en 1 ml del medio de cultivo correspondiente. Se incubó en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> durante 24-48 horas, hasta llegar a un 40%-50% de confluencia. Los siguientes pasos se realizaron por seguridad en campana de extracción de gases. Sin descartar el medio, se agregó 1 ml de fijador recién preparado (metanol: ácido acético 3:1) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se descartó el medio con fijador y se volvió a agregar 1 ml de fijador por otros 5 minutos. Se repitió una vez más y luego se agregó el colorante de Hoechst (Sigma), 1  $\mu$ g en 1ml de agua destilada. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz, y luego se lavó 2 veces con agua destilada. Se dejó secar unos minutos protegido de la luz y se montó sobre un portaobjetos con 10  $\mu$ l de Mowiol, quedando las células contenidas entre el portaobjetos y el cubreobjetos. El preparado fue observado al microscopio de fluorescencia utilizando el filtro color azul (filtro DAPI). La contaminación con micoplasma puede ser evidenciada por un puntillado citoplasmático.

### **1.4. Irradiación de las líneas celulares B16-F1 y B16-F1 OVA**

Se descongelaron las células rápidamente, pasándolas a un falcon con 18 ml de PBS por criotubo de 2 ml (dilución 1/10). Se centrifugó 5 minutos a 300 g y se resuspendió a las B16-F1 en medio DMEM o a las B16-F1 OVA en medio RPMI. Se colocaron dentro de un falcon de 50 ml y se

completó con medio correspondiente para que al cerrar el falcon no quedase aire en el interior. Se selló la tapa con parafilm y se envolvió en dos guantes de látex para terminar de impermeabilizar. Se trasladaron en hielo y se irradiaron a 70 Gy en un Siemens Lineal Accelerator (Instituto Alexander Fleming). Se trasladaron rápidamente en hielo hasta el cuarto de cultivos celulares, donde se contaron las células viables, se centrifugó 5 minutos a 300 g, y se volvieron a criopreservar para un futuro uso.

### 1.5. Marcación con CFSE

El CFSE (carboxi-fluorescein diacetato succinimidil éster, Molecular probes, Invitrogen) difunde pasivamente dentro de las células. Es incoloro hasta que sus grupos acetato son clivados por esterasas intracelulares, formando carboxi-fluorescein succinimidil éster fluorescente. El grupo succinimidil éster reacciona con aminas celulares formando conjugados que son retenidos dentro de la célula. De esta manera es posible marcar células para su posterior estudio *in vivo*. Por otro lado, como al dividirse una célula las proteínas celulares se dividen en partes iguales entre las células hijas, éstas presentarán una baja en su nivel de fluorescencia. Es por eso que la marcación con CFSE puede utilizarse también para seguir los niveles de proliferación de una población celular *in vitro* o *in vivo*. Para marcar las células, primero se realizó un lavado con PBS 5% FBS. Se agregó 200  $\mu$ l cada  $1 \times 10^6$  células de la solución de tinción (CFSE 10  $\mu$ M en PBS 5% FBS). Se incubó 15 minutos en estufa a 37°C y se realizó un lavado con PBS 5% FBS. Para finalizar se realizaron 2 lavados más con PBS.

### 1.6. Marcación con PKH26

El reactivo PKH26® (Sigma) posee colas alifáticas que se intercalan entre los fosfolípidos de las membranas celulares, pudiendo así marcar células para su posterior detección *in vivo*. Posee su máximo de excitación a 551 nm y su máximo de emisión a 567nm. Para realizar la marcación, las células se levantaron y se realizó un lavado en PBS. Se removió todo el sobrenadante y se resuspendieron las células en diluyente C (Sigma) a razón de 0,5 ml cada  $1 \times 10^7$  células. Luego se agregó la solución de tinción 20  $\mu$ M de PHK26 en diluyente C a razón también de 0,5 ml cada  $1 \times 10^7$  células (concentración final 10  $\mu$ M de PKH26). Se mezcló por pipeteo y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente, protegido de la luz. La reacción se frenó agregando un volumen de FBS e incubando 1 minuto. Luego se agregó un volumen de medio completo de cultivo, y se centrifugó 5 minutos a 300g. Se descartó el sobrenadante, y se realizaron dos lavados más en medio completo.

### 1.7. Marcación con la sonda fluorescente DiR

Se incubaron las células 30 minutos a 37°C en la solución de tinción, que consistió en PBS 0,88 µg/ml DiR (Diiodoheptadecil-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide) (Invitrogen), 0,5% etanol absoluto. Luego se realizaron dos lavados con PBS. Los animales se analizaron luego en un bioluminómetro IVIS Lumina (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA).

### 1.8. Separación magnética de células CD11c<sup>+</sup> de CD11c<sup>-</sup> o PDCA1<sup>+</sup> de PDCA1<sup>-</sup>

Se trabajó siempre en frío. Se realizaron dos lavados de las células con PBS y se resuspendió el pellet en buffer MACS (PBS 0,5% BSA, 2mM EDTA, pH 7,2) a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/400 µl. Se incubó por 30 minutos con el anticuerpo anti-CD16/CD32 para bloquear los receptores de la cadena Fc de las IgG y evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos acoplados a las microesferas magnéticas. Se realizó un lavado con buffer MACS, se agregaron 100 µl cada  $1 \times 10^8$  células de microesferas magnéticas anti CD11c o anti PDCA-1 (Miltenyi Biotech) y se incubó a 4-8°C por 15 minutos. Se realizó un lavado con buffer MACS y se resuspendió el pellet en 500 µl de buffer MACS por  $1 \times 10^8$  células. Se pasó la suspensión por una columna MS (Miltenyi Biotech) y se eluyó 3 veces con 500 µl de buffer MACS, obteniéndose en el eluido la fracción CD11c<sup>-</sup> o PDCA-1<sup>-</sup>. La fracción retenida en la columna se recuperó vaciando la columna con un émbolo.

## 2. VACUNACIÓN

### 2.1. Preparación de la vacuna CD-Apo/Nec

#### 2.1.1. Vacuna CD-Apo/Nec o CD-Apo/Nec OVA

Se plaquearon células B16-F1 o B16-F1 OVA irradiadas en cajas de Petri y se mantuvieron en cultivo en el medio y condiciones correspondientes durante 48 horas, para que se desarrollen los procesos de apoptosis y necrosis (células Apo/Nec). Entonces, se levantaron las células realizando un lavado con PBS e incubando con EDTA 0,5 mM. Se conservaron las células levantadas, las células en suspensión en el medio condicionado y las levantadas accidentalmente al realizar el lavado con PBS. Se contaron las células viables presentes en el pool de células irradiadas (Apo/Nec) y se centrifugaron 5 minutos a 300 g. Por otro lado, se levantaron CDs murinas (aisladas 7 días antes de médula ósea), como se describe en Materiales y Métodos (1.2.2). Se contó el número de células y se centrifugó 5 minutos a 300 g. Se resuspendieron los pellets de CDs y de Apo/Nec o Apo/Nec OVA en el medio condicionado de las CDs en una concentración de  $1 \times 10^6$

células/ml. Luego se cocultivaron en tubos ppt (Sempercare) en una relación 1:1 durante 24 horas en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas, se levantaron las células y se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar las proteínas del suero.

### ***2.1.2. Vacuna CD-Apo/Nec con el agregado de cóctel de citoquinas***

Se realizaron los pasos descritos en Materiales y Métodos (2.1.1) para la generación de la vacuna, pero se agregó durante el cocultivo de las CDs con las Apo/Nec un cóctel consistente en de TNF- $\alpha$  10 ng/ml, IL-1- $\beta$  10 ng/ml, IL-6 100 ng/ml (todos de Peprotech) y PGE<sub>2</sub> 1  $\mu$ g/ml (Calbiochem). Como control positivo, se realizó un tratamiento al que se le agregó 2  $\mu$ g/ml de LPS a CDs, resuspendidas en su medio condicionado a una densidad de 1x10<sup>6</sup>/ml. También se realizó un tratamiento en el que se resuspendieron las Apo/Nec en el medio condicionado de las CDs a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Todos los cultivos se mantuvieron durante 24 horas en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas, se levantaron las células y se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar las proteínas del suero.

### ***2.1.3. Vacuna CD-Apo/Nec con el agregado de ligandos de TLR***

Se realizaron los pasos descritos en Materiales y Métodos (2.1.1) para la generación de la vacuna, pero se agregó durante el cocultivo de las CDs con las Apo/Nec un cóctel consistente en Poly I:C 30  $\mu$ g/ml (Invivogen), Imiquimod 10  $\mu$ g/ml (Glenmark Pharmaceuticals), o Poly I:C 30  $\mu$ g/ml, Imiquimod 10  $\mu$ g/ml, PGE<sub>2</sub> 10  $\mu$ g/ml, o Poly I:C 30  $\mu$ g/ml, Imiquimod 3  $\mu$ g/ml, PGE<sub>2</sub> 10  $\mu$ g/ml. Como control positivo se realizó un tratamiento al que se le agregó 2  $\mu$ g/ml de LPS a CDs, resuspendidas en su medio condicionado a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml. También se realizó un tratamiento en el que se resuspendieron las Apo/Nec en el medio condicionado de las CDs a una densidad de 1x10<sup>6</sup> células/ml. Todos los cultivos se mantuvieron durante 24 horas en estufa a 37°C en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Pasadas las 24 horas, se levantaron las células y se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar las proteínas del suero.

## **2.2. Esquema de vacunación con CD-Apo/Nec y desafío tumoral**

### ***2.2.1. Vacuna CD-Apo/Nec***

Se utilizaron ratones C57BL/6 machos de 2 a 3 meses de edad. Una dosis de vacuna consistió en 2x10<sup>4</sup> CD-Apo/Nec (proveniente del cocultivo de 24 horas de 2x10<sup>4</sup> CDs con 2x10<sup>4</sup> Apo/Nec). Se administraron 4 dosis de vacuna (una dosis de vacuna por semana durante cuatro semanas). Las inyecciones se realizaron en la zona inguinal, utilizando una jeringa de insulina 27G. En algunos

experimentos se alternó entre los dos flancos y en otros fueron todos en el mismo flanco. El desafío tumoral se realizó una semana después de inyectada la última dosis de vacuna (exceptuando la vacunación CD-Apo/Nec CIC post). Se administraron  $1,3 \times 10^4$  células B16-F1 o B16-F1 OVA viables de forma s.c. en el flanco opuesto al flanco de la última vacunación con CD-Apo/Nec, utilizando una jeringa de insulina 27G.

### ***2.2.2. Vacuna CD-Apo/Nec IMI (imiquimod)***

Se depiló con gillette la zona de vacunación. Media hora antes de cada inyección se aplicó en la zona aproximadamente 20  $\mu$ l de crema imiquimod (1-(2-metilpropil)-1H-imidazo[4,5-c]quinolin-4-amina) 5% (Imiquimore, Laboratorios Panalab) utilizando una espátula pequeña. Se repitió la aplicación a las 24 horas.

### ***2.2.3. Prueba de toxicidad a la ciclofosfamida (ciclofosfamida)***

Se administraron dos dosis de ciclofosfamida (Microsules Argentina) (dosis de 0, 1 o 2 mg por ratón, en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril apirógena) de forma i.p. con un intervalo de 27 días. Se evaluó la evolución del peso hasta los 113 días post-inyección.

### ***2.2.4. Vacuna CD-Apo/Nec CIC***

Se administró ciclofosfamida (1mg por ratón, en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril apirógena) de forma i.p. 24 horas antes de la primera y tercera inyección de vacuna.

### ***2.2.5. Vacuna CD-Apo/Nec CIC post***

El esquema de vacunación se realizó a posteriori del desafío tumoral. Se comenzó con el esquema de 4 vacunas al día 15 post-desafío. Se administró ciclofosfamida (1mg por ratón, en 100  $\mu$ l de agua destilada estéril apirógena) de forma i.p. 24 horas antes de la primera y tercera inyección de vacuna.

## **3. DISGREGACIÓN DE TEJIDOS ANIMALES**

Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de CO<sub>2</sub>.

### **3.1. Ganglios linfáticos**

Los ganglios linfáticos se extrajeron utilizando material quirúrgico y luego se removieron los restos de tejido circundante utilizando dos portaobjetos esmerilados. Los ganglios se colocaron entonces

en placas de Petri de 35 mm de diámetro en hielo, con 200 µl de RPMI 0,6 mg/ml de colagenasa Tipo IV (Sigma). Se cortaron los ganglios con tijera y utilizando el émbolo de una jeringa se presionaron los trozos contra el fondo de la placa para liberar las células. Se pasaron las células a un eppendorf y se agregaron 200 µl de RPMI con 0,5 U/ml de DNAsa I (Invitrogen). Se vortexó y se incubó 30 minutos en baño a 37°C, vortexeando cada 10 minutos. Al finalizar la incubación se agregó 1 ml de RPMI y se centrifugó 5 minutos a 300 g a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y el pellet se resuspendió en PBS frío. Las células se pasaron por un filtro de 40 µm, presionando los restos de tejido con el émbolo de una jeringa.

### **3.2 Ganglios linfáticos II**

Los ganglios linfáticos se extrajeron utilizando material quirúrgico y luego se removieron los restos de tejido circundante utilizando dos portaobjetos esmerilados. Los ganglios se colocaron entonces en placas de Petri de 35 mm de diámetro en hielo, con aproximadamente 1 ml de PBS. Se cortaron los ganglios con tijera y utilizando el émbolo de una jeringa se presionaron los trozos contra el fondo de la placa para liberar las células. Las células se pasaron por un filtro de 40 µm, presionando los restos de tejido con el émbolo de una jeringa.

### **3.3. Bazo**

Se extrajo el bazo con material quirúrgico y se colocó en una caja de Petri de 35 mm de diámetro con 1 ml de PBS helado, donde se cortó en pequeños trozos. Con el émbolo de una jeringa, se procedió a presionar el tejido contra el fondo de la placa para liberar las células. Se pasaron las células a un falcon y se centrifugaron 5 minutos a 300 g. Se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de buffer ACK (amonio-cloro-potasio) para lisar los glóbulos rojos. Se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y rápidamente se agregaron 9 ml de PBS helado y se centrifugó 5 minutos a 300 g a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó PBS. Luego se filtró para remover los restos de tejido con un filtro de 40 µm (Becton Dickinson).

### **3.4. Tumor**

Se extrajo el tumor y se colocó en una caja de Petri de 35 mm de diámetro con PBS helado. Se cortó en trozos utilizando una tijera o bisturí, y los trozos se colocaron sobre una malla metálica de 80 µm. Con el émbolo de una jeringa, se procedió a presionar el tejido contra la malla para liberar las células. Se lavó la malla con PBS helado y el filtrado se centrifugó 5 minutos a 300 g. Se descartó el sobrenadante y se incubó 30 minutos a 37°C con 400 µl de RPMI con colagenasa IA



(Sigma) 0,2 mg/ml más 400 µl de RPMI con 0,5 U/ml de DNAsa I. Se vortexeó cada 10 minutos. Finalizada la incubación, se filtró utilizando un filtro de 40 µm (Becton Dickinson).

### 3.5. Sitio de inyección

Se depiló al ratón en la zona inguinal utilizando una gillette. Se realizó una pequeña incisión en la zona ventral, y se procedió a despegar la piel del animal del peritoneo. Se extrajo una zona de aprox 1 cm<sup>2</sup> de piel de la zona inguinal, correspondiente a la zona de inyección de la vacuna CD-Apo/Nec. Se colocó en hielo en una placa de Petri de 35 mm, con 400 µl de RPMI con colagenasa tipo IV 0,6 mg/ml (Sigma). Se cortó en trozos con tijera, y se traspasaron a un eppendorf de 2ml. Se agregaron 400 ul de RPMI con 0,5 U/ml de DNAsa-I y se vortexeó. Se incubó 30 minutos en baño a 37°C, vortexeando cada 10 minutos. Se agregó 1 ml de RPMI y se centrifugó 5 minutos a 300g. Con una p1000, se extrajo el sobrenadante, teniendo cuidado de no extraer tejido. Se agregó 1 ml de EDTA 0,5 mM, se vortexeó, y se incubó 10 minutos a 37°C. Al finalizar la incubación se volvió a vortexear y se agregaron 0,5 ml de RPMI 5% FBS y se centrifugó 5 minutos a 300 g. Se descartó el sobrenadante con una p1000 y se resuspendió en PBS. Se pasó por un filtro de 40 µm, presionando los restos de tejido con el émbolo de una jeringa.

## 4. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS CD-APO/NEC O DE LAS CÉLULAS PROVENIENTES DE RATONES VACUNADOS

### 4.1. Expresión de marcadores de superficie

Se realizaron determinaciones por inmunofluorescencia de la expresión en superficie de las moléculas I-A<sup>b</sup>, CD11c, CD80, CD86, CD8, CD4, F4/80 o CD14 (**Tabla 2**). Se utilizaron 5x10<sup>5</sup> células por tratamiento, que se incubaron 30 minutos en hielo con el anticuerpo anti-CD16/32 o con suero normal de cabra (cuando en la reacción había que utilizar un secundario anti-rat) para bloquear los sitios de unión inespecíficos. Sin lavar, se agregó el anticuerpo primario, que se incubó 1 hora en hielo. Se agregó PBS y se centrifugó 5 minutos a 300 g. El pellet se resuspendió en PBS y se agregó el anticuerpo secundario en los casos correspondientes. Se incubó 30 minutos y luego se agregó PBS y se centrifugó 5 minutos a 300 g. Se utilizaron las mismas condiciones para las incubaciones con los controles de isotipo. Luego las células se fijaron con PFA 2% y se analizaron por citometría de flujo con un FACSCalibur de Becton Dickinson. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software WINMDI2.9.

Molécula reconocida	Clon	Expresada por
CD11c (Integrina $\alpha_x$ )	HL3	CDs, linfocitos intestinales intraepiteliales CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> y linfocitos T activados en ganglios linfáticos.
F4/80	6F12	Células del linaje mieloide con potencial de desarrollo hacia CDs, incluyendo subtipos de CDs y macrófagos de bazo y ganglios linfáticos, macrófagos peritoneales y monocitos de sangre periférica.
CD14	rmC5-3	Macrófagos, monocitos, macrófagos y CDs cultivadas <i>in vitro</i> derivados de médula ósea.
CD8 $\alpha$	53-6.7	Linfocitos T citotóxicos expresan el heterodímero $\alpha\beta$ . Algunos subtipos de linfocitos intraepiteliales, Linfocitos T $\gamma\delta$ y CDs expresan sólo la cadena $\alpha$ .
CD4	GK1.5	Gran proporción de timocitos, linfocitos T colaboradores y un subtipo de NK y de CDs de bazo.
Complejo CD3	17A2	Timocitos y linfocitos T maduros.
I-A <sup>b</sup>	AF6-120.1	CPAs (CDs, linfocitos B, macrófagos y células endoteliales)
CD80	1G10/B7	Constitutivamente en CDs, monocitos y macrófagos peritoneales. Se induce su expresión en ciertos linfocitos B activados.
CD86	GL1	Amplio espectro de leucocitos incluyendo linfocitos B, linfocitos T, CDs y astrocitos.

**Tabla 2: Marcadores de superficie utilizados por citometría de flujo.** Los datos de expresión de los distintos marcadores de superficie fueron obtenidos de las hojas de datos provistas por los fabricantes de los anticuerpos.

#### 4.2. Captación de células Apo/Nec por CDs

Se analizó el porcentaje de CDs que incorporaron células Apo/Nec. Con este fin, previo al cocultivo se tiñó a las CDs con CFSE y a las Apo/Nec con PKH26, como se describe en Materiales y Métodos (1.5 y 1.6 respectivamente). Luego se realizó el cocultivo, como se describe en Materiales y Métodos (2.1.1). Como control de unión inespecífica se realizaron cocultivos de la misma duración pero a 4°C. A determinados tiempos de cocultivo se levantaron las células y se fijaron con PFA 2%. Las muestras se analizaron por citometría de flujo con un FACSCalibur de Becton Dickinson (Fundación Instituto Leloir). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software CellQuest o WINMDI2.9. Las CD que fagocitaron restos de Apo/Nec se evidenciaron como células doble positivas.

#### 4.3. Migración *in vivo* de las células de la vacuna CD-Apo/Nec

Previo al cocultivo se tiñó a las CDs con CFSE y a las Apo/Nec con PKH26, como se describe en Materiales y Métodos (1.5 y 1.6 respectivamente). Luego se realizó el cocultivo por 24 horas, como se describe en Materiales y Métodos (2.1.1). Se inyectó una dosis de vacuna CD-Apo/Nec de forma s.c en la zona inguinal, y a las 24 horas se sacrificaron los animales, se extrajeron los ganglios drenantes utilizando material quirúrgico, y se disgregaron como se describe en Materiales y Métodos (3.1). Las células se fijaron con PFA 2% y se analizaron por citometría de flujo con el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson (Fundación Instituto Leloir). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software WINMDI 2.9.

#### 4.4. Análisis del cocultivo de CDs con Apo/Nec por microscopía electrónica de transmisión

Se realizó el cocultivo de las CDs con las células Apo/Nec, como se describe en Materiales y Métodos (2.1.1). A 0, 6, 12, 24 y 48 horas de comenzado el cocultivo, se levantaron las células como se describe Materiales y Métodos (2.1.1) utilizando DMEM en vez de PBS y se reservaron en hielo. Se centrifugaron  $1 \times 10^7$  células y se resuspendieron para su fijación en 0,5 ml de glutaraldehído 2,5% por 3 horas. Luego se realizó otra centrifugación para extraer el fijador, y las células se resuspendieron en un buffer de lavado proveído por el servicio de microscopía electrónica de transmisión del LANAIS (Facultad de Medicina de la UBA, Buenos Aires). En el LANAIS, las células fueron post-fijadas con tetroxido de osmio y luego con acetato de uranilo. Las muestras fueron procesadas por técnicos del LANAIS y las fotos sacadas en el microscopio electrónico Zeiss EM 10C, del mismo establecimiento.

#### 4.5. Cuantificación de vesículas lipídicas neutras en CDs

Con el fin de detectar las vesículas lipídicas en las CDs o CD-Apo/Nec, se utilizó la sonda para lípidos neutros bodipy 493/503 (Molecular Probes, Invitrogen). Se utilizaron  $5 \times 10^5$  células por tratamiento, que se incubaron 1 hora en hielo con 1  $\mu$ l del anticuerpo anti-CD11c-PE (clon HL3, Becton Dickinson). Luego se realizó un lavado con PBS y el pellet se resuspendió en 100  $\mu$ l de PFA 3%. Se realizó una incubación de 10 minutos en hielo y luego se realizó otro lavado con PBS. Posteriormente las células se incubaron en la solución de tinción, compuesta por Bodipy 10  $\mu$ g/ml y H $\ddot{o}$ chst (Sigma) 1  $\mu$ g/ml en PBS, 15 minutos a temperatura ambiente. Para finalizar, se realizaron 2 lavados con PBS, y las células se montaron con Mowiol sobre un portaobjetos para su análisis por microscopía de fluorescencia (Carl Zeiss). El tamaño y número de vesículas se analizaron utilizando el software ImageJ.

## 5. RESPUESTA HUMORAL

### 5.1. ELISA para detección de anticuerpos anti-B16-F1

Para la obtención de los sueros se extrajo sangre de los animales por punción cardíaca. Se incubó 30 minutos a 37°C. Luego se centrifugó a 700 g y se conservó el sobrenadante (suero). Manteniéndolo en hielo, se fraccionó en alícuotas de 50 µl, que se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Para realizar los ELISA, en placas de 96 pocillos con fondo chato, se plaquearon  $2,5 \times 10^4$  células B16-F1 por pocillo, en 100 µl de DMEM 2% FBS. Se dejó hasta el día siguiente en cultivo en estufa a 37°C, en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>. Se verificó la formación de una monocapa homogénea, y se fijó incubando 15 minutos a temperatura ambiente con 100 µl por pocillo de formol 4%. Se retiró el exceso de fijador y se guardó sellado en parafilm en freezer a -20°C. Para realizar el ELISA las placas se hidrataron 5 minutos con 100 µl de PBS. Con el fin de detectar los antígenos intracelulares se incubó 15 minutos a temperatura ambiente con saponina 0,05%. Luego se realizó un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con 150 µl de PBS 1% BSA. A continuación, se realizó un lavado de 5 minutos con 150 µl de PBS 0,1% BSA y se procedió a incubar con los sueros. Los sueros fueron diluidos 1/100, 1/500 y 1/1000 en PBS 0,1% BSA, y se utilizaron 75 µl por pocillo. Se incubó 2 horas a temperatura ambiente, y se realizaron 3 lavados de 5 minutos con 150 µl de PBS 0,1% BSA. Al finalizar, se agregó una dilución 1/3000 del anticuerpo rabbit anti-IgG/IgM conjugado a HRP (Dako) y se incubó 45 minutos a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con 150 µl de PBS 0,1% BSA, y luego se agregó 100 µl de sustrato OPD (1mg/ml en buffer citrato pH4,5, 0,1M con 0,02% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 30 volúmenes). Para detener la reacción se utilizaron 100µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8N. Las placas se leyeron con un lector de ELISA (Bio-Rad) a 490 nm.

## 6. RESPUESTA CELULAR

### 6.1. Proliferación *in vivo* de linfocitos CD8<sup>+</sup> OVA-específicos

Se realizó el esquema completo de vacunación utilizando la línea B16-F1 OVA irradiadas como fuente de antígeno para las CD8 (vacuna CD-Apo/Nec OVA). El día de la última vacunación se sacrificaron dos ratones OT-I, y se aislaron las células provenientes de los ganglios linfáticos. Brevemente, los ganglios linfáticos se extrajeron en esterilidad utilizando material quirúrgico y luego se removieron los restos de tejido circundante utilizando dos portaobjetos esmerilados. Los

ganglios se colocaron entonces en placas de Petri de 35 mm de diámetro en hielo, con 1ml de PBS helado. Se cortaron los ganglios con tijera y utilizando el émbolo de una jeringa se presionaron los trozos contra el fondo de la placa para liberar las células. Las células se pasaron por un filtro de 40  $\mu\text{m}$ , presionando los restos de tejido con el émbolo de una jeringa y luego se contaron con una cámara de Neubauer. Las células se marcaron con CFSE 10  $\mu\text{M}$ , como se describe en Materiales y Métodos (1.5), y  $1 \times 10^6$  células se inyectaron i.v. en 100  $\mu\text{l}$  de PBS 3 horas antes de la última vacunación. Se vacunó con  $2 \times 10^5$  CD-Apo/Nec OVA de forma s.c. en la zona inguinal, y 3 días después se sacrificaron los animales y se extrajeron los ganglios inguinales. Se aislaron las células provenientes de los ganglios linfáticos como se describió previamente (sin realizarlo en un ambiente estéril). Se realizó la marcación de superficie con anticuerpo anti-CD8 como se describe en Materiales y Métodos (4.1) y se analizó por citometría de flujo.

### **6.2. Inducción de linfocitos Treg *in vivo***

Se administraron 1 o 4 dosis de vacuna CD-Apo/Nec. A los 5 días se extrajo el ganglio inguinal ipsilateral y se depositó en una placa con 1ml de RPMI frío. Se cortó en trozos más pequeños con tijera, y se terminó de disgregar presionando con el émbolo de una jeringa contra el fondo de la placa. Luego se pasó la suspensión celular por un filtro de 40  $\mu\text{m}$  (Becton Dickinson) y se contaron las células. Se utilizaron  $5 \times 10^5$  células por tratamiento, que se resuspendieron en 40  $\mu\text{l}$  de PBS 2% FBS y se incubaron con 1  $\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-CD4 y 2  $\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-CD25 20 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS y se resuspendió el pellet en 1ml de Fixation Buffer (Becton Dickinson) frío, y se incubó 30 minutos a 4°C en oscuridad. Se centrifugó a 500 g para remover el fijador y se resuspendió el pellet en 1 ml de Permeabilization Buffer (Becton Dickinson) y se incubó 30 minutos a 37°C en oscuridad. Se centrifugó a 500g y se resuspendió el pellet en 20  $\mu\text{l}$  de PBS 2% FBS. Se agregó 1,5  $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti-Foxp3 y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Se realizó un lavado con PBS 2% FBS centrifugando a 500g. Se resuspendió en 300  $\mu\text{l}$  de PBS y se analizó por citometría de flujo con un FACSCalibur de Becton Dickinson (Fundación Instituto Leloir). Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software WINMDI 2.9.

### **6.3. Reacción linfocitaria mixta *in vitro***

Se obtuvieron linfocitos provenientes de ganglios inguinales y axilares de ratones Balb/c. Para ello, los ganglios linfáticos se extrajeron en esterilidad utilizando material quirúrgico, y luego se removieron los restos de tejido circundante utilizando dos portaobjetos esmerilados. Los ganglios

se colocaron entonces en placas de Petri de 35 mm de diámetro en hielo, con 1ml de PBS helado. Se cortaron los ganglios con tijera y utilizando el émbolo de una jeringa se presionaron los trozos contra el fondo de la placa para liberar las células. Sepasó la suspensión celular por un filtro de 40  $\mu\text{m}$ , presionando los restos de tejido con el émbolo de la jeringa y luego se contaron las células con una cámara de Neubauer. Se resuspendieron en RPMI 10% FBS a  $2 \times 10^6$  células/ml (para tener  $2 \times 10^5$  linfocitos cada 100  $\mu\text{l}$ ). Los diferentes grupos de células estimuladoras (CDs o CD-Apo/Nec bajo los diferentes tratamientos, o Apo/Nec) fueron incubadas con 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de mitomicina C (Delta Farma) en PBS por 30 minutos a 37 °C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS 5% FBS y se resuspendieron en RPMI 10% FBS a  $2 \times 10^5$  CD/ml. Esto es para tener  $2 \times 10^4$  células estimuladoras en 100  $\mu\text{l}$  (dilución 1/10 con respecto a los linfocitos). Se realizaron diluciones seriadas 1/10 (dilución 1/100 con respecto a los linfocitos) y 1/100 (dilución 1/1000 con respecto a los linfocitos). Se plaquearon 100  $\mu\text{l}$  de linfocitos y 100  $\mu\text{l}$  de estimuladoras en una placa de 96 pocillos en fondo en U. En el caso de los controles de CDs solas o Apo/Nec solas, se completaron los 100  $\mu\text{l}$  restantes con RPMI 10% FBS. Las células se mantuvieron 4 días en cultivo, realizándose un pulso con timidina tritiada (0,5  $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$ ) durante las últimas 18 horas de cultivo. Luego se realizó la cosecha con el contador de centelleo Nunc Cell Harvester 8 (Nalge Nunc International Corp.) y se determinaron las cuentas por minuto (cpm) de radiactividad incorporada mediante el uso de un contador de centelleo líquido (Wallac 1214 Rackbeta, Pharmacia).

#### 6.4. Eliminación *in vivo* de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>

Los hibridomas GK 1.5 y TIB 105, productores de IgG de rata con especificidad para la molécula CD4 murina y CD8 murina respectivamente, fueron cedidos por la Dra. Annunziata Vechi (Instituto Mario Negri, Milán). Se mantuvieron en cultivo en medio RPMI suplementado con 10% FBS, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Para la obtención de anticuerpos monoclonales  $1 \times 10^6$  células fueron inyectadas i.p. en ratones atímicos previamente tratados con 0,5 ml de Pristane (Sigma). A los 15 días se extrajo la ascitis por punción peritoneal. La concentración proteica fue determinada por el método de Lowry.

Se realizó el esquema completo de vacunación con CD-Apo/Nec y una semana después se realizó un desafío tumoral con células B16-F1 viables, como se describe en Materiales y Métodos (2.2.1). En los animales que se mantuvieron libres de tumor 3 meses después de realizado el desafío tumoral se eliminó los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (n=8) o T CD8<sup>+</sup> (n=7) utilizando anticuerpos anti-CD4 o anti-CD8, o inyectados con una IgG control (n=5). Se administraron 831  $\mu\text{g}$  de proteína total (3 dosis de

277 µg en tres días sucesivos) de ascitis i.p. y se analizó la aparición de tumores por palpación hasta dos meses después de la depleción. Por otro lado, para realizar una eliminación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> por un período de tiempo más prolongado se realizó la depleción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> como se describió anteriormente, administrando un refuerzo semanal de 250 µg de proteína total surante un mes. La eliminación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup> fue controlada en el bazo de animales sin vacunar inyectados de forma i.p. con las mismas concentraciones de ascitis.

## **7. PROCESADO DE MUESTRAS DE PIEL PARA INMUNOFLORESCENCIA O INMUNOHISTOQUÍMICA**

### **7.1 Inclusión de muestras de piel en parafina**

Se extrajo utilizando material de cirugía aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de piel de la zona inguinal, correspondiente al sitio de inyección. Los tejidos fueron extendidos sobre pequeños recortes de cartón utilizando alfileres de acero inoxidable y se fijaron en formol 4% por 48 horas. Luego, éstos fueron cortados en tiras de aproximadamente 2 mm de ancho, y se colocaron dentro de grillas plásticas. Los tejidos fueron entonces deshidratados mediante pasajes sucesivos por etanol a concentraciones crecientes (3 incubaciones de 30 minutos en etanol 96% y 3 incubaciones de 30 minutos en etanol 100%), luego xilol (2 incubaciones de 30 minutos), y finalmente incluidos en parafina (2 incubaciones de 40 minutos en parafina a 60°C). Se armaron los tacos y se realizaron cortes histológicos consecutivos de 4-7 µm en el Hospital Eva Perón (Partido de San Martín, Buenos Aires).

### **7.2 Procesado de muestras de piel para corte por criostato**

Se extrajo utilizando material de cirugía aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> de piel de la zona inguinal, correspondiente al sitio de inyección. Los tejidos fueron extendidos sobre pequeños recortes de cartón utilizando alfileres de acero inoxidable y se congelaron a -80°C. En el Hospital Eva Perón (Partido de San Martín, Buenos Aires), se realizaron cortes con criostato consecutivos de aproximadamente 10 µm, y se fijaron los tejidos con acetona. Los cortes se conservaron a -20°C.

### **7.3 Inmunofluorescencia de los sitios de inyección**

Los cortes obtenidos por congelación y posterior corte por criostato, como se describe en Materiales y Métodos (7.2), fueron colocados en cámara húmeda e hidratados mediante una incubación de 15 minutos en 50 µl de PBS. Luego se extrajo el PBS y se bloqueó con 50 µl de suero

normal de cabra al 10% 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una incubación de 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 3**), diluidos 1/50 en 50 µl de suero normal de cabra al 10%. Se realizaron dos lavados con PBS y se incubó 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes diluidos 1/200 en 50 µl de suero normal de cabra al 10%. Se realizaron dos lavados más con PBS y finalmente se montaron para su observación al microscopio confocal Zeiss LSM pascal 5 utilizando Mowiol (Sigma). Las imágenes fueron analizadas utilizando el programa Image J.

Molécula reconocida	Clon	Expresada por
CD11c (Integrina $\alpha_x$ )	HL3	CDs, linfocitos intestinales intraepiteliales CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup> y linfocitos T activados en ganglios linfáticos.
F4/80	6F12	Células del linaje mieloide con potencial de desarrollo hacia CDs, incluyendo subtipos de CDs y macrófagos de bazo y ganglios linfáticos, macrófagos peritoneales y monocitos de sangre periférica.
Ly6G	1A8	En médula ósea las células de mayor tamaño, predominantemente granulocitos, no células linfoides o eritroides; en la periferia granulocitos.
CD8 $\alpha$	53-6.7	Linfocitos T citotóxicos expresan el heterodímero $\alpha\beta$ . Algunos subtipos de linfocitos intraepiteliales, Linfocitos T $\gamma\delta$ y CDs expresan sólo la cadena $\alpha$ .
CD4	GK1.5	Gran proporción de timocitos, linfocitos T colaboradores y un subtipo de NK y de CDs de bazo.

**Tabla 3: Marcadores de superficie utilizados por inmunofluorescencia.** Los datos de expresión de los distintos marcadores de superficie fueron obtenidos de las hojas de datos provistas por los fabricantes de los anticuerpos.

#### 7.4 Inmunohistoquímica para detección de la expresión de PNA<sub>d</sub>

Se utilizaron sitios de inyección previamente incluidos en parafina, como se describe en Materiales y Métodos (7.1). Al momento de utilizar los cortes, éstos se desparafinizaron sumergiéndolos en xilol, y luego por pasajes sucesivos por diluciones crecientes de etanol, y finalmente en agua destilada. La fijación con formol genera modificaciones químicas en las proteínas, por lo que algunos epítopes quedan “enmascarados” y no pueden ser detectados por los anticuerpos específicos. Es por eso que se procedió primero a realizar un desenmascaramiento de epítopes incubando los cortes 15 minutos a 95°C en buffer citrato 10 mM pH6. Luego los cortes fueron lavados 2 veces con PBS y los sitios de pegado inespecíficos bloqueados mediante la incubación



con suero de cabra 10% durante 30 minutos. Los cortes fueron incubados hasta el día siguiente con el anticuerpo primario (rata anti-PNAd, Becton Dickinson). Luego se realizó la inactivación de peroxidasas internas incubando 30 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4%. Se realizaron otros dos lavados con PBS y se volvió a incubar con el anticuerpo primario por 1 hora a temperatura ambiente. Luego de realizar otro lavado con PBS las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario (anticuerpo anti-rata conjugado a peroxidasa, Jackson) 2 horas a temperatura ambiente. Luego de realizar otros dos lavados con PBS, los cortes se incubaron con el sustrato de la peroxidasa DAB (0,7 mg/ml, 0,13% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 vol).

### 8. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

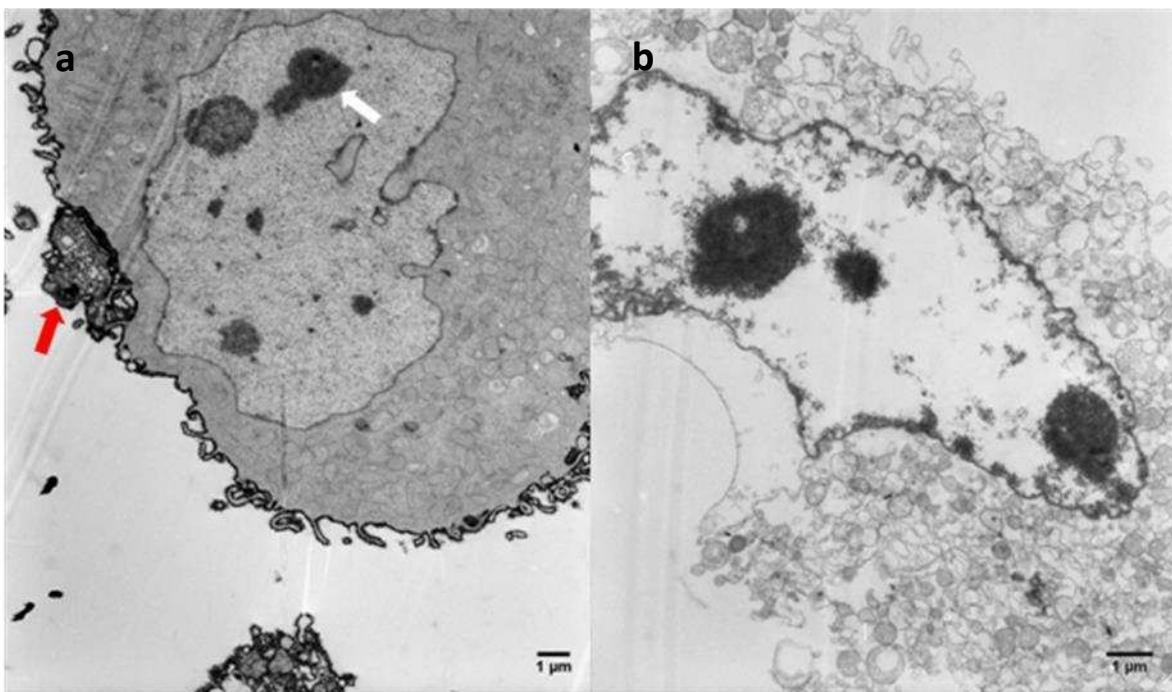
Para realizar los análisis estadísticos se utilizaron dos programas. El Graph pad prism versión 5.01 (GraphPad Software, San Diego California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) se utilizó para los análisis de ANOVA y comparaciones de Tuckey o Dunnet, así como para los análisis con la prueba de Student. Los análisis de diseño en bloques al azar se realizaron con el Infostat versión 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). Para todos los análisis se utilizó un  $\alpha=0,05$  y la siguiente nomenclatura: \* $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$  y \*\*\*  $p<0,001$ .

**CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC****1.1. Cocultivo de las CDs con células Apo/Nec: características ultraestructurales de las CDs y porcentaje de fagocitosis.**

Se procedió a analizar el cocultivo *in vitro* de las CDs con células Apo/Nec. Se utilizaron dos aproximaciones. Por un lado se realizó el estudio por microscopía electrónica de transmisión a diferentes tiempos de cocultivo, técnica que permite observar con detalle las características ultraestructurales de las células. Por otro lado, se evaluó el porcentaje de fagocitosis de Apo/Nec por las CDs mediante citometría de flujo.

Se analizaron por microscopía electrónica características ultraestructurales de las CDs y las Apo/Nec previo al cocultivo, y luego las CDs a las 6, 12, 24 y 48 horas de cocultivo con las Apo/Nec. Los cocultivos se realizaron como se describe en Materiales y Métodos (2.1.1). Finalizados los tiempos de cocultivo correspondientes, las células se fijaron y se prepararon como se describe en Materiales y Métodos (4.4).

Pudo observarse que las células Apo/Nec previo al cocultivo constaban de una mezcla heterogénea de células con morfología apoptótica (membrana celular íntegra pero con lobulaciones o protuberancias, condensación y fragmentación de la cromatina) (**Fig. 7a**) y otras con morfología necrótica (pérdida de integridad de la membrana celular, citoplasma liberado de organelas celulares) (**Fig. 7b**).



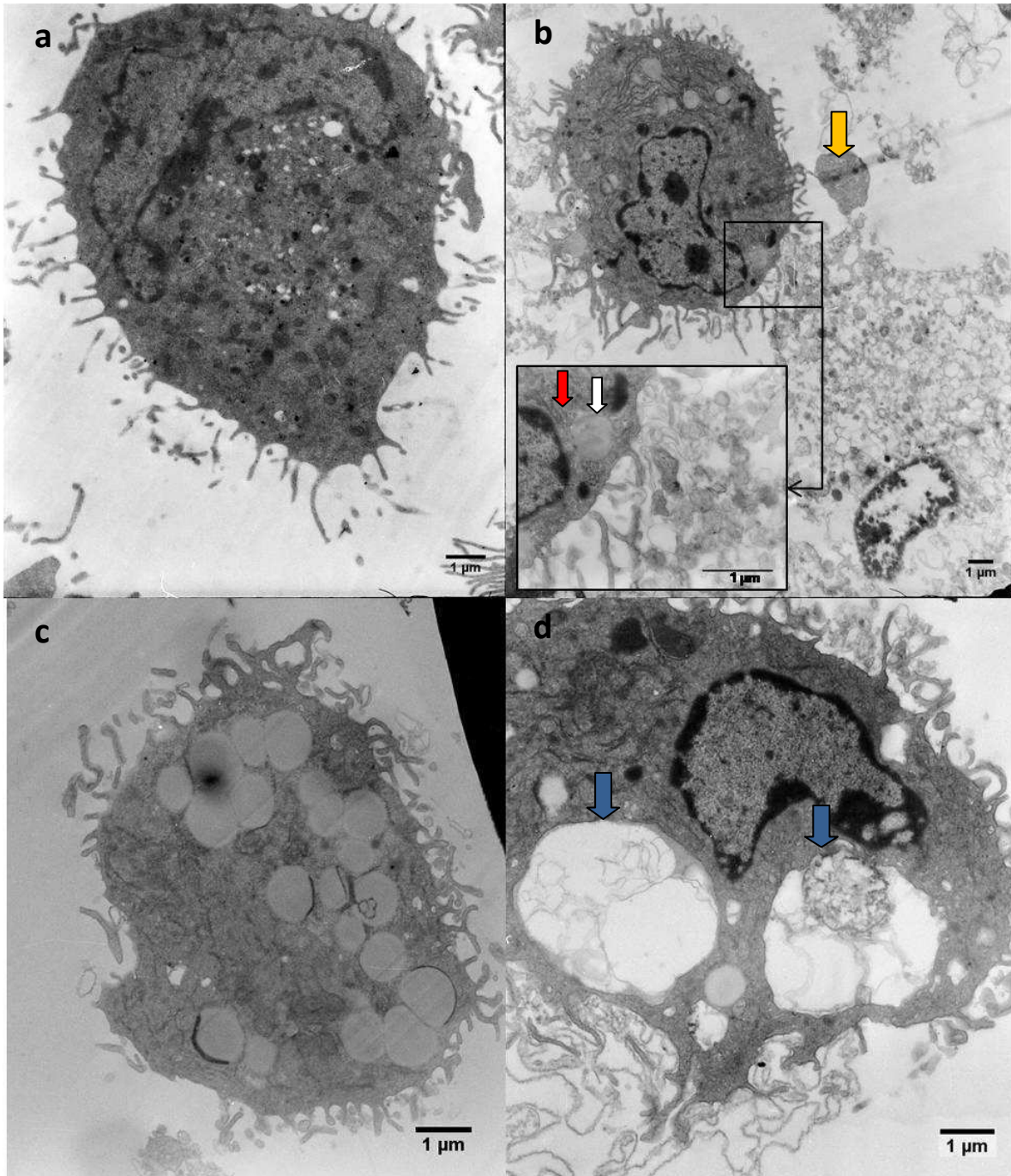
**Fig. 7: Caracterización ultraestructural de las Apo/Nec de 48 horas post-irradiación. (a)** Apo/Nec con morfología apoptótica temprana. Se observó condensación y fragmentación de la cromatina (flecha blanca) y la formación de cuerpos apoptóticos (flecha roja). La membrana plasmática no se vio alterada, preservando las organelas y el contenido citoplasmático. **(b)** Apo/Nec con morfología apoptótica tardía o necrótica. Se observó la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, el citoplasma translúcido, y fragmentación y pérdida de la cromatina.

Fue posible identificar a las CDs en el cocultivo debido a su pequeño tamaño (entre 10 y 20  $\mu\text{m}$ ) en comparación con las Apo/Nec, y por su núcleo irregular con bandas periféricas de heterocromatina (Steinman et al. 1975). Se observó en su citoplasma cuerpos densos correspondientes a lisosomas (**Fig. 8a**).

Previo al cocultivo con las células Apo/Nec, las CDs mostraron numerosas prolongaciones citoplasmáticas, concordantes con una morfología inmadura (**Fig. 8a-d**). Estas prolongaciones se encontraban rodeando restos de Apo/Nec (**Fig.8b**). A las 12 horas fue posible observar un gran número de fagosomas tempranos (**Fig. 8d**), mientras que a las 48 horas de cocultivo se identificaron vesículas lisosomales o fagolisosomales en el citoplasma de las CDs (**Fig. 8g-h**). A las 24 y 48 horas de cocultivo se observó una disminución en el número y la longitud de las prolongaciones citoplasmáticas (**Fig. 8e-g**).

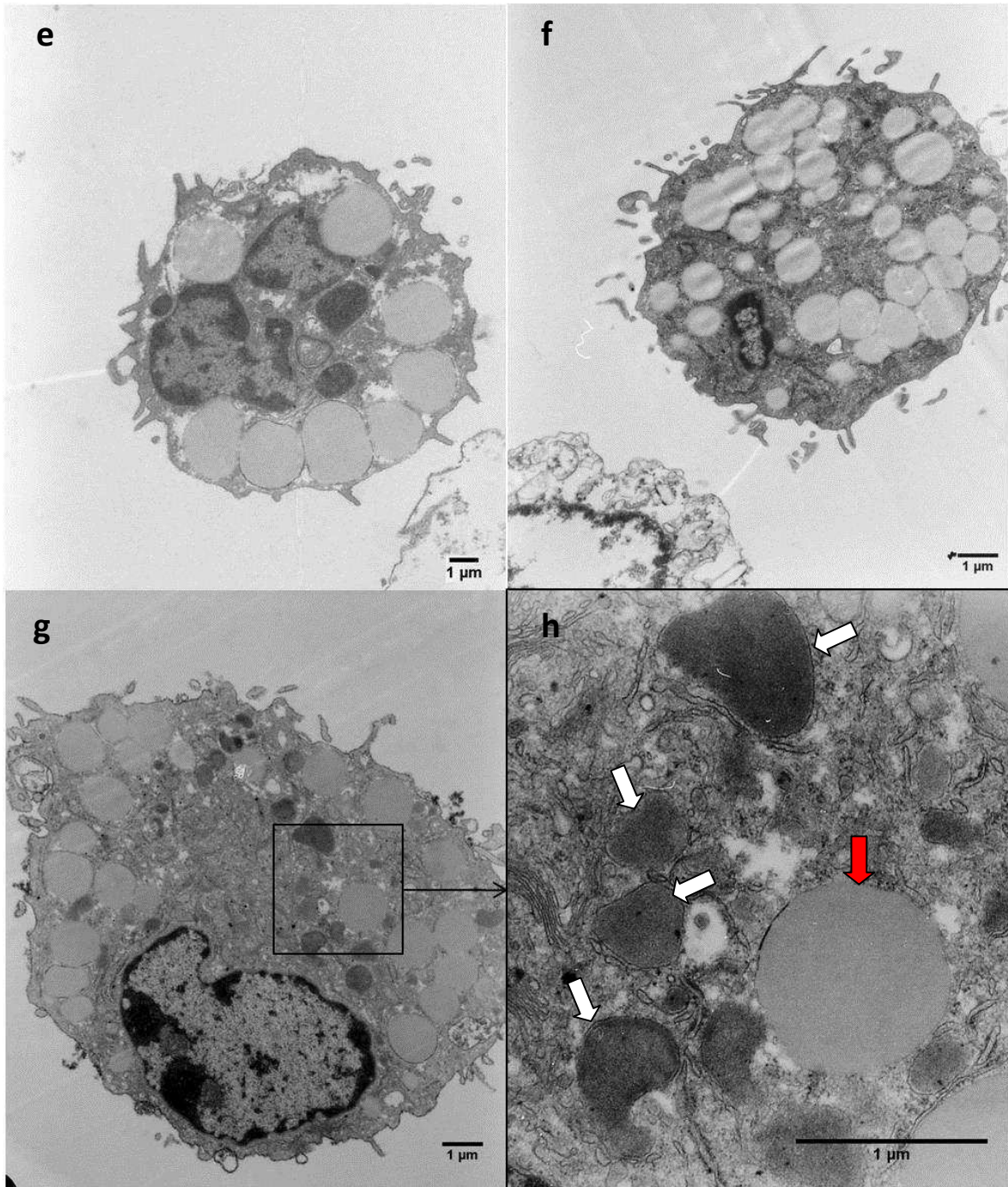
Por otro lado, al analizar las CDs a los diferentes tiempos de cocultivo con las Apo/Nec, se pudo detectar en el citoplasma una acumulación progresiva de vesículas de baja densidad. A las 6

horas de cocultivo, se visualizaron estas vesículas entre los pliegues del retículo endoplasmático (**Fig. 8b**), y a las 24 horas ocupaban casi la totalidad del citoplasma (**Fig. 8e-f**). Postulamos que podría tratarse de vesículas lipídicas, ya que poseen una apariencia homogénea, y que la fijación con tetróxido de osmio estabiliza los lípidos, por lo que éstos no se pierden durante el proceso de fijación.



**Fig. 8: Caracterización ultraestructural de las CD durante el cocultivo con las Apo/Nec.** Las CD-Apo/Nec fueron fijadas a distintos tiempos de cocultivo y observadas al microscopio electrónico de transmisión. **(a)** 0 horas. **(b)** 6 horas: se observa el contacto entre la CD y un cuerpo apoptótico (flecha amarilla); detalle de la zona de interacción de la CD con una célula necrótica, mostrando las vesículas de baja densidad (flecha blanca) entre los pliegues del retículo endoplasmático (flecha roja). **(c)** 12 horas. **(d)** 12 horas: se observan fagosomas tempranos (flecha azul).





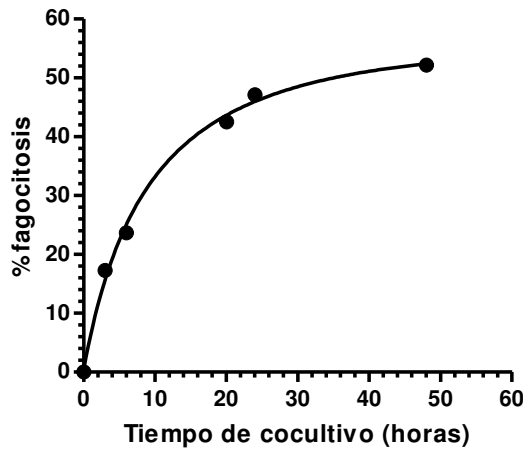
**Fig. 8:** Caracterización ultraestructural de las CD durante el cocultivo con las Apo/Nec. Las CD-Apo/Nec fueron fijadas a distintos tiempos de cocultivo y observadas al microscopio electrónico de transmisión. **(e-f)** 24 horas. **(g)** 48 horas. **(h)** Detalle de la figura (g) mostrando los lisosomas (flecha blanca) y vesícula de baja densidad (flecha roja).

Para determinar el porcentaje de fagocitosis entre las 0 y 48 horas de cocultivo se tiñeron las CDs con CFSE y las células Apo/Nec con PKH26, como se describe en Materiales y Métodos (1.5 y 1.6 respectivamente). Luego se realizó el cocultivo, y se fijaron las células a las 0, 3, 6, 20, 24 y 48

horas. Las CDs cargadas con Apo/Nec se visualizaron por citometría de flujo como células doble positivas (**Fig. 9**). El porcentaje de fagocitosis se calculó como:

$$\% \text{ fagocitosis} = 100 \times \frac{\text{N}^\circ \text{ de células CFSE}^+ \text{PKH26}^+}{\text{N}^\circ \text{ de células CFSE}^+ + \text{N}^\circ \text{ de células CFSE}^+ \text{PKH26}^+}$$

Se observó que el proceso de incorporación de Apo/Nec por las CDs fue rápido hasta las 24 horas, mostrando un máximo de porcentaje de fagocitosis del 52% a las 48 horas de cocultivo.



**Fig. 9: Porcentaje de fagocitosis de Apo/Nec por CDs en función del tiempo de cocultivo.** Las CDs teñidas con CFSE fueron cocultivadas con Apo/Nec (teñidas con PKH26) en una relación 1:1. El experimento se realizó por triplicado, se muestra el promedio de los datos para cada tiempo.

A lo largo del trabajo de tesis se repitió el ensayo de fagocitosis a 24 horas de cocultivo, obteniéndose valores variables entre 48% y 74%, con una media de 59% ± 13%. Se pudo observar que hay un importante porcentaje de CDs que no incorporan Apo/Nec, mostrando que existe heterogeneidad entre las CDs de la vacuna CD-Apo/Nec.

## 1.2. Heterogeneidad de las CDs utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec.

Las condiciones de diferenciación *in vitro* de células de médula ósea generan un cultivo enriquecido en células CD11c<sup>+</sup> que luego se utilizan para la generación de la vacuna CD-Apo/Nec (Goldszmid et al. 2003). Sin embargo, no se conocía en detalle la composición fenotípica de las células que componen la vacuna. Determinar el fenotipo de las CDs utilizadas para constituir la vacuna ayudaría a conocer las poblaciones celulares involucradas en la generación de la respuesta antitumoral.

Se determinó mediante citometría de flujo en las CDs utilizadas para la generación de la vacuna CD-Apo/Nec los porcentajes de positividad para los marcadores de superficie CD11c, CD14, F4/80, CD8 y CD4, como se describe en Materiales y Métodos (4.1). Se observó que las CDs consisten en una mezcla heterogénea de células con diferentes niveles de expresión de los marcadores de superficie analizados (**Tabla 4**). El porcentaje de células con positividad para el marcador de CDs CD11c fue de 54±1 %. Se observó también una gran proporción (35±7%) de células positivas para el marcador macrofágico F4/80. Por otro lado, se observó una pequeña fracción de células CD14<sup>+</sup>, demostrando que son pocas las células monocíticas presentes en la vacuna luego de 7 días de cultivo con GM-CSF. Finalmente fue posible observar un pequeño porcentaje de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, por lo que no sería importante el aporte de CDs CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> a la vacuna. Para descartar que se tratase de linfocitos T se realizó un control para detectar la expresión de CD3, con resultado negativo.

Marcador de superficie	% positividad
<b>CD11c</b>	54±1
<b>F4/80</b>	35±7
<b>CD14</b>	7±3
<b>CD8</b>	7±1
<b>CD4</b>	8±1

**Tabla 4: Porcentajes de positividad de las CDs para diferentes marcadores de CDs y macrófagos.** Se realizó la determinación en CDs provenientes de 2 o más aislamientos independientes. Se muestra el promedio y el desvío estándar ( $\alpha=0,05$ ).

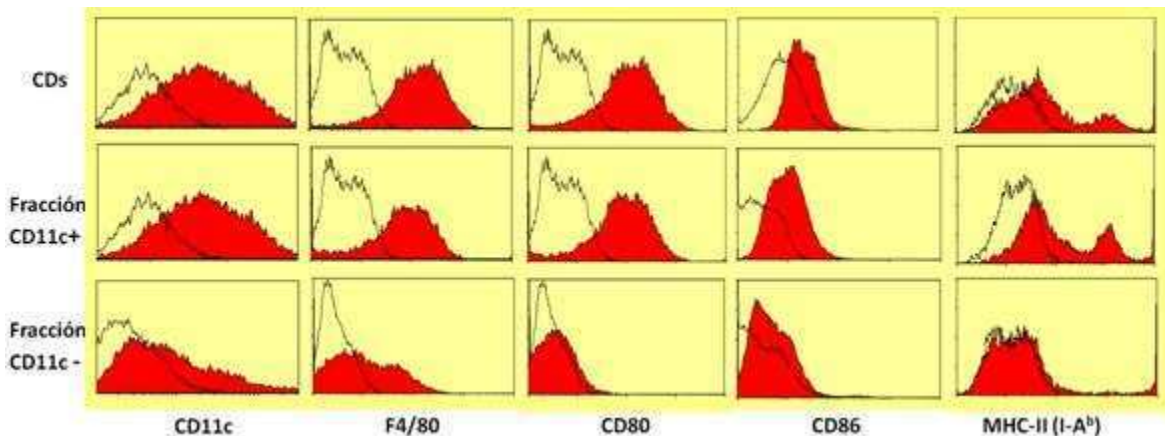


Por otro lado, se realizó un único experimento en el cual se incubaron las CDs con microesferas magnéticas acopladas a anti-PDCA-1 (marcador de superficie de CDp), como se describe en Materiales y Métodos (1.8). Se analizaron por microscopía las células retenidas en la columna, sin observarse células retenidas, por lo que no habría CDp en la mezcla heterogénea de CDs derivadas de médula ósea.

### **1.3. La generación de protección antitumoral requiere de la interacción entre células CD11c<sup>+</sup> y otras células provenientes de médula ósea presentes en la vacuna.**

Dada la heterogeneidad de las células que componen la vacuna, resultó de gran interés determinar la participación de las diferentes poblaciones en la protección antitumoral. Se evaluó si las células CD11c<sup>+</sup> presentes en la vacuna CD-Apo/Nec son las responsables exclusivas de la protección antitumoral observada, o si se necesita de las células CD11c<sup>-</sup> presentes en la vacuna. Con este fin se procedió a caracterizar a las células CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> por citometría de flujo y a ensayar su capacidad protectora *in vivo*.

Se diferenciaron *in vivo* CDs derivadas de médula ósea en las condiciones de cultivo habituales. Al día 7 de cultivo se levantaron las células, y se separaron las células CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> utilizando microesferas magnéticas acopladas a anticuerpos anti-CD11c, como se describe en Materiales y Métodos (1.8). Se determinó por citometría de flujo la presencia de células CD11c<sup>+</sup>, F4/80<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>+</sup> e I-A<sup>b</sup> + en las fracciones CD11c<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup> y el control de CDs originales sin separar (**Fig.10**).



**Fig. 10:** Histogramas de positividad para distintos marcadores de superficie en las fracciones  $CD11c^+$ ,  $CD11c^-$  y CDs originales (obtenidos por citometría de flujo). Las determinaciones se realizaron con CDs obtenidas de tres aislamientos independientes, se grafica un experimento representativo (Marcaciones con los anticuerpos específicos en rojo, controles de isotipo sin color;  $\alpha=0,05$ ).

Las microesferas magnéticas lograron separar eficientemente las fracciones  $CD11c^+$  y  $CD11c^-$ , ya que controles realizados sobre las fracciones retenidas y eluidas mostraron que las células retenidas en la columna poseían aproximadamente un 90% de positividad para CD11c, mientras que la fracción eluida quedó conformada por células con bajos niveles de expresión de CD11c (30% de positividad para CD11c, con bajo nivel de expresión). La fracción retenida en la columna (fracción  $CD11c^+$ ) fue la que retuvo células con mayor porcentaje de positividad para F4/80. Estas células de la fracción  $CD11c^+$  fueron a su vez las que expresaron mayores niveles de  $I-A^b$  y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. La fracción  $CD11c^-$  se vió conformada por células con bajos niveles de expresión de CD11c y F4/80 y nula expresión de CD80, CD86 o  $I-A^b$ .

Las fracciones  $CD11c^+$ ,  $CD11c^-$  y las CDs originales (sin separar con microesferas) se utilizaron para constituir las vacunas CD-Apo/Nec  $CD11c^+$ , CD-Apo/Nec  $CD11c^-$  y CD-Apo/Nec respectivamente. Se comparó le efectividad de las tres vacunas en un ensayo de protección antitumoral *in vivo*, tal como se describe en Materiales y Métodos (2.2) para la vacuna CD-Apo/Nec (**Fig. 11**).

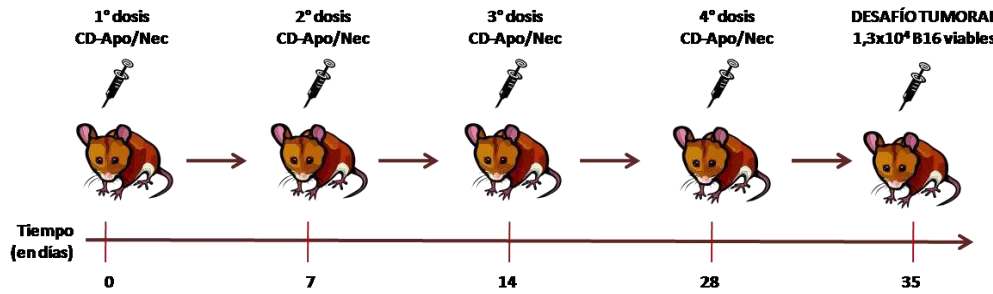


Fig. 11: Esquema de vacunación con CD-Apo/Nec y posterior desafío tumoral. Se utilizó el mismo esquema para la vacunación con CD-Apo/Nec, CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> y CD-Apo/Nec CD11c<sup>-</sup>.

La vacuna CD-Apo/Nec fue la que otorgó mayor protección antitumoral ( $p < 0,001$ ). Se observó que a las 14 semanas post-desafío tumoral el 50% de los animales vacunados con CD-Apo/Nec se encontraban libres de tumor, mientras que solo 20% y 0% de los animales vacunados con CD-Apo/Nec CD11c<sup>-</sup> o CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> respectivamente se encontraban libres de tumor (Fig. 12).

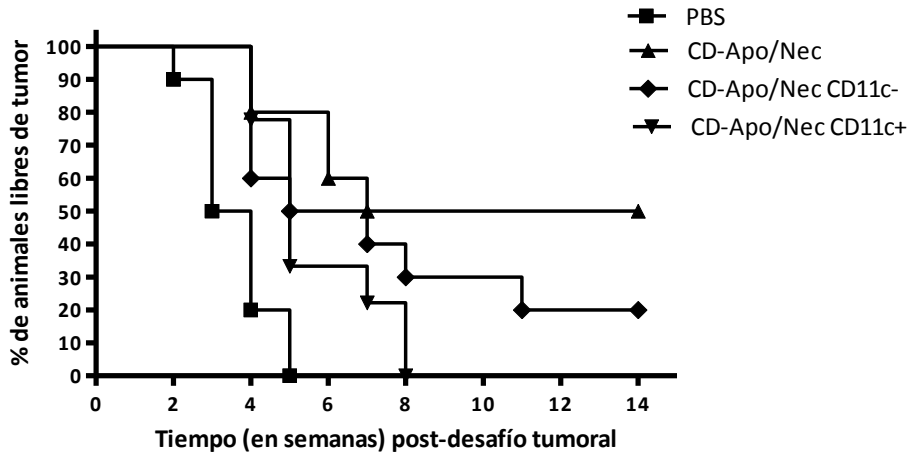
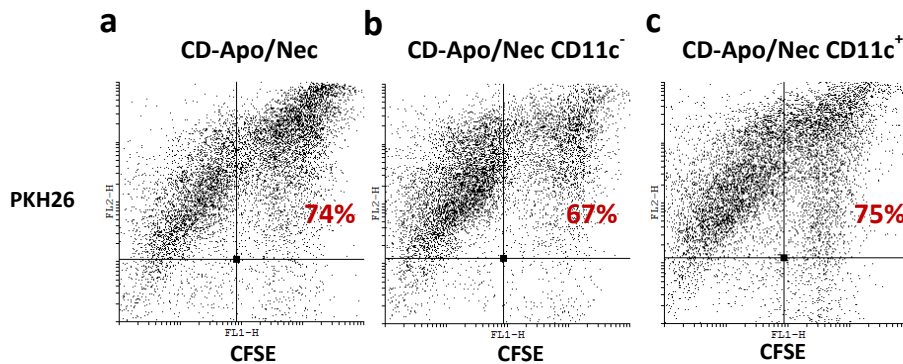


Fig. 12: Curva de supervivencia utilizando las vacunas CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup>, CD-Apo/Nec CD11c<sup>-</sup> y CD-Apo/Nec (grupo control 4 dosis de PBS). Método de Kaplan Meier. Para el análisis estadístico se utilizó el Log Rank Test ( $n=10$ ;  $\alpha=0,05$ ).

Las vacunas CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> y CD-Apo/Nec CD11c<sup>-</sup> fueron capaces de retrasar la aparición de tumores con respecto al grupo control no vacunado (PBS) ( $p < 0,01$ ), y no se observaron diferencias significativas entre ellas ( $p > 0,05$ ). Sin embargo, en estos dos grupos los valores de protección a las 14 semanas post-desafío tumoral no superaron el 20%. Se encontró una disminución significativa en la protección antitumoral otorgada por

la vacuna CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> con respecto a la vacuna CD-Apo/Nec ( $p < 0,05$ ). No sería por lo tanto ventajoso enriquecer la vacuna en células CD11c<sup>+</sup>, aunque posean mayor expresión de I-A<sup>b</sup> y moléculas coestimuladoras. Se necesitarían tanto las células CD11c<sup>+</sup> como CD11c<sup>-</sup> para constituir una vacuna antitumoral más efectiva.

La disminución en la protección antitumoral otorgada por las vacunas CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> y CD-Apo/Nec CD11c<sup>-</sup> podría estar determinada por una falta de capacidad de las diferentes fracciones de células de incorporar antígenos tumorales. Es por eso que se determinó el porcentaje de fagocitosis marcando las CDs, las fracciones CD11c<sup>+</sup> o CD11c<sup>-</sup> con CFSE y las Apo/Nec con PKH26, como se describe en Materiales y Métodos (1.5 y 1.6 respectivamente), y luego se realizó el cocultivo de 24 horas. Al finalizar el cocultivo se fijaron las células y se analizaron por citometría de flujo. Pudo observarse que todas las fracciones poseen capacidad fagocítica (**Fig.13**), siendo 74% para las CDs, 75% para la fracción CD11c<sup>+</sup>, y levemente menor (67%) para la fracción CD11c<sup>-</sup>, por lo que la disminución observada en la capacidad protectora de las vacunas CD-Apo/Nec CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> no estaría dada por una falta de captación de antígenos tumorales.

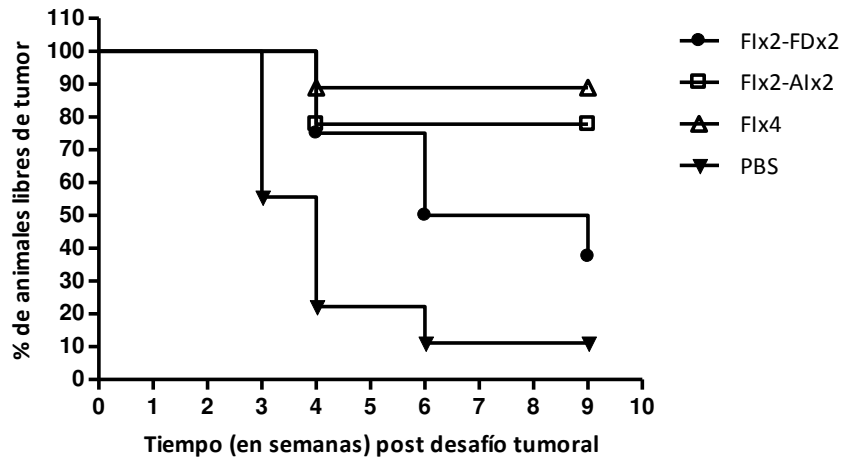


**Fig. 13: Fagocitosis de Apo/Nec por CDs, o por las fracciones CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup>.** Dot blots obtenidos por citometría de flujo del cocultivo de 24 horas de: **(a)** CDs con Apo/Nec; **(b)** fracción CD11c<sup>-</sup> con Apo/Nec; **(c)** fracción CD11c<sup>+</sup> con Apo/Nec. Los datos se analizaron utilizando el programa WINMDI2.9 ( $\alpha=0,05$ ).

**CAPÍTULO II: MECANISMO DE INMUNOPROTECCIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC****2.1. Respuesta sistémica antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec.**

Los experimentos de vacunación con CD-Apo/Nec se realizaron en el laboratorio hasta el comienzo de este trabajo de Tesis alternando los flancos de inyección izquierdo y derecho, y administrándose luego las células tumorales viables en el flanco contralateral al de la última dosis de vacuna (Goldszmid et al. 2003). La protección podía deberse entonces a una respuesta regional de rechazo, ya que dos dosis de vacunación y el desafío tumoral se administraban en la misma zona. Con el fin de demostrar que la respuesta antitumoral generada por la vacunación con CD-Apo/Nec es sistémica, se administraron 4 dosis de CD-Apo/Nec en la zona inguinal de un flanco (Flx4), o 4 dosis de CD-Apo/Nec alternando la zona inguinal y axilar de un mismo flanco (Flx2-Alx2), y se realizó el desafío tumoral en la zona inguinal del flanco contralateral. Por otro lado se aplicó el tratamiento convencional, que consistió en alternar la zona inguinal derecha e izquierda (Flx2-FDx2), realizándose el desafío tumoral en la zona inguinal del flanco contralateral a la última vacunación. Como control, a otro grupo se le administraron 4 dosis de vehículo (PBS) previo al desafío tumoral.

Se observó que con las dos estrategias de vacunación en las que se vacunaba en un mismo flanco y se realizaba el desafío tumoral en el flanco contralateral se obtenía una protección mayor o igual al 80%, significativamente mayor al control ( $p < 0,01$ ) (**Fig. 14**), corroborándose que la protección generada por la vacuna CD-Apo/Nec es sistémica.



**Fig. 14:** Curva de supervivencia utilizando diferentes estrategias de vacunación con CD-Apo/Nec. **Flx2-FDx2:** tratamiento convencional alternando la zona inguinal derecha e izquierda, y el desafío tumoral en la zona inguinal del flanco contralateral a la última vacunación. Método de Kaplan Meier. **Flx2-AIx2:** alternando la zona inguinal y axilar de un mismo flanco, y el desafío tumoral en la zona inguinal del flanco contralateral a la última vacunación. **Flx4:** las 4 dosis de CD-Apo/Nec en la zona inguinal de un flanco, y el desafío tumoral en la zona inguinal del flanco contralateral. **PBS:** cuatro dosis de vehículo PBS y luego el desafío tumoral. Para el análisis estadístico se utilizó el Log Rank Test (n=10;

## 2.2. Detección de micrometástasis latentes en animales protegidos por la vacunación con CD-Apo/Nec.

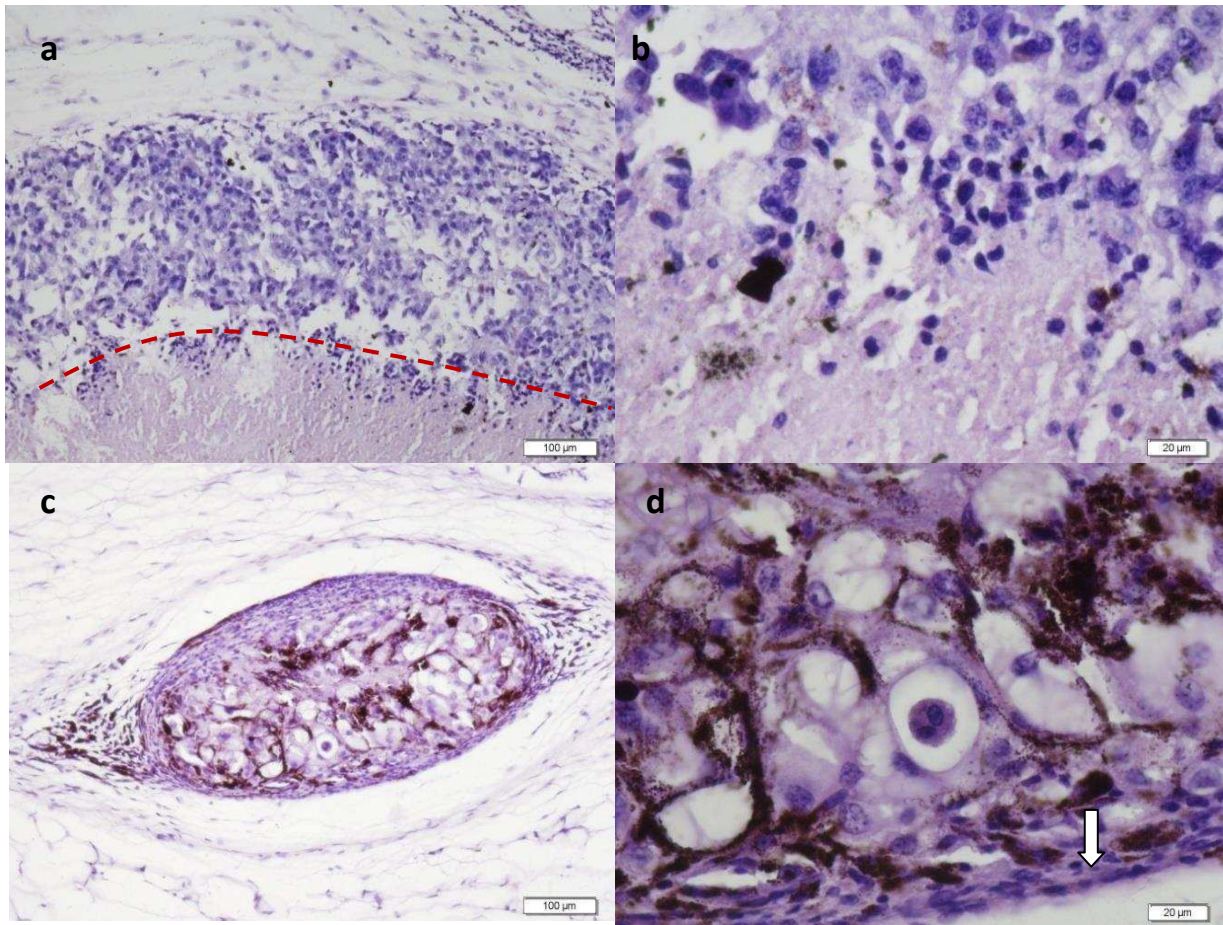
Se procedió a analizar por tinción con hematoxilina-eosina la presencia de células tumorales remanentes en los sitios de desafío tumoral de animales vacunados con CD-Apo/Nec y libres de tumor por palpación a las 10 semanas de realizado el desafío tumoral con células B16-F1.

A diez semanas de realizado el desafío tumoral se sacrificaron los animales libres de tumor por palpación. Se extrajo aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de piel de la zona de inyección, que se incluyó en parafina como se describe en Materiales y Métodos (7.1). Se realizó la tinción con hematoxilina-eosina y el posterior estudio patológico.

Fue posible detectar tumores latentes en 2 de 6 animales vacunados considerados protegidos. En uno de los casos el tumor fue detectado al extraer la piel. Fue fácilmente visualizable por su pigmentación y su tamaño de 1,6 x 2,6 mm (**Fig. 15a-b**). Se observó en él un centro necrótico, y en el borde externo células tumorales con un importante infiltrado linfocitario. En el otro caso, un tumor microscópico dérmico de 310 x 590 μm fue detectado por el estudio patológico luego de la tinción con hematoxilina-eosina (**Fig. 15c-d**). En él se observaron células



tumorales encapsuladas, entre las cuales se observó melanina, probablemente proveniente de la lisis de melanoblastos. En los dos extremos y en el centro del tumor pudieron distinguirse células macrofágicas cargadas con melanina. En ambos casos no se observaron células tumorales mitóticas.



**Fig. 15: Micrometástasis en el sitio de desafío tumoral** (tinción con hematoxilina-eosina). **(a)** Extremo superior del tumor de 1,6 x 2,6 mm, en el cual pudo observarse en el borde inferior el centro necrótico del tumor, rodeado de linfocitos (línea roja) y por encima una gruesa capa de células tumorales con infiltrado linfoide. **(b)** Zona de avance de las células linfoides en la zona necrótica. **(c)** Estructura del tumor microscópico, donde pueden observarse células tumorales encapsuladas, entre las cuales hay melanina proveniente de la lisis de melanoblastos. En los dos extremos pueden distinguirse células macrofágicas cargadas con melanina. **(d)** Detalle de (c) en el que se observa el núcleo tumoral con la melanina proveniente de la lisis de los melanoblastos y el borde exterior de fibroblastos y células linfoides (flecha).

Fue posible encontrar en animales vacunados con CD-Apo/Nec, y considerados protegidos por palpación a 10 semanas de realizado el desafío tumoral, células tumorales remanentes. Estas células tumorales estaban rodeadas por un importante infiltrado linfoide. Incluso fue posible

observar células macrofágicas cargadas de melanina, por lo que estaría habiendo remoción de los restos de células tumorales por parte de células fagocíticas en el sitio de inyección.

### 2.3. Estabilidad de la protección antitumoral

Según el modelo de inmunovigilancia tumoral, un pequeño número de células tumorales en el organismo pueden sobrevivir controladas por el sistema inmune. La disminución de alguna de las poblaciones clave de este proceso podría habilitar la expansión de las células tumorales. En nuestro modelo, luego de la vacunación fue posible detectar la presencia de células tumorales remanentes, rodeadas de células linfoides y células fagocíticas. Sería posible que pequeños focos tumorales persistieran mantenidos bajo el control de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y/o T CD8<sup>+</sup>.

Para evaluar si esto sucede, en animales protegidos por la vacuna CD-Apo/Nec (3 meses después de realizado el desafío tumoral) se eliminaron los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (n=8) o CD8<sup>+</sup> (n=7) administrando anticuerpos específicos anti-CD4 o anti-CD8 respectivamente, como se describe en Materiales y Métodos (6.4). Como control se administró una IgG inespecífica (n=5). Los anticuerpos específicos se obtuvieron a partir de ascitis de animales inyectados i.p. con los hibridomas GK 1.5 (anti-CD4) y TIB 105 (anti-CD8). Se administraron 831 µg de proteína total (3 dosis de 277 µg en tres días sucesivos) de las ascitis GK 1.5 o TIB 105, y se analizó la aparición de tumores por palpación hasta dos meses después de la administración de las anticuerpos. La eliminación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup> fue controlada en el bazo de animales sin vacunar, los cuales fueron inyectados i.p. con las mismas concentraciones de ascitis.

Se detectó solamente un tumor de 2 mm en uno de los 7 animales en los que se eliminó la población T CD8<sup>+</sup>. No se detectaron tumores en los animales en los que se eliminó la población T CD4<sup>+</sup>, o en los controles. Se sacrificaron los animales a los dos meses de la eliminación de las poblaciones T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup>, y se analizó la presencia de metástasis por patología, sin encontrarse evidencias de células tumorales en otros órganos.

En otro grupo de animales protegidos (n=7) se realizó la depleción de T CD4<sup>+</sup>, que se mantuvo durante un mes con un refuerzo semanal de 250 µg de proteína. Se sacrificaron los animales un mes después de la última depleción. No se detectaron tumores en este grupo que recibió un refuerzo semanal de anticuerpo anti-CD4.



Esto muestra que de existir células tumorales residuales mantenidas en equilibrio por el sistema inmune, la eliminación de las poblaciones T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup> no gatillarían su escape tumoral. El único tumor detectado luego del tratamiento con anticuerpo anti-CD8 tuvo un tamaño muy pequeño, solo detectado al sacrificar al animal y extraer el sitio de desafío tumoral. No fue posible determinar si su tamaño había sido afectado por el tratamiento con los anticuerpos, en otras palabras, si al comienzo del experimento poseía el mismo tamaño que al final del mismo. Lo que sí se pudo determinar es que este tumor no alcanzó una tasa de proliferación alta como para obtener un tamaño considerable y ser detectable por palpación.

#### **2.4. El esquema completo de vacunación con CD-Apo/Nec induce la producción de anticuerpos anti-B16-F1.**

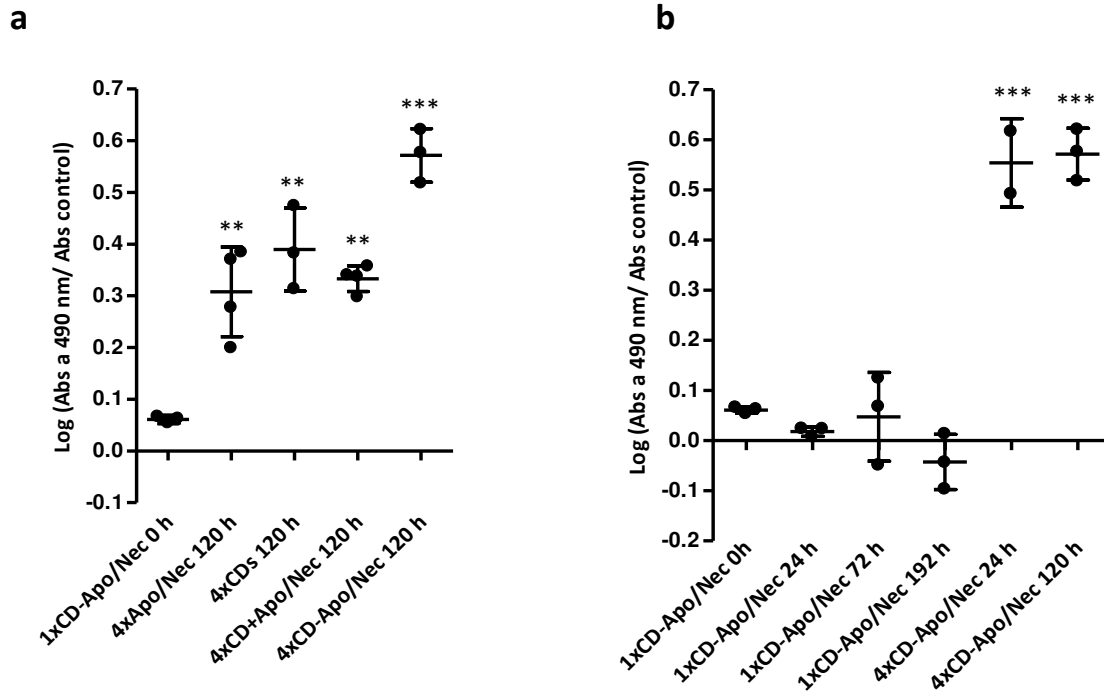
La respuesta citotóxica es considerada el principal mecanismo de acción antitumoral. Sin embargo, se ha descrito que la respuesta humoral es también capaz de favorecer la respuesta celular antitumoral. Otros grupos han determinado que la incorporación por las CDs vía receptores Fcγ de células tumorales opsonizadas por anticuerpos monoclonales promueve un mejor procesamiento y presentación de múltiples antígenos tumorales (Dhodapkar et al. 2002; Franki et al. 2008; Manches et al. 2008). La protección antitumoral mediada por la vacunación con CD-Apo/Nec es dependiente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> (Goldszmid et al. 2003); sin embargo no se ha estudiado si se induce una respuesta humoral. Por lo tanto fue de interés estudiar si la vacuna CD-Apo/Nec induce respuesta humoral, y si ésta se encuentra asociada a la protección.

Para evaluar la respuesta humoral se utilizó la técnica de ELISA, descrita en Materiales y Métodos (5.1). Se compararon los sueros de animales vacunados con 4 dosis de CD-Apo/Nec, que confiere protección, con los sueros de animales vacunados con 4 dosis de Apo/Nec, CDs o CD+Apo/Nec (CDs administradas junto con Apo/Nec pero sin previo cocultivo), que no confieren protección. Se obtuvieron los sueros de los animales a 24 y 120 horas de finalizados los esquemas de vacunación. Como control se utilizaron sueros obtenidos a 0 horas post-administración de una dosis de CD-Apo/Nec. Se analizó la presencia de anticuerpos IgG e IgM que reconocieran epítopes superficiales y citoplasmáticos de las células tumorales B16-F1. Brevemente, en pocillos conteniendo una monocapa homogénea de células B16-F1 permeabilizadas con saponina, se

realizó una incubación con suero proveniente de los distintos grupos de animales. Los anticuerpos en suero capaces de reconocer epítopes presentes en las células B16-F1 quedaron unidos a las células y pudieron ser reconocidos por un anticuerpo secundario anti-IgG/IgM de ratón.

Fue posible detectar a 120 horas post-vacunación la inducción de anticuerpos anti-B16-F1 con todos los esquemas de vacunación (**Fig. 16a**). En el caso de las vacunas que no otorgan protección, el nivel de anticuerpos anti-B16-F1 resultó entre 3 y 4 veces mayor que en los sueros control ( $p < 0,01$ ), mientras que el nivel de anticuerpos anti-B16-F1 generados mediante la vacunación con CD-Apo/Nec fue aproximadamente cinco veces mayor que en los sueros control ( $p < 0,001$ ), y significativamente mayor que el generado con las otras vacunas ( $p < 0,05$ ).

A continuación se estudió si la administración de una sola dosis de vacuna CD-Apo/Nec era suficiente para inducir una respuesta humoral. Se obtuvieron entonces los sueros de animales vacunados con una dosis de CD-Apo/Nec a las 24, 72 y 192 horas post-administración, comparándose mediante la técnica de ELISA con sueros de animales con 4 dosis de vacuna CD-Apo/Nec, o con sueros control. Sin embargo, a ninguno de estos tiempos fue posible detectar niveles significativos de anticuerpos anti-B16-F1 en suero (**Fig. 16b**). Por lo tanto, con una sola dosis de vacuna CD-Apo/Nec no fue posible inducir niveles significativos de anticuerpos anti-B16-F1, incluso hasta 192 horas post-administración.



**Fig. 16:** Nivel de anticuerpos anti-B16-F1 detectados por ELISA en suero de animales vacunados. (a) Cuatro dosis de cada tratamiento. (b) Una dosis de CD-Apo/Nec versus 4 dosis de CD-Apo/Nec. Se muestra el Log de las absorbancias a 490 nm obtenidas con la dilución 1/100 del suero, normalizadas respecto a un suero control. Se utilizaron 2 a 4 animales por tratamiento; se muestra la media más el desvío estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA más comparación de Tuckey ( $\alpha=0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$ ). Fue necesario realizar la transformación “Log (Absorbancia a 490 nm del tratamiento/ absorbancia a 490 nm del control)” para que se cumpla el supuesto de homocedasticidad del ANOVA.

La vacunación con CD-Apo/Nec, que genera protección antitumoral, es la vacunación que indujo mayor nivel de anticuerpos anti-B16-F1 en suero. Por lo tanto, habría una asociación entre los niveles de anticuerpo anti-B16-F1 en suero y la protección antitumoral. Por otro lado, una sola dosis de CD-Apo/Nec no sería suficiente para inducir en suero este significativo nivel de anticuerpos anti-B16-F1.

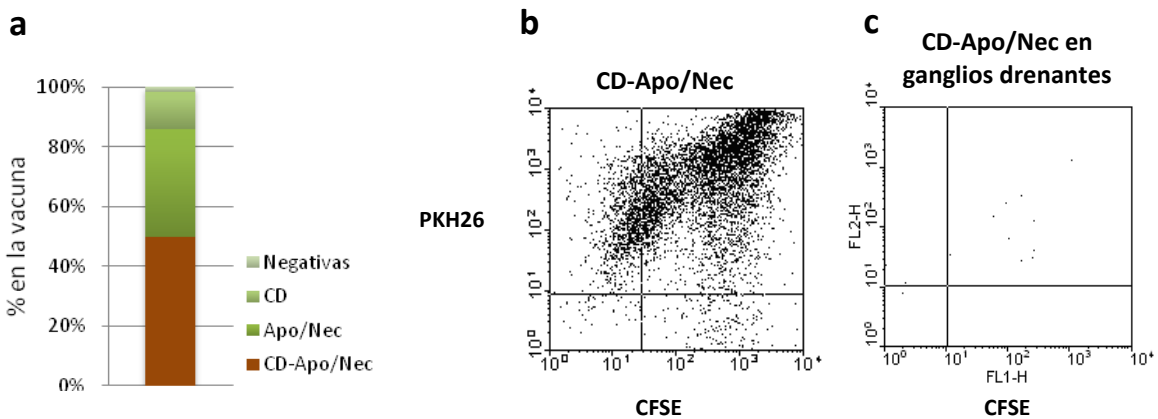
## 2.5. Baja migración de las células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes a 24 horas post inyección.

Experimentos preliminares realizados por nuestro grupo de trabajo han demostrado que cuando se inyectan  $5 \times 10^5$  CD o CD-Apo/Nec en forma s.c. en la almohadilla plantar de ratones

C57BL/6, la migración de las CD y/o de las CD-Apo/Nec a los ganglios linfáticos drenantes es relativamente escasa, del orden de 0,5% (Goldszmid et al. 2003). Otros grupos han obtenido resultados similares (Lappin et al. 1999; Martín-Fontecha et al. 2003). Nuestro objetivo fue analizar la migración de las células que componen la vacuna CD-Apo/Nec al inyectarla en forma s.c. en la zona inguinal, que es la zona de aplicación convencional de la vacuna. Se procedió a cuantificar la migración a los ganglios drenantes por citometría de flujo a 24 horas post-administración de la vacuna.

Se marcaron las CDs con el colorante vital CFSE y las células Apo/Nec con PKH26, como se describe en Materiales y Métodos (1.5 y 1.6 respectivamente). Luego se realizó el cocultivo en las condiciones habituales. Analizando la composición de la vacuna CD-Apo/Nec marcada por citometría de flujo pudo observarse que las células CFSE<sup>+</sup>PKH26<sup>+</sup> correspondieron a aproximadamente el 50% de la vacuna, quedando un porcentaje de células CFSE<sup>-</sup>PKH26<sup>+</sup> (Apo/Nec) sin fagocitar por CDs (**Fig. 17a**).

Se inyectó una dosis s.c. de  $2 \times 10^5$  CD-Apo/Nec marcadas en la zona inguinal. A las 24 horas se sacrificaron los animales, se extrajeron los ganglios linfáticos inguinal, axilar y poplíteo ipsilaterales al sitio de vacunación, que se disgregaron como se describe en Materiales y Métodos (3.1). El porcentaje de células CFSE<sup>+</sup>PKH26<sup>+</sup> que migraron a estos ganglios se cuantificó por citometría de flujo (**Fig. 17b-c**). Con este fin, se realizó una curva de calibración agregando a muestras de ganglios disgregados diferentes cantidades conocidas de CD-Apo/Nec marcadas.



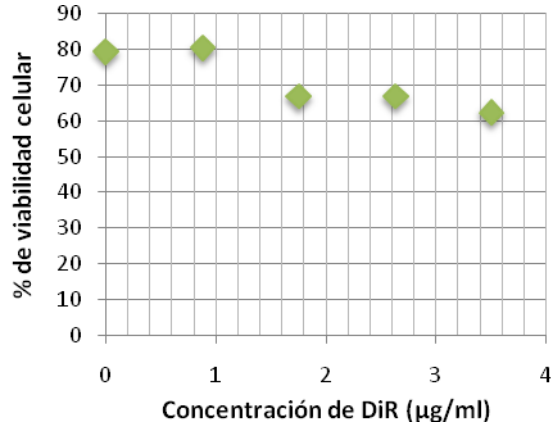
**Fig. 17: Migración de células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes.** (a) Composición porcentual de la vacuna CD-Apo/Nec. (b) Células CD-Apo/Nec marcadas, previo a la inyección. (c) Células CFSE<sup>+</sup>PKH26<sup>+</sup> detectadas en el ganglio drenante 24 horas post inyección.

De esta manera se pudo determinar que a las 24 horas de la inyección tan solo el 0,8% de las células CD-Apo/Nec migraron a los ganglios drenantes, que corresponderían aproximadamente a 1600 CD-Apo/Nec. No se observó la migración de células CFSE<sup>+</sup>PKH26<sup>-</sup> (CDs) o CFSE<sup>-</sup>PKH26<sup>+</sup> (Apo/Nec) a los ganglios drenantes.

## **2.6. El 77% de las células que componen la vacuna CD-Apo/Nec son retenidas en el sitio de vacunación hasta 120 horas post-inyección.**

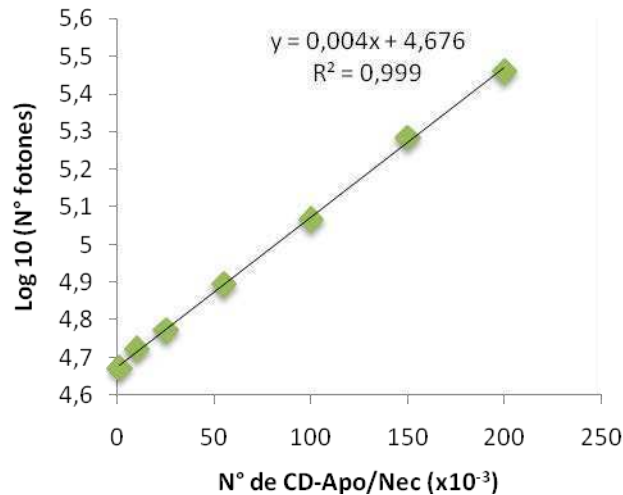
Al observar la baja tasa de migración a los ganglios drenantes, se buscó otra técnica que permitiera analizar la biodistribución de las células de la vacuna en el organismo inyectado, y de esta forma determinar el destino de las células inyectadas. Con este fin se procedió a utilizar la técnica de *In vivo* Imaging. Se tiñeron las células de la vacuna CD-Apo/Nec con DiR, como se describe en Materiales y Métodos (1.7). El DiR es un colorante vital que posee el máximo de excitación a 750 nm y el máximo de emisión a 779 nm, dentro del rango de longitudes de onda infrarrojas del espectro. Se utilizó este colorante porque los componentes tisulares absorben luz en las longitudes de onda que van del espectro ultravioleta al visible, mientras que la luz del espectro infrarrojo puede penetrar hasta 10 veces más. Por otro lado, los fluoróforos naturales presentes en el tejido emiten en las longitudes de onda del espectro visible, y es baja la autofluorescencia detectada en el espectro infrarrojo (Leblond et al. 2010).

En primer lugar se procedió a realizar una curva de tinción de CDs con diferentes concentraciones de DiR, evaluando el porcentaje de viabilidad celular con azul de tripán, y la intensidad de marcación por citometría de flujo. Basándose en bibliografía (Kalchenko et al. 2006) se partió de una concentración de DiR de 3,5 µg/ml en la solución de tinción para realizar una curva de concentraciones decrecientes. Se decidió utilizar la concentración 0,88 µg/ml de DiR, con la que se mantuvo la misma viabilidad celular que con las células no marcadas (**Tabla 5**) sin perder la capacidad de tinción (corroborado por citometría de flujo).



**Tabla 5: Viabilidad celular en función de la concentración de DiR.** Porcentaje de viabilidad celular en función de la concentración de DiR, evaluada mediante tinción con azul de tripán.

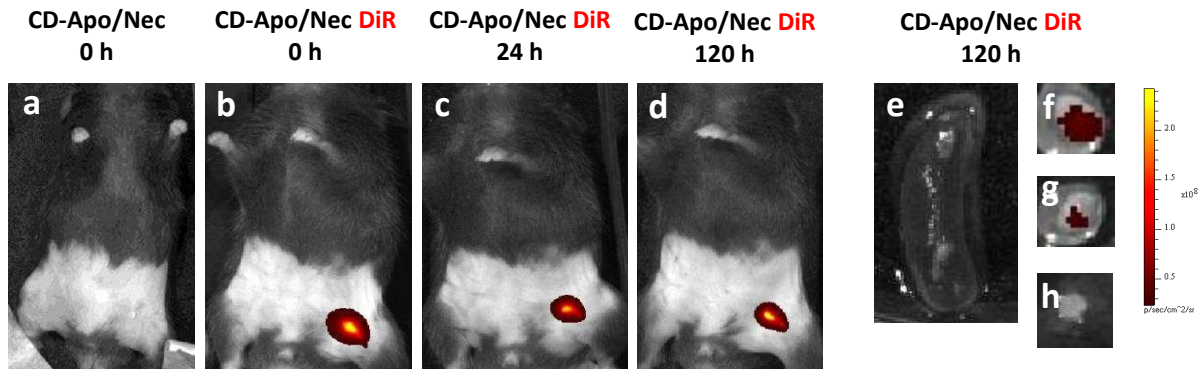
Se realizó una curva de calibración *in vitro* sembrando en una placa de 96 pocillos diferentes cantidades de CDs teñidas con DiR ( $1 \times 10^3$  a  $2 \times 10^5$  CD-Apo/Nec). La bioluminiscencia se determinó con el bioluminómetro IVIS Lumina. Se obtuvo una curva de calibración (**Fig. 18**), que fue luego utilizada para estimar el número de CD-Apo/Nec en ganglios drenantes.



**Fig. 18: Curva de calibración para estimar el N° de CD-Apo/Nec en ganglios linfáticos.** Función lineal obtenida de Log 10 (N°de fotones) en función del N° de CD-Apo/Nec sembradas. Se muestra el promedio de dos réplicas.

Se procedió a inyectar una dosis s.c. de  $2 \times 10^5$  CD-Apo/Nec marcadas en la zona inguinal, y se midió la bioluminiscencia de forma no invasiva utilizando el bioluminómetro a 0, 24 y 120 horas

post-inyección (**Fig.19**). A las 120 horas post-inyección se procedió a sacrificar los animales y a extraer los ganglios linfáticos ipsilaterales, el ganglio linfáticos contralateral y el bazo, que se analizaron con el bioluminómetro.

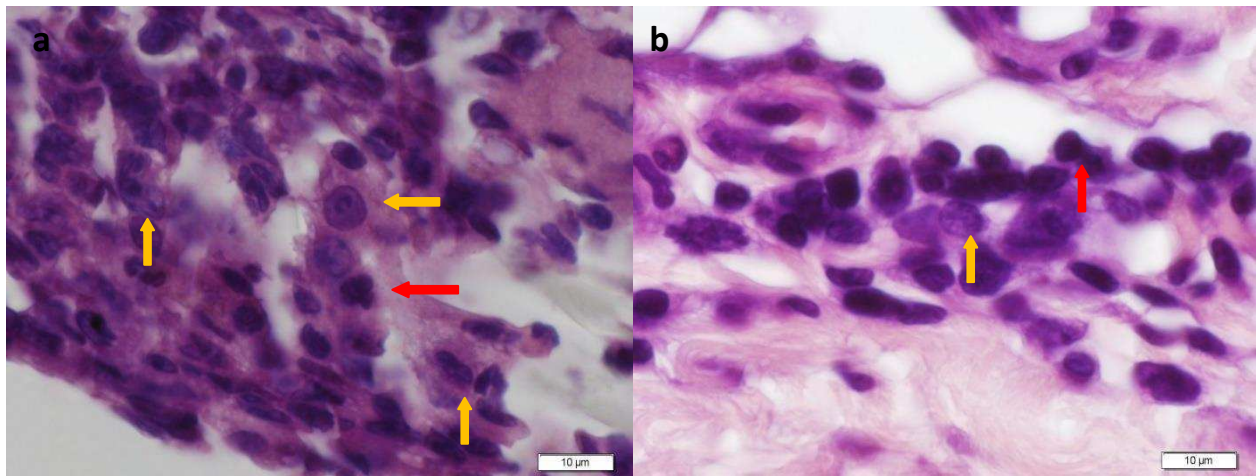


**Fig. 19: Biodistribución de una dosis de CD-Apo/Nec DiR hasta 120 h post-inyección.** (a) CD-Apo/Nec no marcadas, al momento de la inyección. (a-d) CD-Apo/Nec DiR. (b) 0 horas. (c) 24 horas. (d) 120 horas. (n=3, se muestra un dato representativo por tiempo). (e-h) A las 120 horas post-inyección se extrajeron distintos órganos y se determinó la presencia de células marcadas. (n=2;  $\alpha=0,05$ ; se muestra un dato representativo por tiempo). (e) Bazo. (f) Ganglio inguinal ipsilateral. (g) Ganglio inguinal contralateral. (h) Ganglio poplíteo ipsilateral..

Se observó que hasta las 120 horas persistían las células CD-Apo/Nec en la zona de inyección (**Fig. 19d**). Por otro lado, al analizar los ganglios linfáticos cercanos al sitio de inyección de dos animales sacrificados a 120 horas post-inyección, se pudo detectar la migración de  $24900 \pm 10800$  CD-Apo/Nec al ganglio linfático inguinal ipsilateral (**Fig. 19f**), y de  $20700 \pm 2700$  CD-Apo/Nec al ganglio linfático contralateral (**Fig. 19g**). Por lo tanto, la migración total a los ganglios linfáticos drenantes a las 120 horas post-inyección sería de aproximadamente 23% de las CD-Apo/Nec. No se observó la presencia de células marcadas en el bazo (**Fig. 19e**) o en el ganglio linfático poplíteo (**Fig. 19h**), por lo que las CD-Apo/Nec no estarían migrando a estos órganos. El 77% de las células que componen la vacuna CD-Apo/Nec son entonces retenidas en el sitio de inyección hasta 120 horas post-administración de una dosis de vacuna.

Por otro lado se procedió a caracterizar por tinción con hematoxilina-eosina y posterior análisis patológico las células presentes en el sitio de vacunación. Se realizó la inyección de una dosis de  $2 \times 10^5$  CD-Apo/Nec, y a las 24, 72, 120 y 192 horas post-administración se sacrificaron los animales y se prepararon los sitios de inyección para la tinción con hematoxilina-eosina como se describe en Materiales y Métodos (7.1).

A las 24 horas post-inyección se observaron en el sitio de vacunación células Apo/Nec con dos morfologías distintivas, unas con abundante citoplasma, y otras con aspecto picnótico, junto con acúmulos de células polimorfonucleares y macrofágicas (morfología de CD o macrófago) (**Fig. 20a**). Entre las 72 y 120 horas se observó una disminución progresiva del número de células polimorfonucleares y macrofágicas. Finalmente a las 192 horas post-inyección se observaron células macrofágicas, unas pocas células Apo/Nec, y se evidenció la aparición de células linfoides (**Fig. 20b**).



**Fig. 20:** Poblaciones celulares en el sitio de inyección de una dosis de vacuna CD-Apo/Nec. **(a)** 24 hs post-inyección: células tumorales grandes (flecha amarilla) y acúmulo de células polimorfonucleares (flecha roja). **(b)** 192 hs post inyección: pocas células tumorales residuales (flecha amarilla) y aparición de importante infiltrado de células linfoides (flecha roja).

La administración de una sola dosis de CD-Apo/Nec fue capaz de inducir a 192 horas el reclutamiento de células linfoides al sitio de inyección. Por otro lado se observó a este tiempo la remoción de las células tumorales del sitio de inyección.

## 2.7. Análisis comparativo de los sitios de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec, CDs, Apo/Nec o CD+Apo/Nec.

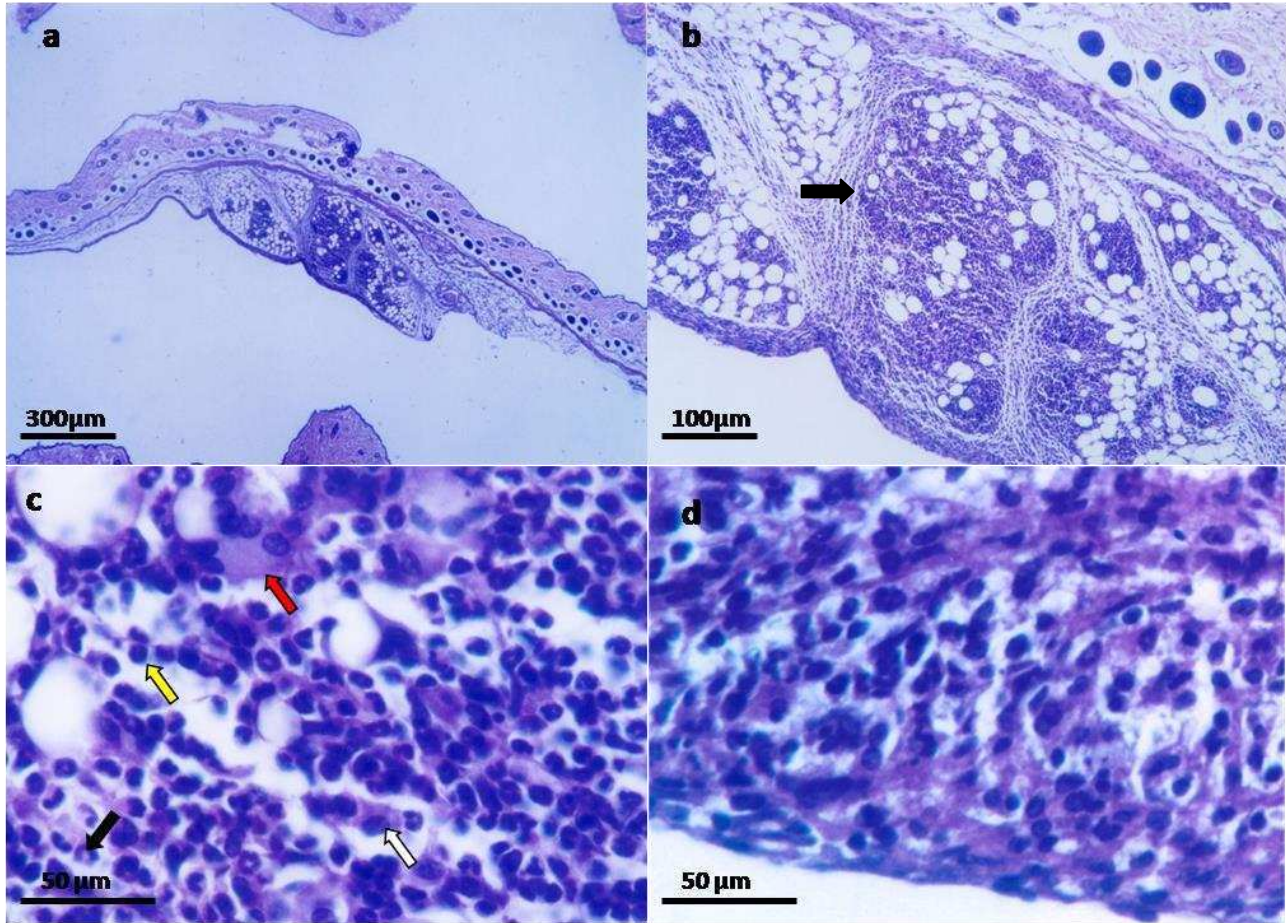
La vacunación con CD, Apo/Nec o CD+Apo/Nec no proveen protección contra un desafío con B16-F1 viables, mientras que la vacunación con CD-Apo/Nec otorga protección a largo plazo. Con el objetivo de comprender el mecanismo de acción de la vacuna CD-Apo/Nec se procedió a



estudiar el sitio de vacunación de estas diferentes vacunas. El reclutamiento diferencial de poblaciones del sistema inmune podría proveer un indicio de qué poblaciones inmunes son importantes para determinar el éxito o fracaso de la vacunación con CD-Apo/Nec.

Se realizó el esquema completo de vacunación con 4 dosis s.c. de  $2 \times 10^5$  CDs, Apo/Nec, CD+Apo/Nec o CD-Apo/Nec. A 120 horas de finalizado el esquema de vacunación se extrajeron los sitios de vacunación, como se describe en Materiales y Métodos (7.1), y se tiñeron con hematoxilina-eosina para su estudio patológico.

Al analizar el sitio de vacunación con CD-Apo/Nec se observó un importante infiltrado inflamatorio, contenido dentro de una estructura pseudolinfoide definida y organizada (**Fig. 21a**), con fibras reticulares y una pseudocápsula cruzada por múltiples trabéculas, similar a un ganglio linfático (**Fig. 21b**). Las células contenidas dentro de esta estructura fueron mayormente células linfoides, leucocitos polimorfonucleares, células macrofágicas y células gigantes (**Fig. 21c**). Cabe destacar que con los otros tratamientos que no otorgan protección antitumoral no se detectó este tipo de estructura organizada. Al analizar los sitios de vacunación con CD o CD+Apo/Nec se observó el reclutamiento escaso, de células linfoides, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos. Al analizar los sitios de vacunación con células Apo/Nec sólo pudo detectarse un pobre reclutamiento de linfocitos, no se observó reclutamiento de células fagocíticas, y se evidenció un gran número de células tumorales remanentes, con pérdida de integridad de la membrana plasmática (**Fig.21d**). Al no reclutarse células fagocíticas al sitio de vacunación con Apo/Nec, parecería que éstas quedan acumuladas sin poder ser apropiadamente captadas por células fagocíticas.



**Fig. 21: Estructura pseudolinfoide detectada 120 hs post-vacunación con CD-Apo/Nec.** Secciones de los sitios de vacunación teñidos con hematoxilina-eosina. (n=10; se muestra un sitio de inyección representativo). **(a)** Intenso infiltrado inflamatorio en la dermis. **(b)** Estructura definida contenida por una pseudocápsula (flecha negra) y atravesada por red de fibras reticulares. **(c)** Detalle del infiltrado dentro de la estructura el cual consiste de leucocitos polimorfonucleares (flecha negra), linfocitos (flecha amarilla), células tipo macrófágicas (flecha blanca) y células gigantes (flecha roja). **(d)** Detalle del sitio de inyección al vacunar con Apo/Nec. Se observan células tumorales con pérdida de integridad de la membrana plasmática, y linfocitos en poca cantidad. No se observa reclutamiento de células fagocíticas.

Las CD+Apo/Nec (sin cocultivo previo) inducen un menor reclutamiento de linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos que las CD-Apo/Nec, por lo que el cocultivo *ex vivo* de las CD con las Apo/Nec sería necesario para que al administrar la vacuna se genere a 120 horas un importante reclutamiento de células del sistema inmune y la formación de la compleja estructura pseudolinfoide. Y, sobre todo, la vacuna CD+Apo/Nec no genera protección antitumoral, por lo que el cocultivo *ex vivo* sería necesario para la inducción de la respuesta antitumoral.

Por otro lado, la estructura pseudolinfoide formada en el sitio de vacunación con CD-Apo/Nec podría ser importante para la generación de la inmunidad antitumoral, ya que se ha

descrito en estos tipos de estructuras la activación y proliferación de linfocitos vírgenes específicos.

## 2.8. Reclutamiento inmune en el sitio de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec

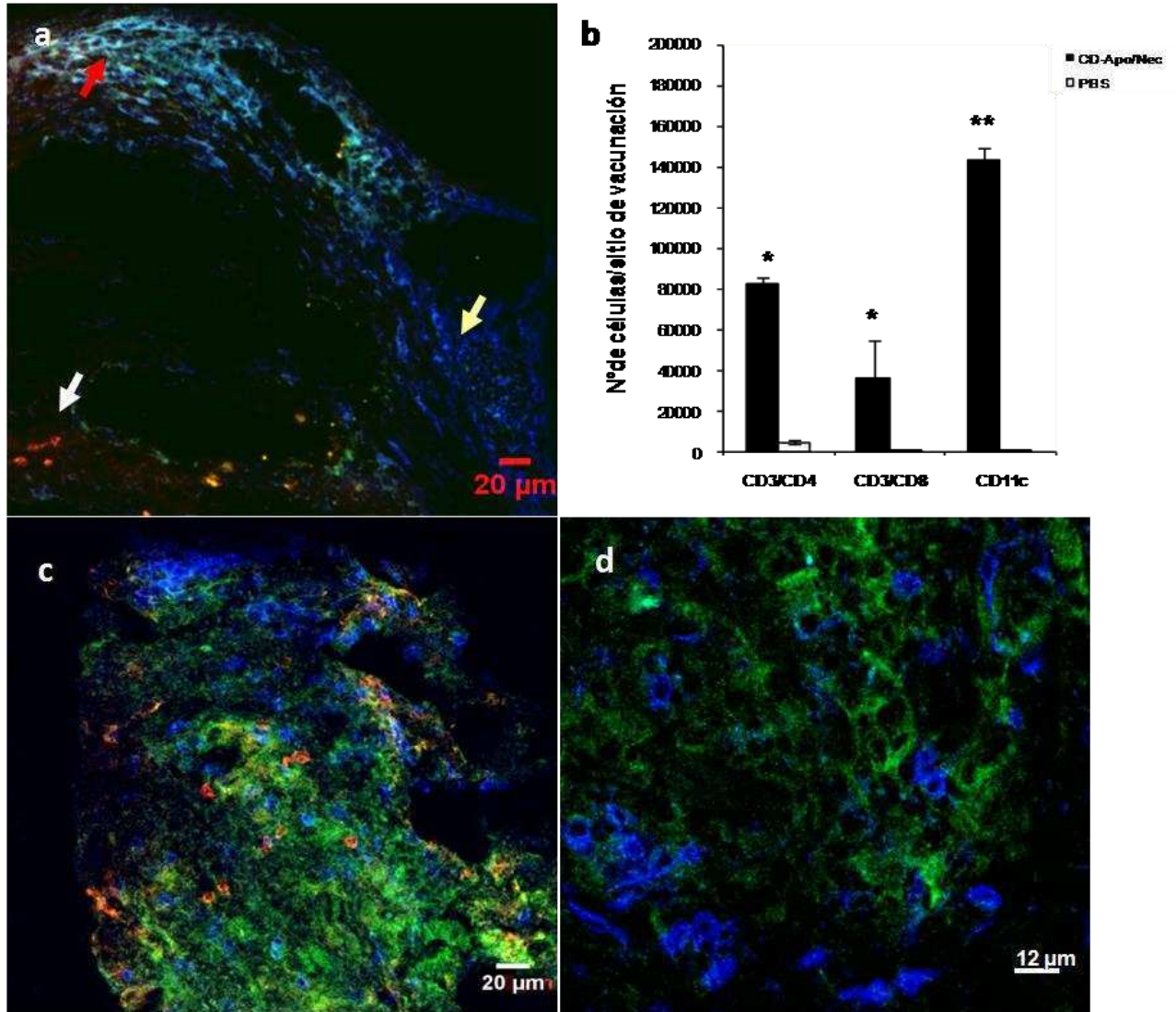
Con el fin de caracterizar con mayor detalle las células presentes en el sitio de vacunación con CD-Apo/Nec, y en la estructura pseudolinfoide formada a las 120 horas, se procedió a analizar el sitio de inyección mediante citometría de flujo y microscopía confocal.

Para el análisis por citometría de flujo se obtuvieron sitios de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec a 24 horas post-vacunación. Éstos se disgregaron mecánicamente y enzimáticamente, tal como se describe en Materiales y Métodos (3.5). Luego se realizó una marcación con anticuerpos específicos para CD11c, CD3/CD4, y CD3/CD8, como se describe en Materiales y Métodos (4.1).

Los anticuerpos disponibles eran aptos para citometría de flujo pero no eran aptos para marcación de tejidos incluidos en parafina, por lo que para poder realizar el análisis por microscopía confocal se obtuvieron muestras por congelación de los sitios de vacunación con 4 dosis de CD-Apo/Nec, a 24 y 120 horas post-vacunación. Los sitios de inyección fueron preparados como se explica en Materiales y Métodos (7.2) para poder ser posteriormente seccionados con criostato. Luego, los cortes fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  y utilizados para marcación con anticuerpos específicos para CD11c, F4/80, Ly6G, CD4 y CD8, como se describe en Materiales y Métodos (7.3).

A 24 horas de finalizado el esquema de vacunación con CD-Apo/Nec se observó por microscopía confocal en los sitios de inyección zonas de acumulación de macrófagos ( $\text{F4/80}^+$ ), leucocitos polimorfonucleares ( $\text{Ly6G}^+$ ) y CDs ( $\text{CD11c}^+$ ) (**Fig. 22a**). Se detectaron también zonas de células con doble positividad para CD11c y F4/80. Éstas podrían ser acumulaciones de células provenientes de la vacuna, ya que hemos visto *in vitro* que las CDs utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec pueden expresar estos dos marcadores conjuntamente. Por citometría de flujo fue posible cuantificar el número de CDs y linfocitos T  $\text{CD4}^+$  y T  $\text{CD8}^+$  presentes en los sitios de inyección. Se registró así un aumento significativo de estas tres poblaciones con respecto a controles con 4 dosis de vehículo (**Fig. 22b**).

A las 120 horas de finalizado el esquema de vacunación se confirmó por microscopía confocal la presencia en la estructura pseudolinfoide de un gran número de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$ , y se observó a los linfocitos en estrecho contacto con CDs (**Fig.22c-d**).



**Fig. 22: poblaciones inmunes reclutadas al sitio al finalizar el esquema de vacunación.** (a) Análisis por microscopía confocal del sitio de vacunación a 24 horas de finalizado el esquema de vacunación, CD11c (verde), F4/80 (azul) y Ly6G (rojo). Las flechas blancas señalan la infiltración con células Ly6G<sup>+</sup>, las flechas amarillas con células F4/80<sup>+</sup>, y las flechas rojas el sitio de acumulación con células con marca tanto para CD11c como para F4/80. (b) A las 24 horas los sitios de inyección fueron disgregados, las células marcadas con anticuerpos específicos para CD4, CD8 y CD11c. Por citometría de flujo se obtuvieron los números totales de cada población presente en el sitio (cada valor representa el promedio de 5 animales;  $p < 0,05$  para  $CD3^+CD8^+$  y  $CD3^+CD4^+$ , y  $p < 0,01$  para  $CD11c^+$ , comparado con los sitios de animales vacunados con vehículo (PBS). Para el análisis estadístico se utilizó la Prueba T de Student. (c) Análisis por microscopía confocal de sitios a 120 horas de finalizado el esquema de vacunación marcados para CD11c (verde), CD4 (azul) y CD8 (rojo). (d) Detalle de la imagen (c) mostrando la gran infiltración de células  $CD4^+$  en estrecho contacto con las células  $CD11c^+$ .

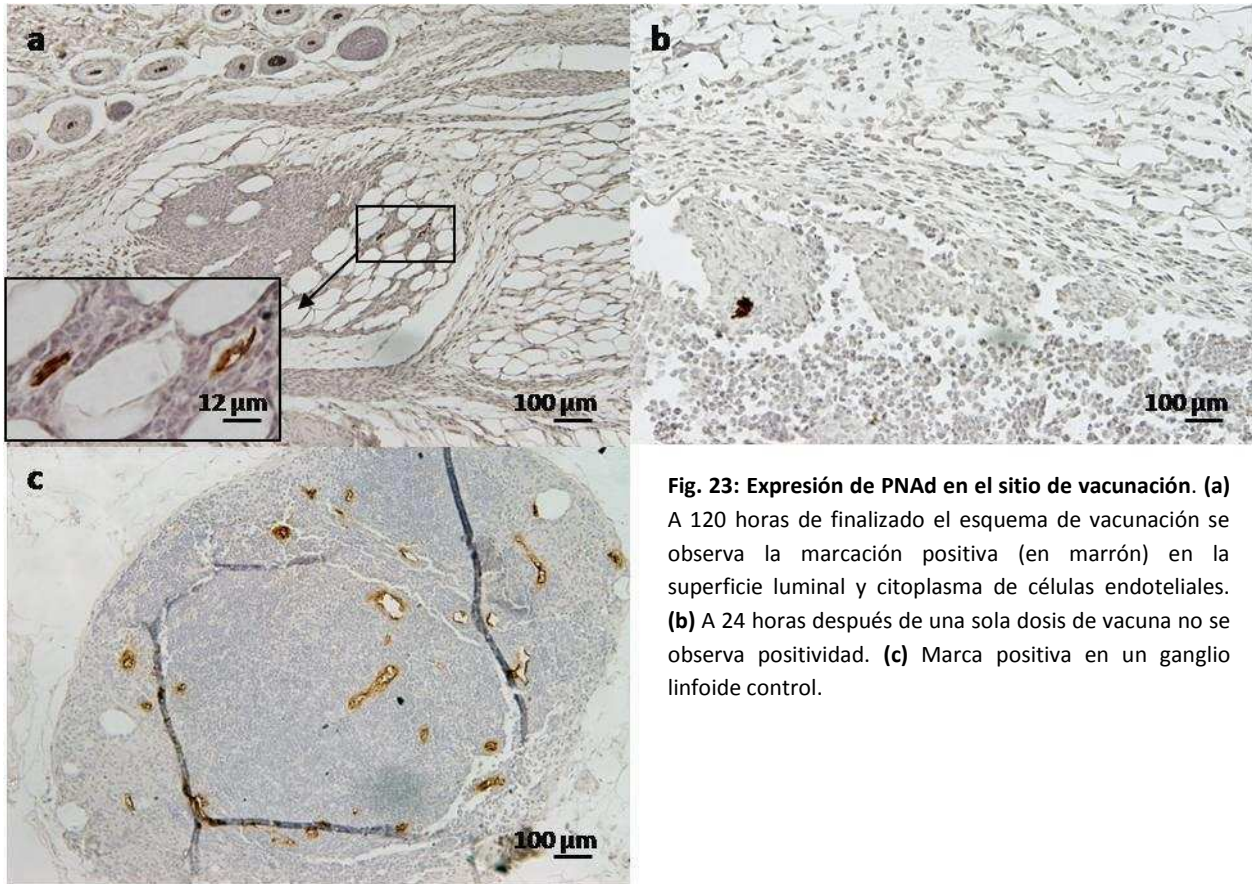
### 2.9. Formación de tejido linfoide terciario en el sitio de vacunación

Debido a la gran infiltración de linfocitos, tanto CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>, en el sitio de vacunación, y la generación de una estructura organizada, se quiso determinar si el sitio de vacunación poseía propiedades de tejido linfoide terciario. La Adresina de Nódulo linfático Periférico (PNAd) se expresa en las vénulas del endotelio alto de los órganos linfoides secundarios e interacciona con la L-selectina presente en los linfocitos, mediando su entrada al parénquima de estos órganos linfoides (Girard and Springer 1995). Se ha descrito en tejido linfoide terciario la expresión de la PNAd (Nasr et al. 2007).

Se obtuvieron sitios de vacunación de animales vacunados con 4 dosis de CD-Apo/Nec, que se prepararon para inmunohistoquímica como se describe en Materiales y Métodos (7.1). Se realizó la marcación con un anticuerpo específico para la adresina PNAd, como se describe en Materiales y Métodos (7.4). Como control positivo se utilizaron ganglios linfáticos inguinales de animales no vacunados.

Se detectó por inmunohistoquímica en los sitios de vacunación con CD-Apo/Nec, a 120 horas de finalizado el esquema de vacunación, la expresión de PNAd en la superficie luminal y en el citoplasma de células endoteliales del sitio de inyección (**Fig. 23a**), pero no en vénulas o arterias de regiones periféricas o remotas (**Fig. 23a**) o en secciones controles (**Fig. 23b**). Por lo tanto, en el sitio de vacunación habría inducción de tejido linfoide terciario.





**Fig. 23: Expresión de PNA<sub>d</sub> en el sitio de vacunación. (a)** A 120 horas de finalizado el esquema de vacunación se observa la marcación positiva (en marrón) en la superficie luminal y citoplasma de células endoteliales. **(b)** A 24 horas después de una sola dosis de vacuna no se observa positividad. **(c)** Marca positiva en un ganglio linfoide control.

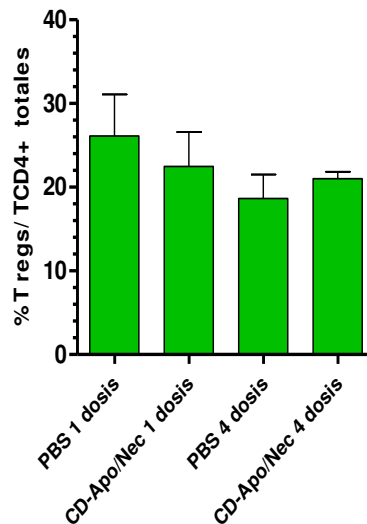
La expresión de PNA<sub>d</sub> en vénulas presentes en el sitio de vacunación, que forman parte de una estructura organizada con reclutamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en estrecho contacto con CDs, denota la formación de una estructura pseudolinfoide. Esta estructura no se evidenció al administrar Apo/Nec, CD, o CD+Apo/Nec (sin previo cocultivo), que no otorgan protección. Por lo tanto la estructura pseudolinfoide podría estar involucrada en el mecanismo de generación de protección antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec.

**2.10. La vacunación con CD-Apo/Nec no induce la diferenciación a linfocitos T regulatorios en el ganglio drenante.**

Se buscó determinar si la vacunación con CD-Apo/Nec generaba la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un perfil regulatorio, lo cual no sería beneficioso para un esquema de

vacunación antitumoral. Los linfocitos T regulatorios (Treg) se caracterizan por la expresión conjunta de CD4, CD25 y Foxp3.

A 5 días de una o cuatro dosis de vacuna se disgregaron los ganglios drenantes (inguinales), como se describe en Materiales y Métodos (3.2). Luego se marcaron las células con anticuerpos anti-CD4, anti-CD25 y anti-Foxp3, como se describe en Materiales y Métodos (6.2). Las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo y se observó que no existían diferencias significativas en el porcentaje de Treg entre los animales vacunados y los controles inyectados con vehículo (PBS) ( $P > 0,05$ ) (Fig. 24).



**Fig. 24: Linfocitos T regulatorios en ganglio drenante de animales vacunados con 1 o 4 dosis de vacuna.** A 5 días de una o cuatro dosis de vacuna se disgregó el ganglio drenante y se marcaron las células con anticuerpos anti CD4, CD25 y FOXP3. Se analizaron las poblaciones presentes por citometría de flujo, y se consideraron positivas las células CD25<sup>+</sup>, tanto CD4<sup>high</sup> como CD4<sup>low</sup>. Se analizaron los datos con el programa WinMDI2.8. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Anova y comparación de Tuckey ( $n=3$ ,  $\alpha=0,05$ ).

Se determinó de esta manera que la vacunación con CD-Apo/Nec y la formación del tejido pseudolinfoide no inducen, al menos en los ganglios drenantes al sitio de inyección, la diferenciación de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> hacia un perfil regulatorio.

### 2.11. Proliferación *in vivo* de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes B16-F1-específicos.

En trabajos previos del laboratorio se determinó que la protección antitumoral es dependiente de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Goldszmid et al. 2003), pero se desconocía si la vacunación

inducía la proliferación de estas células, y en caso afirmativo, dónde esto ocurría. La formación de una estructura pseudolinfoide en el sitio de vacunación, con vénulas expresando PNAd, y el reclutamiento de CD<sub>4</sub><sup>+</sup> y T CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, predecía una posible proliferación de linfocitos T vírgenes tumor-específicos en el sitio de vacunación.

Para responder a esta pregunta se utilizó el modelo de vacunación con CD-Apo/Nec OVA, en el que la vacunación se realizó utilizando como fuente de antígeno células de la línea B16-F1 OVA irradiadas (Apo/Nec OVA), como se describe en Materiales y Métodos (2.2.1). Las células B16-F1 OVA se encuentran establemente transfectadas con un vector de expresión de la proteína ovoalbúmina (OVA). El cultivo de esta línea se describe en Materiales y Métodos (1.2.1). La irradiación de las células B16-F1 OVA, la generación de la vacuna CD-Apo/Nec OVA y el esquema de vacunación fueron los mismos que para la vacuna CD-Apo/Nec.

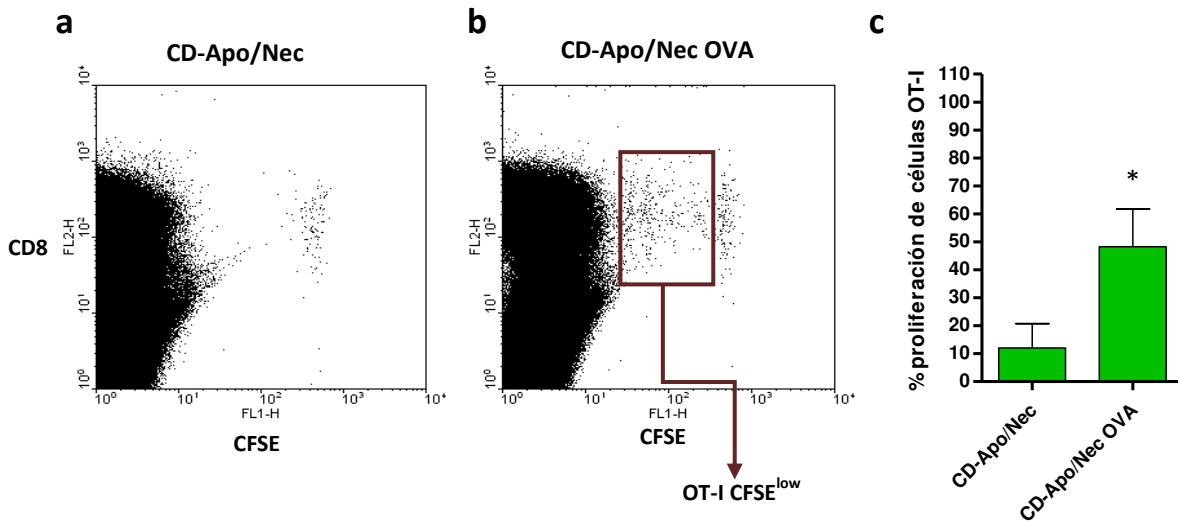
Se inmunizaron ratones C57BL/6 con 4 dosis de la vacuna CD-Apo/Nec OVA (n=3), y 3 horas previo a la cuarta vacunación se administraron de forma i.v.  $1 \times 10^6$  células provenientes de ganglios de ratones C57BL/6 OT-I marcadas con CFSE, como se describe en Materiales y Métodos (6.1). Los ratones OT-I poseen un solo clon de linfocitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> que reconocen la proteína OVA (residuos 257-264) presentada en el contexto del MHC-I (H-2K<sup>b</sup>). A las 72 horas de administrados los linfocitos OT-I marcados se sacrificaron los animales vacunados y se extrajeron los ganglios drenantes (inguinales) y el sitio de vacunación, como se describe en Materiales y Métodos (3.2 y 3.5 respectivamente). Se realizó una marcación con anticuerpos específicos para CD8, y luego se analizó por citometría de flujo la marca para CD8 y CFSE. El CFSE reacciona con aminos celulares formando conjugados que son retenidos dentro de la célula, pero al dividirse la célula las proteínas celulares se dividen en partes iguales entre las células hijas. Es por eso que observar bandas de decreciente intensidad de fluorescencia para CFSE es indicativo de proliferación celular. Como control negativo se utilizaron animales vacunados con la vacuna CD-Apo/Nec (n=3), y como control positivo de la capacidad proliferativa de los linfocitos provenientes de ratones OT-I se inyectó de forma s.c. 20 µg de una proteína recombinante que contiene la enzima lumazina sintetasa de *Brusella spp.* conjugada a los residuos 257-264 de la proteína OVA (BLS-OVA<sub>257-264</sub>). Esta enzima es altamente inmunogénica y al estar conjugada al péptido reconocido por los linfocitos provenientes de ratones OT-I, su reconocimiento induce la activación y proliferación de los linfocitos específicos (Berguer et al. 2012).



En el ganglio inguinal de los ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA fue posible detectar la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes OVA-específicos, visualizada como bandas de decreciente intensidad de fluorescencia para CFSE (**Fig. 25b**). Puede observarse que en 72 horas hubo al menos 4 rondas de proliferación. El porcentaje de proliferación se calculó como:

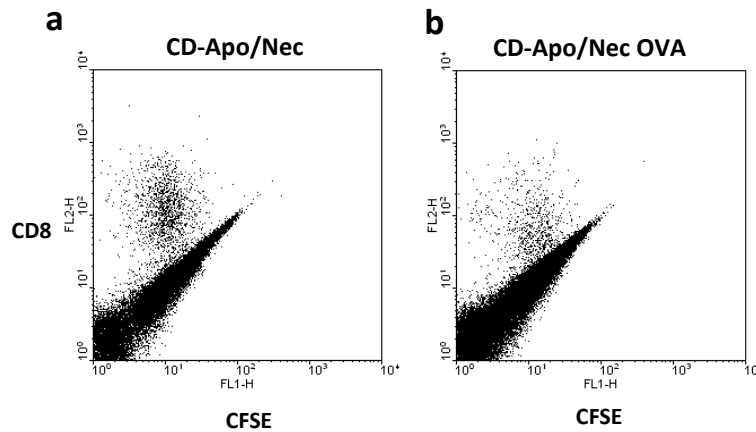
$$\% \text{ proliferación} = 100 \times \frac{\text{N}^\circ \text{ de células CD8}^+ \text{CFSE}^{\text{low}}}{\text{N}^\circ \text{ de células CD8}^+ \text{CFSE}^+}$$

El porcentaje de proliferación en los ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA fue del 48±24 %. El porcentaje de proliferación en los ratones control vacunados con CD-Apo/Nec fue de 12±15% (**Fig.25c**). La diferencia resultó significativa (p<0,05). Con la inyección de la proteína BLS-OVA<sub>257-264</sub> se observó 100% de proliferación.



**Fig.25: Proliferación de linfocitos antígeno-específicos en el ganglio drenante de ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA. (a)** Linfocitos CFSE<sup>high</sup> en ganglio de animales vacunados con CD-Apo/Nec. **(b)** Linfocitos CFSE<sup>high</sup> y CFSE<sup>low</sup> en animales vacunados con CD-Apo/Nec OVA. **(c)** Porcentajes de proliferación de linfocitos CD8<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> en el ganglio drenante, para los diferentes tratamientos. No se incluyó el control con proteína BLS-OVA<sub>257-264</sub> porque se trató de un solo dato. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba T de Student (n=3; α=0,05; \*p<0,05)).

En el sitio de vacunación con CD-Apo/Nec OVA no fue posible detectar la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que fuesen CFSE<sup>+</sup> (**Fig. 26b**). Por lo tanto no sería el sitio de vacunación donde los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes B16-F1-específicos son reclutados o activados. (**Fig. 26**).



**Fig.26: Proliferación de linfocitos OVA-específicos en el sitio de vacunación de ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA. (a)** Vacunación con CD-Apo/Nec. **(b)** Vacunación con CD-Apo/Nec OVA. **(c)** Administración de cuatro dosis de PBS. **(d)** Porcentaje de células CD8<sup>+</sup> sobre el total de células presentes en el sitio de vacunación, para los diferentes tratamientos. Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA y comparación de Tuckey (n=3,  $\alpha=0,05$ ).

Estos resultados muestran que existe una respuesta T CD8<sup>+</sup> B16-F1-específica en el ganglio drenante de ratones vacunados. A pesar de la baja migración observada a 24 horas post-inyección de las células CD-Apo/Nec a los ganglios linfáticos, éstas u otras células presentadoras del huésped realizarían en los mismos una eficiente presentación de los antígenos tumorales a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, induciendo la proliferación de linfocitos vírgenes B16-F1-específicos, que puede ser visualizada a los 3 días post-inyección. La acumulación de las células CD-Apo/Nec en el sitio de vacunación podría servir como un lugar de depósito de antígenos tumorales, que permitiría una presentación más extendida en el tiempo a linfocitos específicos.

## 2.12. Análisis de las subpoblaciones de linfocitos T en animales vacunados protegidos y no protegidos.

Con el objetivo de analizar las condiciones que llevan al rechazo o protección de los animales vacunados con CD-Apo/Nec se determinaron las subpoblaciones de linfocitos T presentes en ganglios linfáticos drenantes, bazo y tumor de animales protegidos y no protegidos. Se realizó el

desafío tumoral en animales vacunados con el esquema completo de CD-Apo/Nec y en controles no vacunados (Fig. 27).

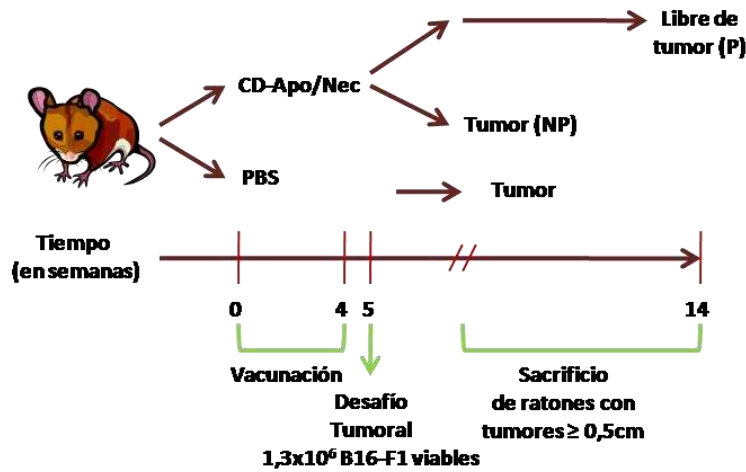
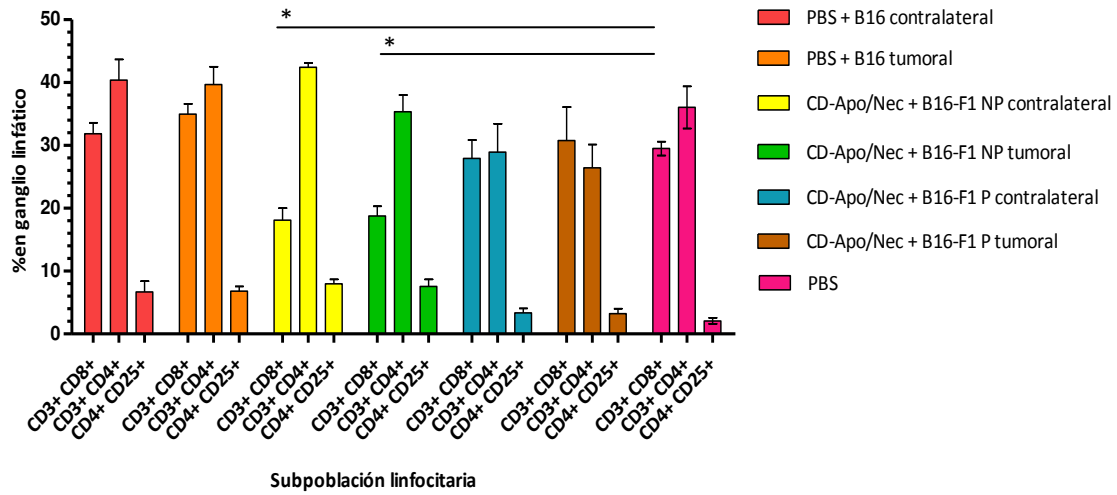


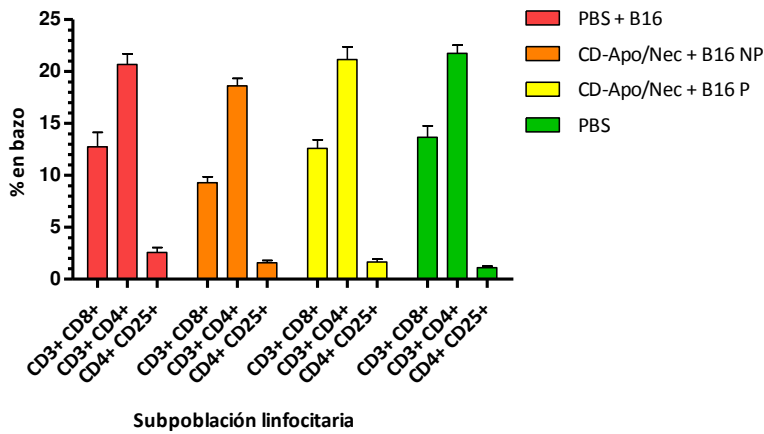
Fig. 27: Esquema de vacunación con CD-Apo/Nec, posterior desafío tumoral, y toma de muestras de animales protegidos y no protegidos. P=protegido; NP=no protegido.

Se monitoreó la aparición de tumores por palpación durante 10 semanas post-desafío tumoral. Los animales en los que se detectó tumor fueron sacrificados cuando el tumor alcanzó los 0,5 cm de diámetro. Los animales vacunados en los que no se detectó la aparición de tumores, fueron considerados protegidos y sacrificados a las 10 semanas de realizado el desafío tumoral. En todos los casos se analizaron el bazo y los ganglios inguinales ipsilateral y contralateral al sitio de desafío tumoral, que se disgregaron como se describe en Materiales y Métodos (3.2, 3.3 y 3.4). Luego se realizaron marcaciones con anticuerpos específicos para linfocitos colaboradores  $CD3^+CD4^+$ , linfocitos  $CD3^+CD8^+$  y linfocitos Treg  $CD4^+CD25^+$  como se describe en Materiales y Métodos (4.1). Los datos se analizaron por citometría de flujo (Fig.28).

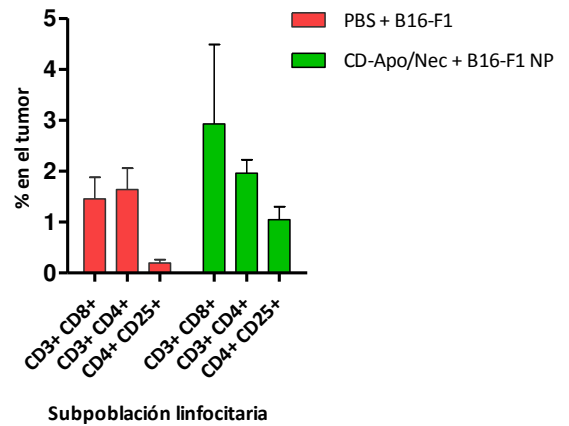
**a Ganglio linfático**



**b Bazo**



**c Tumor**



**Fig. 28: Análisis de subpoblaciones de linfocitos T.** En (a) ganglios linfáticos; (b) bazo; (c) tumor. Se analizaron por citometría de flujo los porcentajes de linfocitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> en animales vacunados con 4 dosis de CD-Apo/Nec protegidos (P), no protegidos (NP) o controles (PBS), con o sin desafío tumoral con B16-F1 viables. Se muestra el promedio +SEM para cada tratamiento (n=3). Análisis estadístico: Anova más comparación de Dunnet (n≥3, α=0,05).

Se observó una disminución significativa en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos de animales vacunados y no protegidos con respecto a los controles (p<0,05) (Fig. 28a). No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o Treg.

Por otro lado, en bazo o tumor no se observaron diferencias significativas entre ninguna de las subpoblaciones de linfocitos T analizadas (**Fig. 28b-c**).

La disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos de los animales vacunados pero no protegidos (con tumor incipiente) resulta llamativa, ya que sugiere una emigración de esta población de los ganglios, o la muerte de este subtipo celular. Cuando analizamos lo que sucede en los tumores de estos animales, parecería haber un reclutamiento de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, favoreciendo la hipótesis de la emigración, pero este aumento en el porcentaje no resulta finalmente significativo. Lo que sí está claro es que hay una respuesta inmune debida a la vacunación, ya que la disminución en el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en los ganglios linfáticos no ocurre en los animales con tumor incipiente que no fueron vacunados.

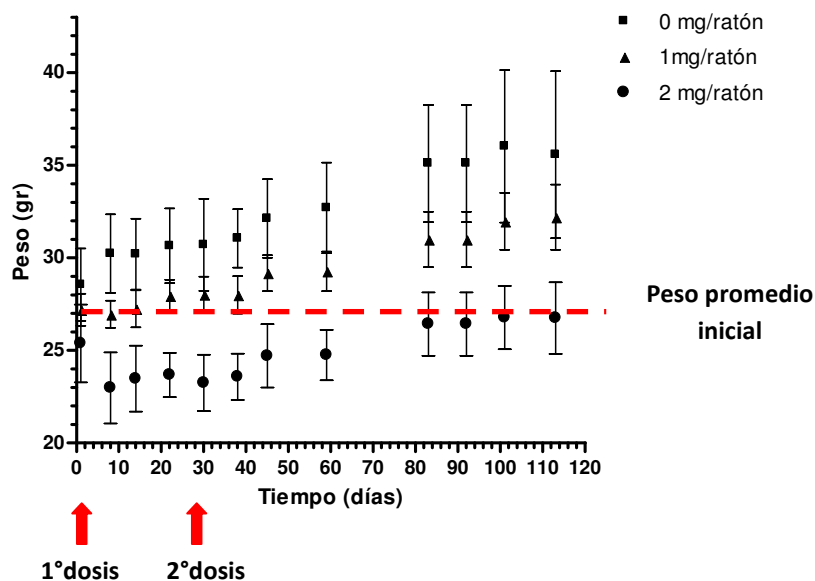
Por otro lado, en los animales vacunados y protegidos luego de 10 semanas de realizado el desafío tumoral puede observarse que el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en el ganglio drenante no varía con respecto al grupo no vacunado y desafiado (con tumor incipiente en todos los casos), o al grupo no vacunado y no desafiado (PBS) (sin tumor). Por lo tanto, en los animales no vacunados, cuando un tumor escapa al control del sistema inmune no hay un efecto en las proporciones de linfocitos T en los ganglios linfáticos drenantes.

Restaría saber si en los animales protegidos al corto tiempo de realizado el desafío tumoral hay también una respuesta de redistribución de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> hacia el tejido periférico. Lamentablemente, este experimento es imposible de realizar porque hasta ahora no tenemos un marcador que defina cuáles animales serán protegidos y cuáles no, por lo que se debe esperar 10 semanas luego del desafío tumoral para determinarlo.

**CAPÍTULO III: BÚSQUEDA DE CONDICIONES QUE POTENCIEN LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LA VACUNA CD-APO/NEC****3.1. Preacondicionamiento del huésped a la vacunación**

Se decidió analizar si al preacondicionar al huésped era posible incrementar el nivel de protección antitumoral obtenido con la vacuna CD-Apo/Nec. Con este fin se probaron dos estrategias. Por un lado se administró ciclofosfamida un día antes de la primera y tercera inyección. Nuestra hipótesis fue que administrar ciclofosfamida previo a la vacunación disminuiría el número de Tregs, facilitando la activación por células CD-Apo/Nec de linfocitos T específicos. Por otro lado, se aplicó imiquimod 5% tópico en la zona de aplicación de la vacuna. Postulamos que en nuestro sistema la aplicación tópica de imiquimod podría actuar atrayendo poblaciones inflamatorias a la zona, por lo que se facilitarían la eliminación de las células Apo/Nec y ayudaría a madurar a las células presentadoras presentes en el sitio de inyección de la vacuna, facilitando su migración y presentación de los antígenos tumorales en los ganglios linfáticos.

Para comenzar, se analizó la toxicidad de diferentes dosis i.p. de ciclofosfamida en ratones C57BL/6. Basándose en bibliografía, se ensayó la administración i.p. de dos dosis de 1mg o 2 mg de ciclofosfamida, y un grupo control inyectado con vehículo, y se evaluó la evolución del peso hasta los 113 días post-inyección (**Fig.29**), como se describe en Materiales y Métodos (2.2.3).



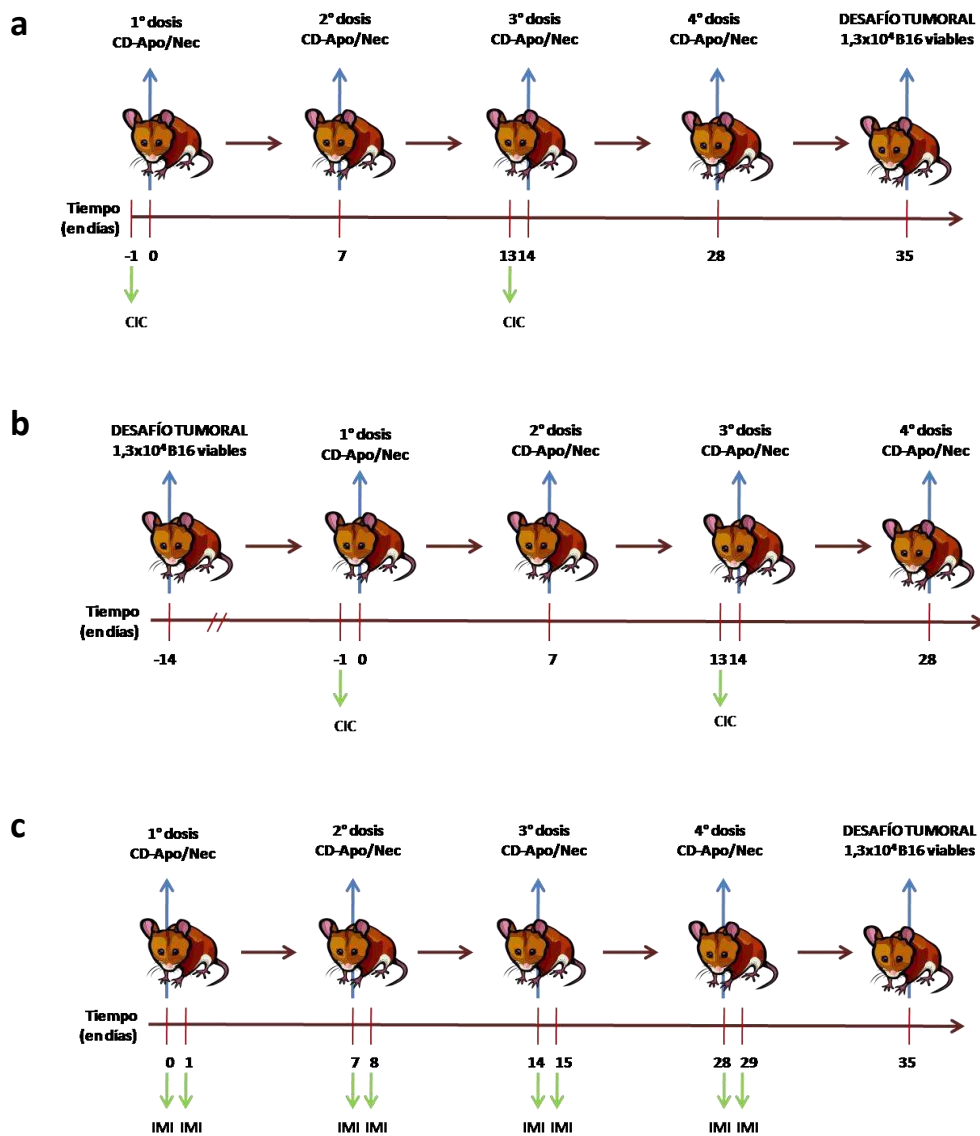
**Fig. 29: Evolución del peso de los animales inyectados con diferentes dosis de ciclofosfamida.** Se administró una primera dosis al día 0 y una segunda dosis al día 27 de 1 mg, 2 mg o vehículo (0 mg). (n=4, se muestra el promedio y el desvío estándar). Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA más comparación de Tuckey ( $\alpha=0,05$ ) de los pesos observados al tiempo final (día 113).

Se observó que dos dosis de 2 mg resultaban tóxicas y afectaba el peso final de los animales, que no fueron capaces a los 86 días post-inyección de superar el peso promedio inicial, resultando al tiempo final observado en una significativa pérdida en peso con respecto al grupo control ( $p<0,05$ ). No se observó una pérdida de peso significativa en los animales tratados con dos dosis de 1 mg con respecto al grupo control ( $p>0,05$ ).

Se decidió entonces a precondicionar a los ratones vacunados con CD-Apo/Nec con dos dosis i.p. de 1 mg de ciclofosfamida. Se administró la primera dosis junto con la primera vacuna, para que desde el comienzo esté presente la ciclofosfamida en la generación de la respuesta antitumoral. La segunda dosis se administró 15 días después junto con la tercera vacunación, para que esté espaciada de la primera administración de la droga y que a su vez no afecte el posterior establecimiento de las células tumorales, que se realizó dos semanas después.

Se procedió a realizar un experimento de protección *in vivo*, combinando la vacunación con CD-Apo/Nec con tres nuevos esquemas de precondicionamiento. Al grupo de animales CD-Apo/Nec CIC se les administró una dosis i.p. de 1mg ciclofosfamida 24 horas previo a la primera y tercera inyección de CD-Apo/Nec (**Fig. 30a**), como se describe en Materiales y

Métodos (2.2.4). El grupo CD-Apo/Nec CIC post recibió el mismo esquema de tratamiento con ciclofosfamida, pero la primera vacunación se realizó al día 14 de realizado el desafío tumoral con células B16-F1 viables (**Fig 30b**), como se describe en Materiales y Métodos (2.2.5). Este sería un esquema de vacunación con CD-Apo/Nec terapéutico ya que a los 14 días los tumores de B16-F1 se encuentran establecidos. Al tercer grupo, CD-Apo/Nec IMI, se le administró imiquimod 5% tópico media hora antes, y 24 horas luego de cada inyección (**Fig. 30c**), como se describe en Materiales y Métodos (2.2.2). Por último, se incluyó un grupo con el esquema tradicional de vacunación con CD-Apo/Nec, y un grupo control no vacunado (con cuatro administraciones de vehículo PBS).

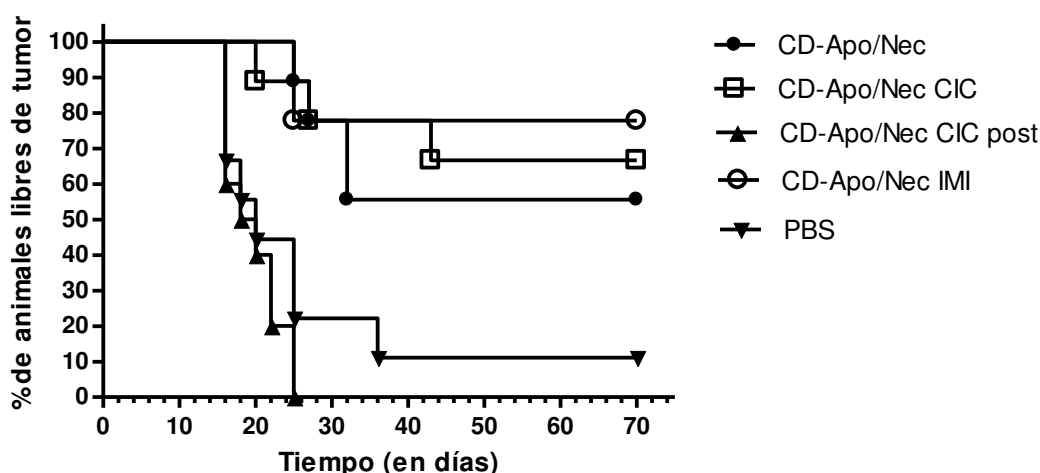


**Fig. 30:** Esquemas de vacunación con precondicionamiento del huésped. (a) CD-Apo/Nec IMI; (b) CD-Apo/Nec CIC; (c) CD-Apo/Nec CIC post.



Todos los esquemas de vacunación preventiva utilizados otorgaron protección antitumoral ( $p < 0,05$  con respecto al control no vacunado). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre la vacuna CD-Apo/Nec tradicional, la administrada con ciclofosfamida i.p., y la administrada con la aplicación tópica de imiquimod. Sin embargo, con la aplicación tópica de Imiquimod se alcanzó un 22% más de protección antitumoral que con la vacuna CD-Apo/Nec tradicional.

Por otro lado, se observó que el esquema de vacunación con CD-Apo/Nec y ciclofosfamida administrado de manera terapéutica (una vez establecidos los tumores) no otorga protección antitumoral (**Fig. 31**). El porcentaje de animales libres de tumor a lo largo del tiempo evaluado no difiere del grupo control no vacunado ( $p > 0,05$ ).



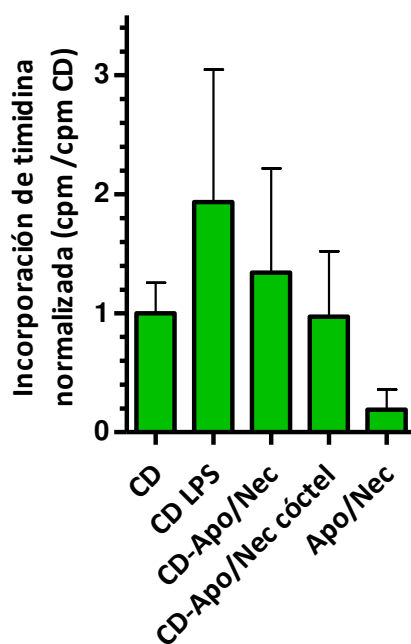
**Fig. 31: Curva sobrevida al precondicionar al huésped a la vacunación con CD-Apo/Nec.** Método de Kaplan-Meier. CD-Apo/Nec: 4 dosis de CD-Apo/Nec; CD-Apo/Nec CIC: una dosis i.p. de 1mg ciclofosfamida 24 horas previo a la primera y tercera inyección con CD-Apo/Nec; CD-Apo/Nec CIC post: una dosis i.p. de 1mg ciclofosfamida 24 horas previo a la primera y tercera inyección con CD-Apo/Nec, pero la primera vacunación se realizó al día 14 de realizado el desafío tumoral con células B16-F1 viables; CD-Apo/Nec IMI: imiquimod 5% tópico media hora antes, y 24 horas luego de cada inyección con CD-Apo/Nec; PBS: grupo control no vacunado (cuatro inyecciones de PBS); (n=10;  $\alpha=0,05$ ).

### 3.2. La capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de las células CD-Apo/Nec no se incrementa al agregar cóctel de citoquinas inflamatorias.

Con el fin de determinar condiciones de cultivo *in vitro* que pudiesen aumentar la capacidad inmunoestimuladora de las CD-Apo/Nec, se procedió a realizar el cocultivo en presencia de un cóctel de citoquinas ampliamente utilizado para inducir la maduración de CDs

humanas. Este cóctel consiste en citoquinas normalmente generadas durante los procesos inflamatorios:  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, junto con prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). La PGE<sub>2</sub> se incluyó en el cóctel porque aunque está descrita mayormente como una molécula inmunosupresora, se ha observado que en un contexto inflamatorio aumenta la maduración y migración de las CD a los ganglios linfáticos (Jonuleit et al. 1997). Para evaluar la capacidad inmunoestimuladora de las CD-Apo/Nec se realizaron ensayos de reacción linfocitaria mixta, como se describe en Materiales y Métodos (6.3).

Luego de 24 horas de cocultivo de las CDs con las Apo/Nec con 10 ng/ml de  $TNF\alpha$ -, 10 ng/ml de IL-1 $\beta$ , 100 ng/ml de IL-6 y 1  $\mu$ g/ml de PGE<sub>2</sub>, se inhibió su proliferación con Mitomicina C, y se enfrentaron a linfocitos alogénicos provenientes de ratones Balb/c. A los tres días, se midió la proliferación de los linfocitos alogénicos con un pulso de timidina tritiada y posterior análisis en contador de centelleo (**Fig. 32**).



**Fig. 32: Estimulación de linfocitos alogénicos al estimular CDs con cóctel de citoquinas.** Los diferentes grupos de células estimuladoras fueron incubadas con mitomicina C y enfrentadas a linfocitos provenientes de médula ósea de ratones Balb/c (células efectoras) en relaciones estimuladoras: efectoras de 1:10, 1/100 y 1/1000. Se muestra la media de incorporación de timidina de cada tratamiento (normalizada al tratamiento control con CDs) para la relación 1/100. Se realizaron 3 experimentos independientes, se muestra la media más el desvío estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA con un diseño en bloque al azar ( $\alpha=0,05$ ).

Se observó que el cocultivo de 24 horas de las CD inmaduras con las Apo/Nec no incrementa su capacidad inmunoestimuladora *in vitro*. Sin embargo, hemos probado que las CD-Apo/Nec poseen capacidad inmunoestimuladora *in vivo*, induciendo la proliferación de linfocitos específicos en los ganglios drenantes, sin inducir un perfil T regulatorio.

Lamentablemente, el agregado del cóctel de citoquinas no mejora la capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de las CD-Apo/Nec.

**3.3. La capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de las células CD-Apo/Nec no se incrementa al agregar agonistas de receptores de tipo Toll.**

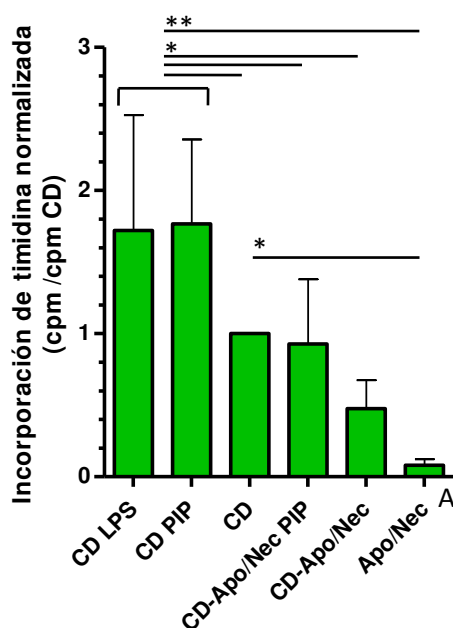
Se estudió incrementar la capacidad inmunoestimuladora de las CD-Apo/Nec utilizando durante el cocultivo una mezcla de ligandos de TLR. Los TLR pertenecen al sistema inmune innato, y sus agonistas serían capaces de estimular las CDs activando la vía de NF-κB (Kawai and Akira 2011). Se ha observado que el uso de agonistas para TLR7 Y TLR8 en CDs humanas derivadas de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) generó respuestas polarizadas hacia un perfil Th1 (Spranger et al. 2010; Frankenberger and Schendel 2012). Se ha observado también que el uso combinado de agonistas que son reconocidos por diferentes TLR actúa de manera sinérgica para generar respuestas Th1 en CDs humanas de PBMC y CDs murinas de ratones Balb/c. El TLR3 y TLR4 (señalizan por la vía alternativa de TRIF) actúan de forma sinérgica con los TLR7, TLR8 y TLR9 (Napolitani et al. 2005). El poly I:C (*polyriboinosinic : polyribocytidylic acid*) es un agonista de TLR3 que induce la maduración de CDs murinas derivadas de médula ósea y de CDs humanas de PBMC (Verdijk et al. 1999; Tsujimoto et al. 2006). Se ha probado su alta capacidad adyuvante para la inducción de respuestas Th1 mediadas por CDs al inyectarse de forma i.p. (Longhi et al. 2009).

Se analizó por citometría de flujo el aumento en la expresión de diferentes marcadores de maduración de las CDs al utilizar diferentes combinaciones de Poly I:C, Imiquimod (agonista de TLR 7) y PGE<sub>2</sub> (Tabla 6).

	CD	CD LPS 2ug/ml	CD Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 10 ug/ml.	CD Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 10 ug/ml, PGE2 10 ug/ml.	CD Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 3 ug/ml, PGE2 10 ug/ml.
I-A <sup>b</sup>	32±1	55±4	50±0	46±7	46±6
CD80	41±13	61±13	45±14	68±13	57±32
CD86	42±3	86±4	61±2	73±21	69±11

**Tabla 6: Porcentaje de positividad para los diferentes marcadores de maduración (I-A<sup>b</sup>, CD80 y CD86) de las CDs.** Se incubaron las CD por 24 h con diferentes combinaciones de los agentes inmunomoduladores. Luego se fijaron y se midió su positividad por citometría de flujo. Se realizaron dos experimentos independientes, en la tabla se muestran las medias más el desvío estándar.

Las mejores condiciones de maduración se consiguieron con las condiciones de Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 10 ug/ml y PGE2 10 ug/ml, obteniéndose alta expresión de I-A<sup>b</sup> y de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Al quitar la PGE<sub>2</sub> de la mezcla las condiciones obtenidas resultaron menos favorables, observándose una disminución en la expresión de CD80 y CD86, aunque la expresión de I-Ab fuese alta. Es por esta razón que se procedió a utilizar Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 10 ug/ml y PGE2 10 ug/ml para estimular las CDs durante el cocultivo con las Apo/Nec, evaluando luego la capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de estas CD-Apo/Nec por ensayos de reacción linfocitaria mixta (**Fig. 33**), como se describe en Materiales y Métodos (6.3).



**Fig. 33: Estimulación de linfocitos alogénicos al estimular CDs con PIP.** Los diferentes grupos de células estimuladoras fueron incubadas con mitomicina C y enfrentadas a linfocitos provenientes de médula ósea de ratones Balb/c (células efectoras) en relaciones estimuladoras: efectoras de 1/10, 1/100 y 1/1000. Se muestran los resultados obtenidos con la relación 1/100. La proliferación de los linfocitos fue medida por incorporación de timidina tritiada. Se realizaron 3 experimentos independientes, se muestra la media más el desvío estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA con un diseño en bloque al azar ( $\alpha=0,05$ ).

Se observó que las CD-Apo/Nec poseen una capacidad inmunoestimuladora significativamente menor que las CDs maduras con LPS o PIP. Lamentablemente, el tratamiento con PIP no fue capaz de aumentar significativamente la capacidad inmunoestimuladora de las células CD-Apo/Nec. Claramente, existe algún factor soluble o impedimento estérico aportado por las Apo/Nec que está afectando la capacidad de las CDs de interactuar eficientemente con los linfocitos inhibiendo su activación. EL agregado de PIP no es capaz de revertir significativamente este escenario.

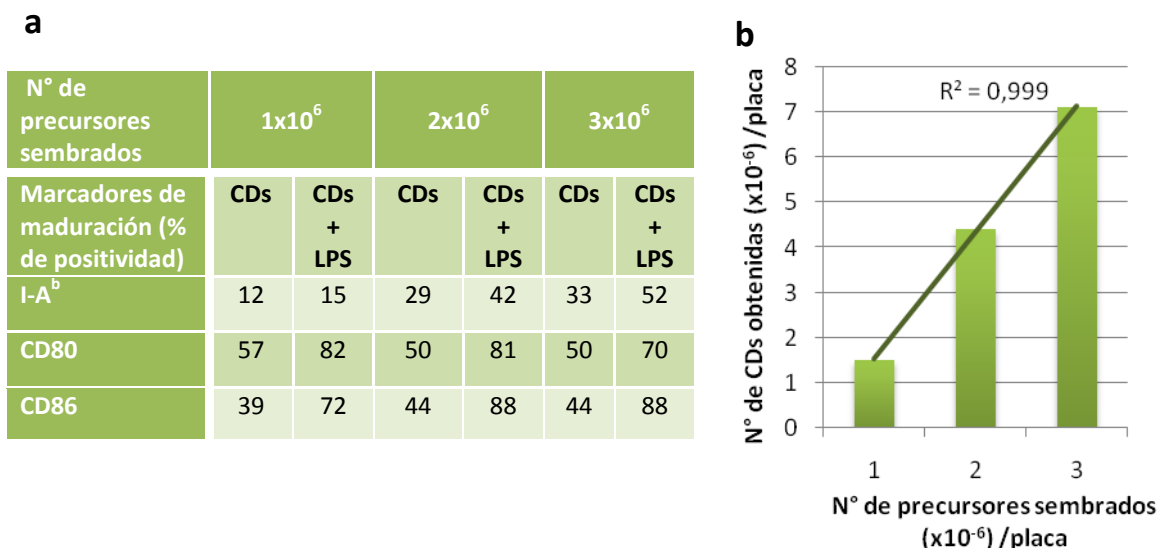
### 3.4. Diferenciación *in vitro* de CDs: Efecto de la densidad inicial de células de médula ósea sobre los niveles de maduración y el número de CDs obtenidas.

Las CDs utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec deberían cumplir dos requisitos fundamentales. Por un lado, durante el cocultivo con células Apo/Nec deben incorporar eficientemente antígenos tumorales provenientes de estas células. Por otro lado, deben ser capaces de presentar eficientemente estos antígenos a linfocitos T vírgenes. Estas dos características estarían asociadas al estado de maduración de las CDs. Las CDs deberían poseer un estado inmaduro al comenzar el proceso de cocultivo, de forma de poseer una alta capacidad fagocítica. Sin embargo, deben ser capaces de madurar y sobreexpresar moléculas coestimuladoras, necesarias para la activación de linfocitos T vírgenes.

En trabajos anteriores del laboratorio se ha descrito que las CDs utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec poseían altos niveles de expresión de I-A<sup>b</sup> y CD86 (Goldszmid et al. 2003). Por otro lado, el agregado durante el cocultivo de citoquinas o ligandos de receptores de tipo Toll no mejora significativamente la capacidad inmunoestimuladora de las células CD-Apo/Nec. Para probar si las condiciones de diferenciación de las CDs podían ser mejoradas, en otras palabras, si era posible obtener CDs más inmaduras pero capaces de madurar eficientemente, se ensayaron durante la diferenciación *in vitro* de CDs densidades iniciales menores de precursores de médula ósea.

Se ha descrito que durante el proceso de diferenciación *in vitro* de CDs derivadas de médula ósea diferentes factores influyen en el estado de maduración de las CDs obtenidas. Los factores influyentes serían, entre otros, la edad y salud de los animales, la densidad de los precursores provenientes de médula ósea sembrados al comenzar el cultivo y las citoquinas como IL-3, IL-4, Flt3 ligando y GM-CSF adicionadas durante el cultivo. Por ejemplo, al incrementar la densidad de precursores provenientes de médula ósea sembrados, aumenta el estado de maduración de las CDs obtenidas al final del proceso de diferenciación (Lutz and Rossner 2007).

Se sembraron células provenientes de médula ósea (precursores de CDs) en las condiciones originales ( $3 \times 10^6$  células por placa) o en densidades menores ( $2 \times 10^6$  y  $1 \times 10^6$  células por placa), cultivándose durante 7 días con GM-CSF como se describe en Materiales y Métodos (1.2.2). Al finalizar el cultivo se determinó el número final de células (CDs) obtenidas y se evaluaron marcadores de maduración de CDs (I-A<sup>b</sup>, CD80 y CD86) como se describe en Materiales y Métodos (4.1). Por otro lado, como es necesario que las CDs respondan correctamente ante un estímulo de maduración, se evaluaron marcadores de maduración en CDs cultivadas 24 horas en presencia de LPS.



**Fig. 34:** Diferenciación *in vitro* de CDs utilizando diferentes densidades iniciales de precursores. **(a)** Tabla con los porcentajes de positividad obtenidos para I-A<sup>b</sup>, CD80 y CD86 luego de 7 días de cultivo con GM-CSF, y luego de 7 días de cultivo con GM-CSF seguido de 24 horas de estimulación con 2 µg/ml de LPS. **(b)** Número de células (CDs) obtenidas a los 7 días de cultivo (por placa de 8 ml) en función del número de precursores iniciales sembrados.

La densidad celular de los precursores de CDs sembrados al comienzo del proceso de diferenciación afectó el nivel de maduración de las CDs obtenidas (**Fig. 34a**). Se observó que al plaquear un bajo número inicial de precursores (1x10<sup>6</sup>), éstos se diferenciaron a CDs de bajo porcentaje inicial de positividad para I-A<sup>b</sup>, y éste porcentaje no se incrementó ante el estímulo con LPS. Por lo tanto estas CDs no serían eficientes presentadoras de antígenos a linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes. En cambio, al plaquear 2x10<sup>6</sup> o 3x10<sup>6</sup> precursores, se observó un porcentaje de positividad inicial para I-A<sup>b</sup> mayor, lo cual no sería ideal para un fenotipo inicial inmaduro, pero al estimular con LPS estas CDs fueron capaces de responder eficientemente aumentando la expresión de I-A<sup>b</sup> en superficie. El mayor porcentaje de positividad para I-A<sup>b</sup> obtenido luego de la estimulación con LPS se alcanzó sembrando 3x10<sup>6</sup> precursores.

Con respecto a las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, se observaron porcentajes de positividad iniciales semejantes para las tres condiciones de cultivo analizadas, y un incremento similar luego de la estimulación con LPS. Por lo tanto, con las tres condiciones las CDs serían capaces de responder al estímulo madurativo con LPS aumentando los niveles de CD80 y CD86 en superficie.

Con respecto al número de CDs obtenidas al finalizar el proceso de diferenciación, se observó que sembrando entre 1x10<sup>6</sup> y 3x10<sup>6</sup> precursores el número de CDs obtenidas era directamente proporcional al número de precursores sembrados. En nuestro sistema, es importante obtener un buen número de CDs por placa al final del proceso, y el mayor número de CDs obtenidas fue de 7x10<sup>6</sup> CDs, al plaquear 3x10<sup>6</sup> precursores iniciales por placa (**Fig. 34b**).

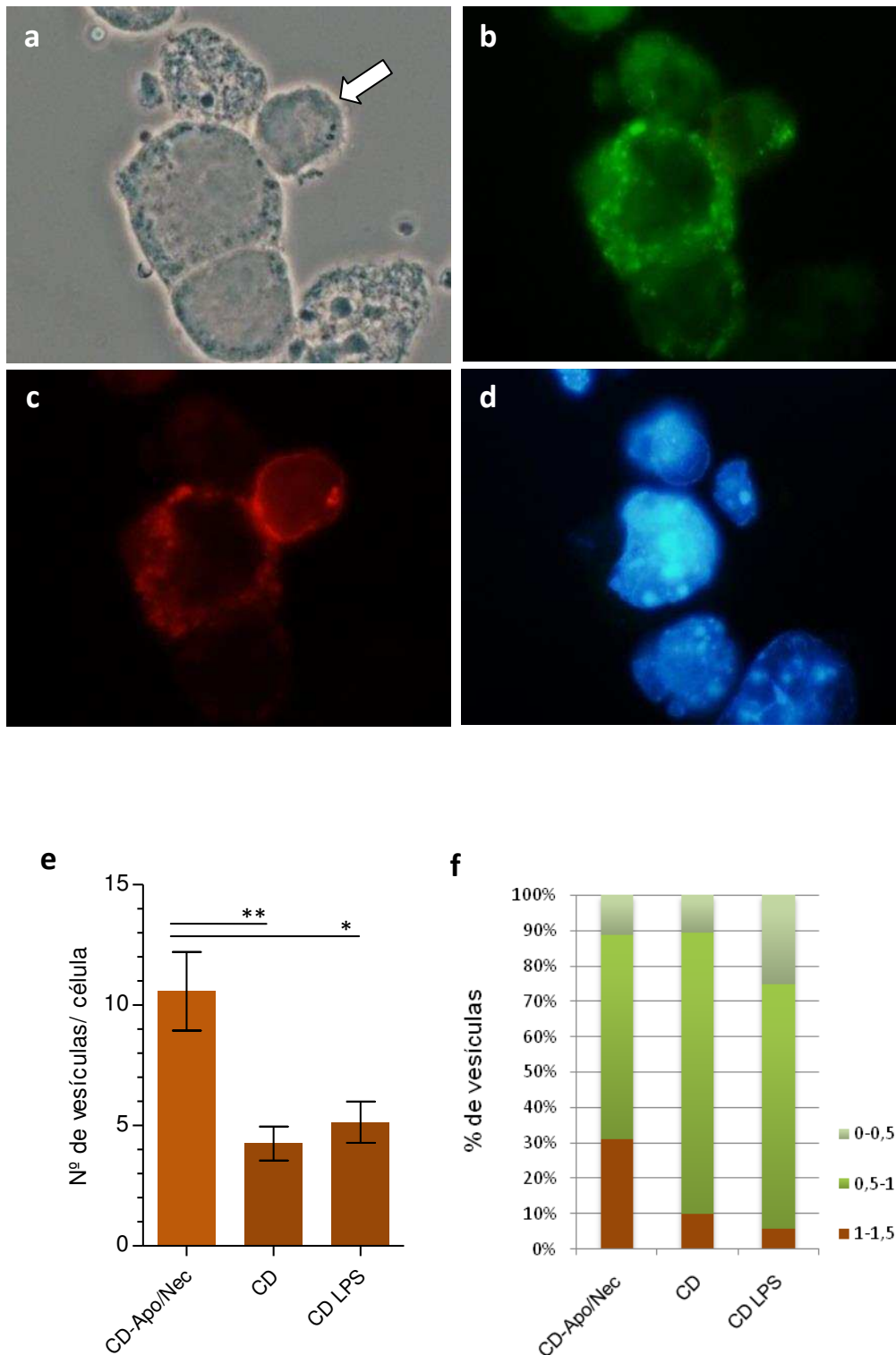
Plaques  $3 \times 10^6$  precursores por placa al comienzo del proceso de diferenciación generó un gran número de CD80 capaces de responder correctamente ante un estímulo madurativo con LPS incrementando 58% el nivel de positividad para I-A<sup>b</sup>, e incrementando 40% y 100% los niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 respectivamente. No fue posible entonces mejorar significativamente las condiciones de diferenciación de las CD80.

### 3.5. Acumulación de lípidos neutros en las CD80 durante el cocultivo con las Apo/Nec

Se ha descrito que la acumulación de lípidos en las CD80 altera su capacidad de procesar antígenos tumorales y de presentarlos eficientemente a linfocitos T. Sin embargo no se ha definido con exactitud cómo es que la acumulación de lípidos en las CD80 afecta su rol inmunológico en el desarrollo de una respuesta antitumoral. Como se mostró en el Capítulo I, hemos observado por microscopía electrónica en las CD80 durante el cocultivo con Apo/Nec la acumulación citoplasmática de vesículas de baja densidad que podrían corresponder a depósitos de lípidos neutros. Se buscó entonces determinar si las CD80 acumulan durante el cocultivo con las Apo/Nec lípidos neutros, que podría explicar la dificultad de aumentar la capacidad inmunoestimuladora de la vacuna CD-Apo/Nec.

Se procedió a caracterizar la acumulación de lípidos en CD80, en CD80 maduras con LPS, y en CD80 luego de 24 horas de cocultivo con células Apo/Nec, como se detalla en Materiales y Métodos (4.5). Para la detección de los lípidos se utilizó la sonda fluorescente Bodipy 493/503 que se intercala con los lípidos neutros y puede ser visualizada con el microscopio de fluorescencia (**Fig. 35b**). A su vez se realizó una marcación para CD11c (**Fig. 35c**) para poder discriminar a las CD80 de las Apo/Nec y simultáneamente se tiñeron los núcleos con Hoechst (**Fig. 35d**). Se contabilizó el número de vesículas por célula CD11c<sup>+</sup> y se midió el tamaño de cada una de estas vesículas (**Fig. 35e-f**).

Se observó en las CD-Apo/Nec un aumento significativo en el número promedio de vesículas por célula ( $p < 0,001$ ), debido al cocultivo con las Apo/Nec y no al proceso de maduración, ya que es significativamente mayor que en las CD80 tratadas con LPS ( $p < 0,01$ ). Se registró a su vez un aumento significativo en las CD80 debido al cocultivo con las Apo/Nec en el número de vesículas grandes, de entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$  ( $p < 0,001$ ). Esta acumulación de lípidos neutros en las CD80 durante el cocultivo con las Apo/Nec podría estar afectando la capacidad inmunoestimuladora de la vacuna CD-Apo/Nec.



**Fig. 35: Caracterización de las vesículas lipídicas neutras en las CDs, CDs LPS y CD-Apo/Nec.** Se tomaron CDs, CDs maduradas con LPS (1 ug/ml) y CD-Apo/Nec, y se marcaron con Bodipy 493/503 (10 ug/ml), anticuerpo anti-CD11c-PE y Hóechst (1ug/ml). Las células fueron fijadas y observadas al microscopio de fluorescencia. . **(a-c)** Mismo campo: **(a)** Luz transmitida. Se observa una CD (flecha) ; **(b)** Marcación con Bodipy; **(c)** Marcación con CD11c; **(d)** Marcación con Hóechst. **(e)** Se contó el número de vesículas por célula CD11c<sup>+</sup> utilizando el programa Image J. Se muestra el promedio más SEM de cada tratamiento. **(f)** Se determinó el tamaño de cada vesícula en las células CD11c<sup>+</sup> utilizando el Image J. Se muestra el porcentaje de vesículas para cada tratamiento con un diámetro de 0-0,5 µm (gris), 0,5-1 µm (verde) y 1-1,5 µm (naranja). Para el análisis estadístico se utilizó el ANOVA más comparación de Tuckey ( $\alpha=0.05$ ).



## DISCUSIÓN

En el presente trabajo de Tesis se han explorado diferentes aspectos de la regulación inmune mediante los cuales la vacunación con CD-Apo/Nec provee protección contra el melanoma murino B16-F1. El MC metastásico es un cáncer sumamente agresivo. En el estadio IIC luego de la remoción del tumor primario, y en el estadio III luego de la remoción del tumor primario y de metástasis a ganglios, permanece el riesgo de existencia de micrometástasis en otros órganos. Es en estos casos que postulamos que la vacunación con CD-Apo/Nec ayudaría a prevenir futuras recurrencias. Entender los mecanismos mediante los cuales se genera protección antitumoral a largo plazo con una inmunoterapia de escasa toxicidad (von Euw et al. 2008) como la vacuna CD-Apo/Nec, resulta de gran importancia para planear nuevas aproximaciones y estrategias de combinación que logren mejorar las terapias anti-melanoma existentes.

### CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC

Mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión fue posible estudiar en detalle la morfología de las CDs y de las Apo/Nec durante el cocultivo. Las CDs mostraron inicialmente una morfología inmadura, caracterizada por numerosas prolongaciones citoplasmáticas. Fue posible observar a estas prolongaciones alcanzar cuerpos apoptóticos, y también rodear restos de Apo/Nec. Se observaron a las 12 horas fagosomas tempranos con restos de Apo/Nec en su interior. A lo largo del cocultivo se observó una disminución en el número y la longitud de las prolongaciones citoplasmáticas, concordantes con una morfología madura. Por otro lado, no fue posible observar claramente la fagocitosis de células Apo/Nec enteras. Otros grupos han descrito que las CDs son capaces de incorporar proteínas clivadas provenientes de células apoptóticas por uniones comunicantes (gap junctions) favoreciendo la presentación cruzada de estos péptidos (Pang et al. 2009) . Nosotros no observamos este tipo de unión. Por lo tanto, las CDs estarían incorporando antígenos tumorales mayormente a través de los procesos de pinocitosis y de fagocitosis de cuerpos apoptóticos y restos celulares provenientes de células B16-F1 necróticas o apoptóticas tardías. Por citometría de flujo confirmamos la efectiva incorporación de Apo/Nec por CDs, que se observó muy eficiente hasta las 24 horas. A este tiempo, el porcentaje de fagocitosis fue de  $59\% \pm 13\%$ . Un importante porcentaje de CDs no incorporan Apo/Nec, mostrando que existe heterogeneidad

entre las CDs de la vacuna CD-Apo/Nec. Entre las 24 y 48 horas fue mínimo el aumento en la incorporación de Apo/Nec por las CDs.

Se observó a su vez por microscopía electrónica la acumulación progresiva a lo largo del cocultivo vesículas homogéneas de baja densidad en el citoplasma de las CDs. Estas vesículas se encontraban entre los pliegues del RE. Postulamos que podría tratarse de vesículas lipídicas, y en el Capítulo III confirmamos la acumulación de vesículas lipídicas en las células CD-Apo/Nec. En una publicación de Amigorena S. et al. se ha demostrado que las CDs poseen la capacidad de fusionar el RE a las vesículas lipídicas, y que este proceso afectaría positivamente la presentación cruzada de antígenos fagocitados a linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Bougnères et al. 2009). Sin embargo, otros trabajos postulan un rol negativo de las vesículas lipídicas en la funcionalidad de las CDs (Discusión Capítulo III).

A continuación se analizaron las diferentes poblaciones que conforman las CDs utilizadas para la generación de la vacuna CD-Apo/Nec, con el fin de conocer las poblaciones celulares involucradas en la generación de la respuesta antitumoral. Se observó que constaba de una mezcla heterogénea de células, mayoritariamente células CD11c<sup>+</sup> y células F4/80<sup>+</sup>, y un muy bajo porcentaje de células CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>. Las células CD11c<sup>+</sup> poseen altos niveles de F4/80, lo que las dotaría de un fenotipo intermedio entre CD y macrófago. Resulta difícil considerar a las CDs y macrófagos como clases distintas de células, ya que no existen vías de desarrollo o marcadores específicos que las diferencien por completo (Hume 2008). La molécula CD11c corresponde a un receptor endocítico que no es totalmente específico para CDs (Hume 2008). Otros grupos abocados al estudio de los macrófagos han utilizado el cultivo con GM-CSF como una vía alternativa de desarrollo de macrófagos (Fleetwood et al. 2007). Por lo tanto, las CDs pueden considerarse más bien un grupo heterogéneo de fagocitos mononucleares, y en nuestras CDs observamos el solapamiento de marcadores considerados macrofágicos y de CDs. Recientemente, se ha descrito la expresión del receptor Flt3 como un posible marcador de CDs más específico que el CD11c (Miller et al. 2012; Merad et al. 2013).

De las CDs utilizadas para la generación de la vacuna, tanto las células CD11c<sup>+</sup> como las células CD11c<sup>-</sup> poseen una alta capacidad fagocítica *in vitro*, por lo que ambas fracciones serían capaces de incorporar antígenos tumorales. Las células CD11c<sup>+</sup> expresan mayores niveles de I-A<sup>b</sup> y de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 que las células CD11c<sup>-</sup>, por lo que serían, en principio, mejores estimuladoras de linfocitos T. En cuanto a la participación de las diferentes poblaciones en la generación de la respuesta antitumoral, experimentos *in vivo* demostraron que a pesar de que la fracción CD11c<sup>+</sup> es la que posee mayores niveles de I-A<sup>b</sup> y moléculas

coestimuladoras, es necesaria la presencia conjunta de las poblaciones CD11c<sup>+</sup> y CD11c<sup>-</sup> durante el cocultivo con las Apo/Nec para la generación de una eficiente protección antitumoral. En consecuencia, no sería posible mejorar la respuesta antitumoral enriqueciendo a las CDs en células CD11c<sup>+</sup>. No sabemos si la inclusión de las células CD11c<sup>-</sup> induce una señalización durante el cocultivo, necesaria para que las células CD11c<sup>+</sup> que poseen mayor capacidad presentadora lo hagan de manera más eficiente, o si la colaboración se da a nivel del sitio de inyección, generando un ambiente más inflamatorio/estimulador, o reclutando otras poblaciones inmunes del huésped.

Estos hallazgos dieron lugar a otra línea de trabajo, donde se estudió con mayor detalle las subpoblaciones mieloides en las CDs, encontrándose en ellas la expresión del marcador de granulocitos Ly6G (Campisano et al. 2013) . El porcentaje de células Ly6G<sup>+</sup> fue mayor en la fracción CD11c<sup>-</sup>, y estas células presentaron características de neutrófilos.

## CAPÍTULO II: MECANISMO DE INMUNOPROTECCIÓN DE LA VACUNA CD-APO/NEC

Con respecto al mecanismo de acción de la vacuna CD-Apo/Nec, se demostró que la vacuna provee protección sistémica antitumoral. Esto es muy importante para el tratamiento del melanoma estadíos IIC/III, donde es altamente probable la presencia de micrometástasis. Los estudios de imágenes realizados en pacientes con estadíos IIC/III tratados y clínicamente libres de enfermedad no revelan la presencia de metástasis a distancia. Sin embargo, en pacientes con estadio III que poseen tumor primario ulcerado y múltiples ganglios positivos, el porcentaje de supervivencia a 5 años es tan solo del 29% (Gershenwald et al. 2010), indicando que en los mismos deben existir micrometástasis, no detectables por los métodos disponibles actualmente.

Se ha comprobado que aunque el melanoma es inmunogénico, es capaz de evadir la respuesta inmune mediante procesos de inmunoedición (Polak et al. 2009; Ossowski and Aguirre-Ghiso 2010). En este trabajo de Tesis se evidenciaron micrometástasis latentes de pequeño tamaño en algunos de los animales sometidos al desafío tumoral y protegidos por la vacuna. Se observó en éstas un importante infiltrado linfocitario, y no fue posible detectar células tumorales en proliferación. Incluso fue posible observar células macrofágicas cargadas de melanina, por lo que estaría habiendo remoción de células tumorales por parte de células fagocíticas en el sitio de inyección. Por lo tanto, estas células tumorales probablemente se encontraban contenidas por células del sistema inmune. En un modelo de melanoma usando

ratones C57BL/6 transgénicos *MT/Ret* se demostró que los linfocitos T CD8<sup>+</sup> previenen la expansión de células tumorales diseminadas en médula ósea y ganglios linfáticos (Umansky et al. 2008).

Para probar si los linfocitos T CD8<sup>+</sup> o T CD4<sup>+</sup> eran los únicos responsables de mantener la protección tumoral en los animales protegidos (y con posibles micrometástasis latentes), se realizó en estos animales la eliminación transitoria de linfocitos T CD4<sup>+</sup> o T CD8<sup>+</sup>. Estos tratamientos no indujeron un crecimiento detectable de tumores incluso hasta dos meses después de realizada la eliminación. El único tumor observado, luego del tratamiento con anticuerpo anti-CD8, tuvo un tamaño muy pequeño y solo fue detectado al final del experimento al extraer el sitio de desafío tumoral. No fue posible determinar si su tamaño había sido afectado por el tratamiento con los anticuerpos. Lo que sí se pudo determinar es que este tumor no alcanzó una tasa de proliferación alta como para obtener un mayor tamaño y ser detectable por palpación, incluso dos meses después de realizada la eliminación de la población CD8<sup>+</sup>. Por lo tanto, no detectó el crecimiento de tumores luego de la eliminación, y los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup> no serían por sí solos los responsables de la protección a largo plazo observada en los ratones vacunados. Sería de gran interés en el futuro eliminar conjuntamente las poblaciones T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, y NK y observar su efecto en el crecimiento de micrometástasis. Por otro lado, no existe actualmente un modelo adecuado para el estudio de las micrometástasis latentes en melanoma, por lo que el estudio de las micrometástasis en animales protegidos por la vacunación con CD-Apo/Nec podría utilizarse para este fin.

Como parte del mecanismo sistémico de protección, se observó en suero de animales vacunados con 4 dosis de CD-Apo/Nec, un mayor nivel de anticuerpos IgG/IgM anti-B16-F1 que el existente en suero de animales vacunados con Apo/Nec, CDs, o CD+Apo/Nec (sin previo cocultivo), que no desarrollan protección. Por lo tanto, habría una asociación entre los niveles de anticuerpo anti-B16-F1 en suero y la protección antitumoral. Por otro lado, se determinó que una dosis de CD-Apo/Nec no es suficiente para inducir en suero este significativo nivel de anticuerpos anti-B16-F1. Numerosos grupos han demostrado que complejos de antígeno-anticuerpo son internalizados vía receptores Fcγ en la superficie de las CDs siendo presentados por el MHC-II (Amigorena and Bonnerot 1999) o incluso por el MHC-I por presentación cruzada (Machy et al. 2000; Kalergis and Ravetch 2002) generando linfocitos T citotóxicos específicos. La incorporación vía receptores Fcγ de células tumorales opsonizadas por anticuerpos monoclonales promueve un mejor procesamiento y presentación de múltiples antígenos tumorales por las CDs (Dhodapkar et al. 2002; Franki et al. 2008; Manches et al. 2008). Los anticuerpos anti-B16-F1 generados por la vacunación con CD-Apo/Nec podrían actuar

opsonizando células tumorales o restos de células tumorales y facilitando su incorporación y presentación por CDs.

Para lograr una eficiente presentación a los linfocitos T vírgenes específicos, se esperaba que las CDs inyectadas migrasen eficientemente a los ganglios linfáticos. En nuestro sistema experimental fue posible determinar la migración de 0,8% de las células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes ipsilaterales a 24 horas post-inyección s.c. en la zona inguinal (zona de aplicación de la vacuna), porcentaje que aumentó significativamente a 12% a los 5 días post-inyección. Otros trabajos han demostrado que la inyección s.c. de CDs murinas derivadas de médula ósea en la almohadilla plantal induce su migración a los ganglios linfáticos drenantes (Goldszmid et al. 2003), pero que esta acción es cooperativa y depende del número de CDs inyectadas, llegando a un máximo al inyectar  $2 \times 10^6$  células (Lappin et al. 1999). El número de CDs maduras que llegan a los ganglios linfáticos determinaría la magnitud de la proliferación de linfocitos T (Martín-Fontecha et al. 2003).

El 77% de la vacuna permaneció formando un acúmulo en la zona de inyección, detectable por bioluminiscencia hasta por lo menos 5 días post-inyección. Inicialmente se observó la presencia de células Apo/Nec junto con células macrofágicas y leucocitos polimorfonucleares. A los 8 días post-inyección se observaron pocas células tumorales residuales y acúmulos de células linfoides infiltrantes. Esto demostraría que a pesar del acúmulo de células CD-Apo/Nec en el sitio de inyección, habría una gradual remoción de células Apo/Nec por células fagocíticas, tanto presentes en la vacuna como en el huésped.

Por otro lado, trabajos realizados en nuestro laboratorio han demostrado que la vacuna posee una importante proporción de granulocitos neutrófilos (Campisano et al. 2013). Otros grupos han descrito una importante función en la generación de respuestas específicas por parte de los leucocitos polimorfonucleares. Los neutrófilos se han descrito transportando antígenos desde la dermis hasta la médula ósea, donde los neutrófilos apoptóticos son fagocitados por células presentadoras que a su vez activan linfocitos T específicos CD8<sup>+</sup> (Duffy et al. 2012). Resultados recientes de nuestro grupo de trabajo han demostrado que CDs cargadas con OVA (conteniendo una importante proporción de granulocitos neutrófilos) son capaces de migrar a la médula ósea en tan solo 4 horas y de inducir la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos *in vitro* (Campisano 2013). Este mecanismo de migración a médula ósea y presentación a linfocitos T induciría una vía rápida de respuesta antitumoral. Sería importante estudiar en el futuro este mecanismo con mayor detalle y determinar su implicancia en la generación de la respuesta antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec.

En este trabajo de Tesis se describió la novedosa formación de una estructura pseudolinfoide en el sitio de vacunación con el esquema completo de CD-Apo/Nec (Mac Keon et al. 2010). Se evidenció contenido dentro de esta estructura definida y organizada, con fibras reticulares y una pseudocápsula cruzada por múltiples trabéculas, un importante infiltrado inflamatorio, constituido mayormente por linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y células macrofágicas. Se observó el reclutamiento de linfocitos T  $CD4^+$  y T  $CD8^+$ , que se encontraron en estrecho contacto con CDs.

El tejido linfoide terciario comparte características morfológicas con los órganos linfoides secundarios, como la presencia de HEV, la acumulación de linfocitos T, linfocitos B, células  $CD11c^+$  y redes de CDs foliculares (Nasr et al. 2007). En el interior de la estructura formada por la vacunación con Apo/Nec se detectaron vénulas con expresión de PNA<sub>d</sub>, molécula expresada por las HEV involucrada en el homing de linfocitos T y B a los ganglios linfáticos (Girard and Springer 1995), evidenciando la presencia de tejido linfoide terciario y la formación de una estructura linfoide terciaria. Esta estructura organizada no se evidenció con otras vacunas a base de CDs y Apo/Nec que no desarrollan protección antitumoral. Por lo tanto, esta estructura linfoide terciaria podría estar involucrada en el mecanismo de protección antitumoral.

Existen evidencias del rol crítico de las CDs en la formación de tejido linfoide terciario. La administración intra-tumoral de CDs modificadas genéticamente para expresar la quimioquina CCL21, quimioattractante de CDs y linfocitos T vírgenes, generó la activación de linfocitos T vírgenes y marcados efectos antitumorales independientemente de ganglios linfáticos (Kirk et al. 2001). Un estudio clínico analizando biopsias de pacientes de melanoma inoculados intradérmicamente con CDs maduras demostró que éstas inducen cambios en el microambiente que inducen el reclutamiento de linfocitos T vírgenes y linfocitos T de memoria central (Schrama et al. 2002). Existen también evidencias de la importancia de las CDs en el mantenimiento de tejido linfoide terciario. En los pulmones de ratones infectados con el virus influenza se observó que las CDs eran necesarias para el mantenimiento de tejido linfoide inducible asociado a bronquios (iBALT) (GeurtsvanKessel et al. 2009), en el cual la depleción de las CDs luego de la eliminación del virus generaba la desaparición del tejido linfoide terciario. En nuestro sistema sería la inyección de 4 dosis de células CD-Apo/Nec la que induciría la formación del tejido linfoide terciario.

En cuanto a la implicancia de la formación de una estructura linfoide terciaria en cáncer, se reportó la formación de iBALT en pacientes con cáncer de pulmón de células

pequeñas, y la densidad de CDs maduras en estas estructuras se veía correlacionada con una sobrevida prolongada (Dieu-Nosjean et al. 2008). En otro trabajo, el direccionamiento de linfotóxina- $\alpha$  a un sitio tumoral de B16-F1 generó un tejido linfoide terciario local con inducción de una respuesta local específica T que llevó al rechazo tumoral (Schrama et al. 2008). Nosotros encontramos la formación de la estructura linfoide terciaria asociada a la protección tumoral, ya que no se formó con otras vacunas a base de CD y Apo/Nec que no inducen protección.

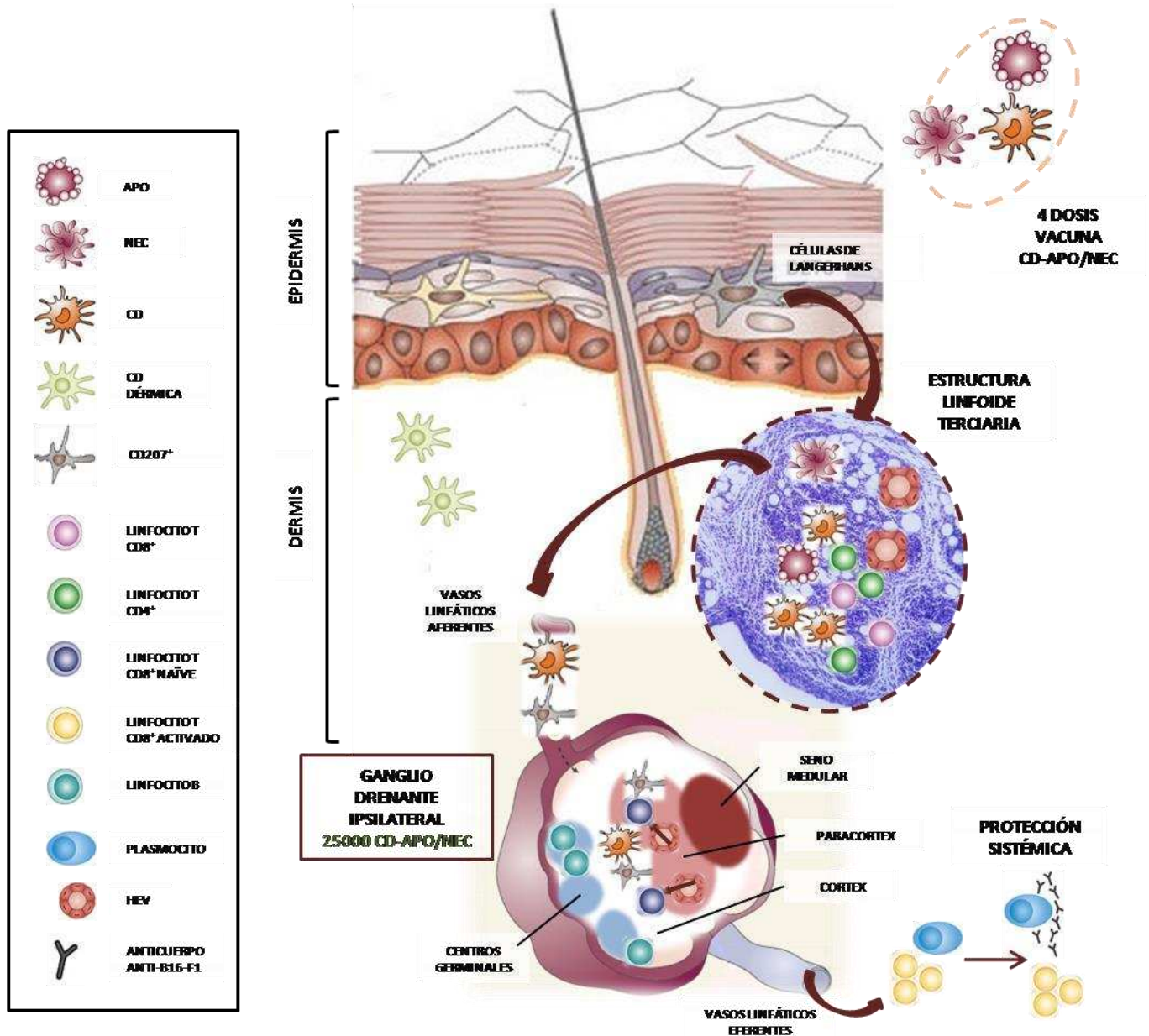
Para la formación de la estructura linfoide terciaria fue necesario el cocultivo *ex vivo* durante 24 horas de CDs con células Apo/Nec, ya que al vacunar con CDs más Apo/Nec (sin previo cocultivo) no se observó dicha estructura. La ventaja del cocultivo *ex vivo* sería tal vez el de hacer más eficiente el proceso de incorporación de Apo/Nec por las CDs, induciendo la secreción de mensajeros que induzcan la neoformación de tejido linfoide. Queda pendiente determinar cómo se induce la formación de tejido linfoide terciario, para lo que sería interesante determinar si las CD-Apo/Nec secretan otras citoquinas involucradas en la formación de tejido linfoide, como CCL19, CCL21, CXCL12, CXCL13 y linfotóxina- $\alpha$ .

Se ha planteado que el tejido linfoide terciario podría actuar facilitando el acceso de los antígenos tumorales a los linfocitos T vírgenes, favoreciendo de esta manera la respuesta inmune antitumoral (Irvine et al. 2008). Contrariamente a lo esperado, al realizar una transferencia adoptiva de linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes OVA-específicos junto con la cuarta dosis de vacuna CD-Apo/Nec OVA, no pudo ser detectado el reclutamiento de estos linfocitos al sitio de inyección. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes OVA-específicos fueron reclutados a los ganglios linfáticos drenantes, donde fue posible observar su proliferación. Por lo tanto estos experimentos indicarían que células presentadoras de antígenos en el ganglio linfático drenante estarían activando linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes por presentación cruzada de antígenos tumorales. Esta información puede ser complementada por trabajos realizados en el laboratorio que muestran el rápido reclutamiento de células CD207<sup>+</sup> (células de Langerhans o células dérmicas) al sitio de vacunación 24 horas post-inyección, células que son luego detectadas a 6 y 10 días de la cuarta dosis de vacuna en el ganglio drenante (Ruiz et al. 2014). Estas células expresaban altos niveles de MHC-II y se localizaron en la zona T del ganglio linfático, sugiriendo su potencialidad como células presentadoras. Por lo tanto, la escasa migración de las CD-Apo/Nec podría ser complementada por el ambiente inflamatorio en el sitio de vacunación, que reclutaría células presentadoras de antígeno del huésped capaces de realizar la presentación cruzada de antígenos tumorales en los ganglios drenantes.

La acumulación de células linfoides en estructuras linfoides terciarias puede ocurrir en sitios de inflamación crónica (Aloisi and Pujol-Borrell 2006). En este trabajo de Tesis, la repetida administración de células CD-Apo/Nec indujo la formación de una estructura linfoide terciaria en la dermis. Los sitios de inflamación crónica pueden presentar efectos negativos, como agotamiento de los linfocitos específicos, y llevar a la generación de una respuesta tolerogénica. Sin embargo, esto no ocurre con la vacunación con CD-Apo/Nec. Se comprobó que luego de 4 dosis de vacuna no se induce la diferenciación a linfocitos T regulatorios en los ganglios drenantes. Por lo tanto la presencia de la estructura pseudolinfoide no estaría generando una respuesta tolerogénica.

Tomando en consideración los resultados obtenidos en este capítulo, se esquematiza a continuación el mecanismo de acción de la vacuna CD-Apo/Nec (**Fig. 36**).





**Fig. 36: Respuesta inmune a la vacunación con CD-Apo/Nec.** Luego de 4 dosis de vacuna se induce la formación de una estructura linfoide terciaria en el sitio de vacunación, caracterizada por la presencia de vénulas con expresión de PNA<sub>d</sub> (característica de las HEV). En esta estructura se encuentran linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en estrecho contacto con CDs. A este tiempo, el 12% (25000) de las células CD-Apo/Nec han migrado al ganglio linfático inguinal ipsilateral, y el 11 % al ganglio linfático inguinal contralateral, mientras que el resto de las células CD-Apo/Nec permanecen acumuladas en el sitio de inyección. Por otro lado, se observa la migración de células CD207<sup>+</sup> que a este tiempo se encontraron en la zona T y en el seno medular del ganglio drenante (Ruiz et al. 2014). No se indujo la diferenciación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en los ganglios drenantes. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes B16-F1-específicos fueron reclutados al ganglio drenante luego de la última dosis de vacuna, donde fueron capaces de activarse y proliferar. Se determinó la producción anticuerpos IgM/IgG anti-B16-F1. La respuesta generada por la vacunación fue sistémica.

## CAPÍTULO III: BÚSQUEDA DE CONDICIONES QUE POTENCIEN LA CAPACIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LA VACUNA CD-APO/NEC

Trabajos anteriores demostraron que las CD<sub>s</sub> sobreexpresan I-A<sup>b</sup> y CD86 luego del cocultivo con las células Apo/Nec (Goldszmid et al. 2003). El esquema de vacunación con CD-Apo/Nec genera protección frente a un desafío tumoral con células B16-F1 viables en aproximadamente 65% de los animales vacunados. Se ensayaron diferentes estrategias de maduración *in vitro* de CD<sub>s</sub> que pudiesen dar como resultado una vacuna CD-Apo/Nec con mayor capacidad inmunoestimuladora. Se eligieron estrategias en las que se utilizaron simultáneamente varios agentes madurativos, con el fin de obtener respuestas más potentes.

En primer término se utilizó un cóctel de citoquinas inflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-1- $\beta$ , IL-6 y PGE<sub>2</sub>) (Jonuleit et al. 1997), que no demostró aumentar la capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de las células CD-Apo/Nec, a diferencia de lo que se observa con CD<sub>s</sub> humanas obtenidas a partir de PBMC (Pizzurro et al. 2013). A continuación se evaluaron en las CD<sub>s</sub> diferentes combinaciones de los agonistas de TLR Imiquimod y Poly:IC, junto con PGE<sub>2</sub>. Las CD<sub>s</sub> fueron capaces de responder a estos agentes, aumentando sus niveles de expresión de I-A<sup>b</sup> y moléculas coestimuladoras. Sin embargo, la combinación que generaba las CD<sub>s</sub> más maduras (Poly I:C 30 ug/ml, Imiquimod 10 ug/ml y PGE<sub>2</sub> 10 ug/ml) no fue capaz de generar un aumento significativo en la capacidad inmunoestimuladora *in vitro* de las células CD-Apo/Nec. Se dedujo entonces que las células Apo/Nec durante el cocultivo inducen una pérdida en la capacidad funcional de las CD<sub>s</sub>, que no permite su correcta maduración frente a un estímulo madurativo.

Hemos demostrado en otros estudios que durante el cocultivo de las CD<sub>s</sub> con las Apo/Nec no hay secreción de niveles detectables de IL-12 ó IL-10 (Campisano et al. 2013). Sin embargo, al estimular a CD<sub>s</sub> o CD-Apo/Nec durante el cocultivo con IFN- $\gamma$  (1000 U/ml) y LPS (1ug/ml) se observó la secreción de IL-12 (1430 $\pm$ 73 pg/ml) en las CD<sub>s</sub> y en las CD-Apo/Nec (621 $\pm$ 17 pg/ml), que disminuyó a niveles indetectables a las 24 horas de cocultivo. En las CD-Apo/Nec también se observó con este tratamiento a las 6 horas de cocultivo la secreción de bajos niveles de IL-10 (39 $\pm$ 12 pg/ml) (Campisano et al. 2013). Estos estudios están en concordancia con los resultados obtenidos en este trabajo, que muestran que el cocultivo de las CD<sub>s</sub> con las Apo/Nec disminuye su capacidad de ser activadas por medio de estímulos madurativos.

Considerando que en trabajos anteriores del laboratorio se había descrito que las CD<sub>s</sub> utilizadas para constituir la vacuna CD-Apo/Nec expresaban I-A<sup>b</sup> y CD86 (Goldszmid et al. 2003), y una alta maduración inicial podría estar comprometiendo la posterior maduración, se

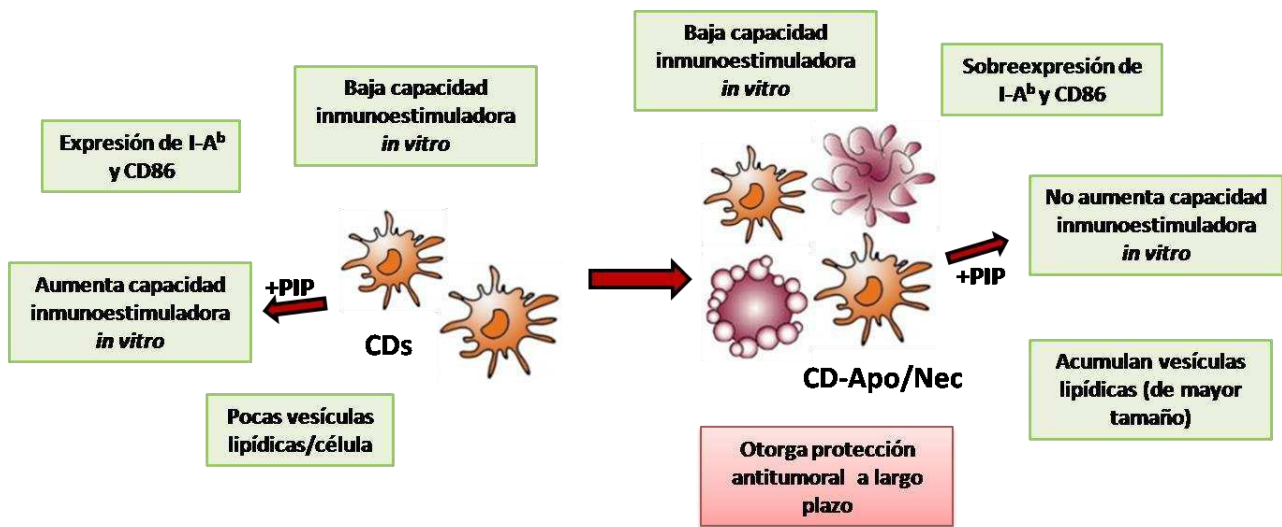
ensayó entonces sembrar densidades iniciales menores de precursores de médula ósea durante la diferenciación *in vitro* de CDs. Sin embargo, se observó que la densidad de precursores iniciales utilizada a lo largo de esta Tesis era la más favorable. Plaquear  $3 \times 10^6$  precursores por placa al comienzo del proceso de diferenciación generó CDs capaces de responder eficientemente ante un estímulo con LPS incrementando 40% y 100% los niveles de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 respectivamente, e incrementando 58% el nivel de positividad para moléculas del MHC-II. Estos datos confirman que las CDs poseen la capacidad de madurar eficientemente ante un estímulo madurativo, y que sería el cocultivo con las células Apo/Nec las que estarían afectando esta capacidad.

Se había descrito en el Capítulo I una progresiva acumulación de vesículas de baja densidad en las CDs durante el cocultivo con las Apo/Nec, que a las 24 horas ocupaban casi completamente el citoplasma. Esto llevó a pensar que podía haber acumulación de lípidos en estas CDs, que fue corroborado por tinción con una sonda para lípidos neutros. Se observó en estas CDs un aumento significativo en el número promedio de vesículas por célula, debido al cocultivo con las Apo/Nec y no al proceso de maduración. Se registró a su vez un aumento significativo en el número de vesículas grandes, de entre 1 y 1,5  $\mu\text{m}$ . Otros trabajos han descrito que la acumulación de lípidos neutros en CDs se asocia a una ineficiente presentación de antígenos asociados a tumor y estimulación de linfocitos T (Herber et al. 2010). También se ha demostrado que la oxidación de lípidos neutros bloquea la presentación cruzada de antígenos al reducir la expresión de moléculas del MHC-I en la superficie celular (Cao et al. 2014). Sin embargo, todavía no hay un consenso claro sobre si un alto contenido de lípidos neutros es un marcador de disfunción en las CDs. De hecho, en un estudio que examina la inmunogenicidad de CDs de hígado, fueron las CDs con mayor contenido de lípidos las más inmunogénicas (Ibrahim et al. 2012). En una publicación de Amigorena S. et al. se ha demostrado que las CDs poseen la capacidad de fusionar el RE a vesículas lipídicas, y que este proceso afecta positivamente la presentación cruzada de antígenos fagocitados a linfocitos T  $\text{CD8}^+$  (Bougnères et al. 2009). En este trabajo de Tesis se ha determinado que durante el cocultivo de las CDs con Apo/Nec ocurre una gran acumulación de vesículas lipídicas. Y estas CDs muestran una disfunción funcional. No está claro cómo es que se acumulan estos lípidos. Se ha observado que la exposición de CDs a medios condicionados de tumores generaba la sobreexpresión de receptores scavenger, capaces de interactuar con lipoproteínas y mediar su incorporación (Herber et al. 2010). Sería de gran relevancia determinar el mecanismo de acumulación de los lípidos, y si su acumulación puede bloquearse inhibiendo enzimas involucradas en la síntesis de triglicéridos, como la Acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa o la

Acetil-CoA carboxilasa, aumentando la capacidad inmunoestimuladora de las CD-Apo/Nec. Si se pudiera incrementar mediante alguna de estas estrategias la capacidad inmunoestimuladora de las CDs cocultivadas con células Apo/Nec, se podría generar una vacuna CD-Apo/Nec más efectiva.

Finalmente, se analizó si al precondicionar al huésped era posible incrementar el nivel de protección antitumoral obtenido con la vacuna CD-Apo/Nec, utilizando imiquimod tópico para estimular la inflamación local o ciclofosfamida en dosis bajas para estimular la diferenciación y proliferación de las CDs del huésped. Estos tratamientos no lograron mejorar significativamente la protección antitumoral lograda por la vacunación con CD-Apo/Nec. Sin embargo, con la aplicación tópica de Imiquimod se alcanzó un 22% más de protección antitumoral que con la vacuna CD-Apo/Nec tradicional, aunque este incremento no llegó a ser significativo. Frente a esta tendencia, esperamos que una aplicación más prolongada, por ejemplo de 5 dosis de imiquimod tópico, ayude a mejorar la protección alcanzada. En la clínica, se aplica imiquimod 5% tópico durante 5 días consecutivos para tratar el carcinoma de células basales, causando una inflamación pronunciada en el sitio de aplicación y regresión tumoral en un gran porcentaje de los casos (Geisse et al. 2004; De Giorgi et al. 2009). Por otro lado, es posible que el mecanismo de acumulación lipídica y disminución de la funcionalidad de las células dendríticas esté ocurriendo también con las células presentadoras del huésped cuando entran en contacto en la dermis con las células Apo/Nec presentes en la vacuna, y que aunque se aumente su reclutamiento al sitio de inyección mediante la aplicación de imiquimod, la mejora en la respuesta antitumoral no se pueda alcanzar.

A continuación se esquematizan algunos de los resultados obtenidos en este capítulo **(Fig. 37)**.



**Fig. 37: Comparación de CDs y CD-Apo/Nec.** Las CDs expresan I-Ab y CD86 en su superficie, poseen capacidad inmunoestimuladora *in vitro* (MLR), poseen pocas vesículas lipídicas y el agregado de PIP aumenta su capacidad inmunoestimuladora *in vitro* (MLR). Las CD-Apo/Nec sobreexpresan I-Ab y CD86 en su superficie (Goldszmid et al. 2003), poseen capacidad inmunoestimuladora *in vitro* (MLR), acumulan vesículas lipídicas, siendo éstas de mayor tamaño, y el agregado de PIP no aumenta su capacidad inmunoestimuladora *in vitro* (MLR). Sin embargo, las CD-Apo/Nec otorgan protección antitumoral a largo plazo en aproximadamente el 65% de los animales vacunados.

**CONCLUSIÓN**

En este trabajo de Tesis se determinó el mecanismo mediante el cual la vacunación de ratones C57BL/6 con CDs cargadas de células apoptóticas y necróticas del melanoma murino singeneico B16-F1 ejerce protección anti-melanoma sistémica y a largo plazo, evitando el desarrollo s.c. de melanoma B16-F1 y controlando micrometástasis latentes.

Luego de 4 dosis de vacuna CD-Apo/Nec se induce la formación de una estructura linfoide terciaria en el sitio de vacunación, caracterizada por la presencia de vénulas con expresión de PNA<sub>d</sub>, adhesina involucrada en el homing de linfocitos T vírgenes a los ganglios linfáticos. En esta estructura se encuentran linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> en estrecho contacto con CDs. A este tiempo, el 12% de las células CD-Apo/Nec han migrado al ganglio linfático inguinal ipsilateral, y el 11 % al ganglio linfático inguinal contralateral, mientras que el resto de las células CD-Apo/Nec permanecen acumuladas en el sitio de inyección. Los sitios de inflamación crónica se han visto relacionados con la inducción de un perfil tolerogénico, pero la vacunación con CD-Apo/Nec no indujo la acumulación de linfocitos Treg en los ganglios drenantes. La respuesta observada luego de 4 dosis fue T-estimuladora, ya que linfocitos T CD8<sup>+</sup> vírgenes B16-F1-específicos fueron reclutados al ganglio drenante luego de la última dosis de vacuna, donde fueron capaces de activarse y proliferar. Se determinó al finalizar el esquema de vacunación la producción anticuerpos IgM/IgG anti-B16-F1, que podrían actuar opsonizando células B16-F1.

La vacuna provee protección anti-melanoma en aproximadamente el 65% de los animales vacunados. Con el objetivo de aumentar el porcentaje de animales protegidos se exploraron diferentes estrategias de maduración, no encontrándose condiciones que incrementasen significativamente la capacidad inmunoestimuladora de las células CD-Apo/Nec *in vitro*. Durante cocultivo con las células Apo/Nec las CDs acumulan vesículas lipídicas, y esto se encuentra asociado a la pérdida de capacidad T-estimuladora *in vitro* de estas células. Hacer blanco en la regulación de la acumulación lipídica de las CDs se presenta como una de las estrategias relevantes para incrementar la eficiencia antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec.

## REFERENCIAS

- Albert, M. L., J. C. Darnell, A. Bender, L. M. Francisco, N. Bhardwaj and R. B. Darnell (1998). "Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration." Nat Med **4**(11): 1321-1324.
- Algazi, A. P., C. W. Soon and A. I. Daud (2010). "Treatment of cutaneous melanoma: current approaches and future prospects." Cancer Manag Res **2**: 197-211.
- Aloisi, F. and R. Pujol-Borrell (2006). "Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases." Nat Rev Immunol **6**(3): 205-217.
- Amigorena, S. and C. Bonnerot (1999). "Fc receptors for IgG and antigen presentation on MHC class I and class II molecules." Semin Immunol **11**(6): 385-390.
- and, C. f. t. U. o. t. G. f. t. C. and U. o. L. A. N. R. Council (2010). Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. T. N. A. Press.
- Aris, M. B., M. M.; Mordoh, J. (2010). "Cutaneous Melanoma: A Test Field for Immunotherapy and a Medical Challenge." Current Cancer Therapy Reviews **6**: 229-242.
- Ascierto, P. A. (2013). "Ipilimumab in the treatment of metastatic melanoma: a summary of recent studies." Tumori **99**(6): 302e-305e.
- Atkins, M. B., J. Hsu, S. Lee, G. I. Cohen, L. E. Flaherty, J. A. Sosman, V. K. Sondak and J. M. Kirkwood (2008). "Phase III trial comparing concurrent biochemotherapy with cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interleukin-2, and interferon alfa-2b with cisplatin, vinblastine, and dacarbazine alone in patients with metastatic malignant melanoma (E3695): a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group." J Clin Oncol **26**(35): 5748-5754.
- Balch, C. M., J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, A. C. Buzaid, A. J. Cochran, D. G. Coit, S. Ding, A. M. Eggermont, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. C. Mihm, Jr., D. L. Morton, M. I. Ross, A. J. Sober and V. K. Sondak (2009). "Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification." J Clin Oncol **27**(36): 6199-6206.
- Banchereau, J., E. Klechevsky, N. Schmitt, R. Morita, K. Palucka and H. Ueno (2009). "Harnessing human dendritic cell subsets to design novel vaccines." Ann N Y Acad Sci **1174**: 24-32.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.
- Barrio, M. M., P. T. de Motta, J. Kaplan, E. M. von Euw, A. I. Bravo, R. D. Chacon and J. Mordoh (2006). "A phase I study of an allogeneic cell vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in melanoma patients." J Immunother **29**(4): 444-454.
- Bauer, J., J. A. Curtin, D. Pinkel and B. C. Bastian (2007). "Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations." J Invest Dermatol **127**(1): 179-182.
- Becker, J. C., R. Houben, D. Schrama, H. Voigt, S. Ugurel and R. A. Reisfeld (2010). "Mouse models for melanoma: a personal perspective." Exp Dermatol **19**(2): 157-164.
- Berd, D. and M. J. Mastrangelo (1988). "Active immunotherapy of human melanoma exploiting the immunopotentiating effects of cyclophosphamide." Cancer Invest **6**(3): 337-349.
- Berd, D. and M. J. Mastrangelo (1988). "Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: depletion of CD4+, 2H4+ suppressor-inducer T-cells." Cancer Res **48**(6): 1671-1675.
- Berguer, P. M., V. A. Alzogaray, A. H. Rossi, J. Mundinano, I. Piazzon and F. A. Goldbaum (2012). "A polymeric protein induces specific cytotoxicity in a TLR4 dependent manner in the absence of adjuvants." PLoS One **7**(9): e45705.

- Bevona, C., W. Goggins, T. Quinn, J. Fullerton and H. Tsao (2003). "Cutaneous melanomas associated with nevi." *Arch Dermatol* **139**(12): 1620-1624; discussion 1624.
- Bhowmick, N. A., E. G. Neilson and H. L. Moses (2004). "Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression." *Nature* **432**(7015): 332-337.
- Bohnenkamp, H. R., K. T. Papazisis, J. M. Burchell and J. Taylor-Papadimitriou (2007). "Synergism of Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by monocyte-derived dendritic cells is mediated through p38 MAPK and lowers the threshold of T-helper cell type 1 responses." *Cell Immunol* **247**(2): 72-84.
- Bougneres, L., J. Helft, S. Tiwari, P. Vargas, B. H. Chang, L. Chan, L. Campisi, G. Lauvau, S. Hugues, P. Kumar, A. O. Kamphorst, A. M. Dumenil, M. Nussenzweig, J. D. MacMicking, S. Amigorena and P. Guermonprez (2009). "A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells." *Immunity* **31**(2): 232-244.
- Bozza, P. T. and J. P. Viola (2010). "Lipid droplets in inflammation and cancer." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **82**(4-6): 243-250.
- Brichard, V., A. Van Pel, T. Wolfel, C. Wolfel, E. De Plaen, B. Lethé, P. Coulie and T. Boon (1993). "The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J Exp Med* **178**(2): 489-495.
- Brunner, M. C., C. A. Chambers, F. K. Chan, J. Hanke, A. Winoto and J. P. Allison (1999). "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation." *J Immunol* **162**(10): 5813-5820.
- Brusa, D., S. Garetto, G. Chiorino, M. Scatolini, E. Migliore, G. Camussi and L. Matera (2008). "Post-apoptotic tumors are more palatable to dendritic cells and enhance their antigen cross-presentation activity." *Vaccine* **26**(50): 6422-6432.
- Campisano, S., S. Mac Keon, S. Gazzaniga, M. S. Ruiz, M. D. Traian, J. Mordoh and R. Wainstok (2013). "Anti-melanoma vaccinal capacity of CD11c-positive and -negative cell populations present in GM-CSF cultures derived from murine bone marrow precursors." *Vaccine* **31**(2): 354-361.
- Campisano, S. M. K., S.; Berguer, P.; Mordoh, J.; Wainstok, R. (2013). Migración de células dendríticas murinas hacia médula ósea en un modelo experimental de vacuna anti-melanoma. *Medicina (B Aires)*. Mar del Plata, Buenos Aires, Fundación Revista Medicina. **73**: 194-195.
- Cao, W., R. Ramakrishnan, V. A. Tuyrin, F. Veglia, T. Condamine, A. Amoscato, D. Mohammadyani, J. J. Johnson, L. Min Zhang, J. Klein-Seetharaman, E. Celis, V. E. Kagan and D. I. Gabrilovich (2014). "Oxidized lipids block antigen cross-presentation by dendritic cells in cancer." *J Immunol* **192**(6): 2920-2931.
- Carragher, D. M., J. Rangel-Moreno and T. D. Randall (2008). "Ectopic lymphoid tissues and local immunity." *Semin Immunol* **20**(1): 26-42.
- Casares, N., M. O. Pequignot, A. Tesniere, F. Ghiringhelli, S. Roux, N. Chaput, E. Schmitt, A. Hamai, S. Hervas-Stubbs, M. Obeid, F. Coutant, D. Metivier, E. Pichard, P. Aucouturier, G. Pierron, C. Garrido, L. Zitvogel and G. Kroemer (2005). "Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death." *J Exp Med* **202**(12): 1691-1701.
- Cohen, N. R., S. Garg and M. B. Brenner (2009). "Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity." *Adv Immunol* **102**: 1-94.
- Coulie, P. G., V. Brichard, A. Van Pel, T. Wolfel, J. Schneider, C. Traversari, S. Mattei, E. De Plaen, C. Lurquin, J. P. Szikora, J. C. Renauld and T. Boon (1994). "A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas." *J Exp Med* **180**(1): 35-42.
- Chapman, P. B., A. Hauschild, C. Robert, J. B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S. J. O'Day, J. A. Sosman, J. M. Kirkwood, A. M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J.



- Li, B. Nelson, J. Hou, R. J. Lee, K. T. Flaherty and G. A. McArthur (2011). "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." N Engl J Med **364**(26): 2507-2516.
- Chen, Y. T., M. J. Scanlan, U. Sahin, O. Tureci, A. O. Gure, S. Tsang, B. Williamson, E. Stockert, M. Pfreundschuh and L. J. Old (1997). "A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1914-1918.
- Chudnovsky, Y., P. A. Khavari and A. E. Adams (2005). "Melanoma genetics and the development of rational therapeutics." J Clin Invest **115**(4): 813-824.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton and P. A. Futreal (2002). "Mutations of the BRAF gene in human cancer." Nature **417**(6892): 949-954.
- De Giorgi, V., C. Salvini, A. Chiarugi, M. Paglierani, V. Maio, P. Nicoletti, M. Santucci, P. Carli and D. Massi (2009). "In vivo characterization of the inflammatory infiltrate and apoptotic status in imiquimod-treated basal cell carcinoma." Int J Dermatol **48**(3): 312-321.
- Dhodapkar, K. M., J. Krasovsky, B. Williamson and M. V. Dhodapkar (2002). "Antitumor monoclonal antibodies enhance cross-presentation of cellular antigens and the generation of myeloma-specific killer T cells by dendritic cells." J Exp Med **195**(1): 125-133.
- Diamond, M. S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G. P. Dunn, J. M. Archambault, H. Lee, C. D. Arthur, J. M. White, U. Kalinke, K. M. Murphy and R. D. Schreiber (2011). "Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors." J Exp Med **208**(10): 1989-2003.
- Dieu-Nosjean, M. C., M. Antoine, C. Danel, D. Heudes, M. Wislez, V. Poulot, N. Rabbe, L. Laurans, E. Tartour, L. de Chaisemartin, S. Lebecque, W. H. Fridman and J. Cadranel (2008). "Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures." J Clin Oncol **26**(27): 4410-4417.
- Dranoff, G. (2011). Cancer immunology and immunotherapy. Berlin Heidelberg, Springer-Berlag.
- Drutman, S. B. and E. S. Trombetta (2010). "Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo." J Immunol **185**(4): 2140-2146.
- Duffy, D., H. Perrin, V. Abadie, N. Benhabiles, A. Boissonnas, C. Liard, B. Descours, D. Reboulleau, O. Bonduelle, B. Verrier, N. Van Rooijen, C. Combadiere and B. Combadiere (2012). "Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8+ T cells." Immunity **37**(5): 917-929.
- Festjens, N., T. Vanden Berghe and P. Vandenabeele (2006). "Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: signalling cascades, important mediators and concomitant immune response." Biochim Biophys Acta **1757**(9-10): 1371-1387.
- Fidler, I. J. and G. L. Nicolson (1976). "Organ selectivity for implantation survival and growth of B16 melanoma variant tumor lines." J Natl Cancer Inst **57**(5): 1199-1202.
- Finn, O. J. (2008). "Cancer immunology." N Engl J Med **358**(25): 2704-2715.
- Fleetwood, A. J., T. Lawrence, J. A. Hamilton and A. D. Cook (2007). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation." J Immunol **178**(8): 5245-5252.

- Foley, E. J. (1953). "Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin." *Cancer Res* **13**(12): 835-837.
- Frankenberger, B. and D. J. Schendel (2012). "Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy." *Eur J Cell Biol* **91**(1): 53-58.
- Franki, S. N., K. K. Steward, D. J. Betting, K. Kafi, R. E. Yamada and J. M. Timmerman (2008). "Dendritic cells loaded with apoptotic antibody-coated tumor cells provide protective immunity against B-cell lymphoma in vivo." *Blood* **111**(3): 1504-1511.
- Freeman, G. J., E. J. Wherry, R. Ahmed and A. H. Sharpe (2006). "Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade." *J Exp Med* **203**(10): 2223-2227.
- Galluzzi, L., I. Vitale, J. M. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, T. M. Dawson, V. L. Dawson, W. S. El-Deiry, S. Fulda, E. Gottlieb, D. R. Green, M. O. Hengartner, O. Kepp, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, X. Lu, F. Madeo, W. Malorni, P. Mehlen, G. Nunez, M. E. Peter, M. Piacentini, D. C. Rubinsztein, Y. Shi, H. U. Simon, P. Vandenabeele, E. White, J. Yuan, B. Zhivotovsky, G. Melino and G. Kroemer (2012). "Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death Differ* **19**(1): 107-120.
- Geisse, J., I. Caro, J. Lindholm, L. Golitz, P. Stampone and M. Owens (2004). "Imiquimod 5% cream for the treatment of superficial basal cell carcinoma: results from two phase III, randomized, vehicle-controlled studies." *J Am Acad Dermatol* **50**(5): 722-733.
- Gershenwald, J. E., S. J. Soong and C. M. Balch (2010). "2010 TNM staging system for cutaneous melanoma...and beyond." *Ann Surg Oncol* **17**(6): 1475-1477.
- GeurtsvanKessel, C. H., M. A. Willart, I. M. Bergen, L. S. van Rijt, F. Muskens, D. Elewaut, A. D. Osterhaus, R. Hendriks, G. F. Rimmelzwaan and B. N. Lambrecht (2009). "Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice." *J Exp Med* **206**(11): 2339-2349.
- Ghiringhelli, F., N. Larmonier, E. Schmitt, A. Parcellier, D. Cathelin, C. Garrido, B. Chauffert, E. Solary, B. Bonnotte and F. Martin (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): 336-344.
- Girard, J. P. and T. A. Springer (1995). "High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration." *Immunol Today* **16**(9): 449-457.
- Godet, Y., A. Moreau-Aubry, Y. Guilloux, V. Vignard, A. Khammari, B. Dreno, F. Jotereau and N. Labarriere (2008). "MELOE-1 is a new antigen overexpressed in melanomas and involved in adoptive T cell transfer efficiency." *J Exp Med* **205**(11): 2673-2682.
- Goldszmid, R. S., J. Idoyaga, A. I. Bravo, R. Steinman, J. Mordoh and R. Wainstok (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): 5940-5947.
- Golstein, P. and G. Kroemer (2007). "Cell death by necrosis: towards a molecular definition." *Trends Biochem Sci* **32**(1): 37-43.
- Green, D. R., T. Ferguson, L. Zitvogel and G. Kroemer (2009). "Immunogenic and tolerogenic cell death." *Nat Rev Immunol* **9**(5): 353-363.
- Guerra, L., J. Mordoh, I. Slavutsky, I. Larripa and E. E. Medrano (1989). "Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line." *Pigment Cell Res* **2**(6): 504-509.
- Hamid, O., C. Robert, A. Daud, F. S. Hodi, W. J. Hwu, R. Kefford, J. D. Wolchok, P. Hersey, R. W. Joseph, J. S. Weber, R. Dronca, T. C. Gangadhar, A. Patnaik, H. Zarour, A. M. Joshua, K. Gergich, J. Elassaiss-Schaap, A. Algazi, C. Mateus, P. Boasberg, P. C. Tumeah, B. Chmielowski, S. W. Ebbinghaus, X. N. Li, S. P. Kang and A. Ribas (2013). "Safety and Tumor Responses with LAMBROLIZUMAB (Anti-PD-1) in Melanoma." *N Engl J Med*.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

- Hashimoto, D., J. Miller and M. Merad (2011). "Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo." *Immunity* **35**(3): 323-335.
- Herber, D. L., W. Cao, Y. Nefedova, S. V. Novitskiy, S. Nagaraj, V. A. Tyurin, A. Corzo, H. I. Cho, E. Celis, B. Lennox, S. C. Knight, T. Padhya, T. V. McCaffrey, J. C. McCaffrey, S. Antonia, M. Fishman, R. L. Ferris, V. E. Kagan and D. I. Gabrilovich (2010). "Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer." *Nat Med* **16**(8): 880-886.
- Hume, D. A. (2008). "Macrophages as APC and the dendritic cell myth." *J Immunol* **181**(9): 5829-5835.
- Ibe, S., Z. Qin, T. Schuler, S. Preiss and T. Blankenstein (2001). "Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions." *J Exp Med* **194**(11): 1549-1559.
- Ibrahim, J., A. H. Nguyen, A. Rehman, A. Ochi, M. Jamal, C. S. Graffeo, J. R. Henning, C. P. Zambirinis, N. C. Fallon, R. Barilla, S. Badar, A. Mitchell, R. S. Rao, D. Acehan, A. B. Frey and G. Miller (2012). "Dendritic cell populations with different concentrations of lipid regulate tolerance and immunity in mouse and human liver." *Gastroenterology* **143**(4): 1061-1072.
- Ichii-Nakato, N., M. Takata, S. Takayanagi, S. Takashima, J. Lin, H. Murata, A. Fujimoto, N. Hatta and T. Saida (2006). "High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi." *J Invest Dermatol* **126**(9): 2111-2118.
- Irvine, D. J., A. N. Stachowiak and Y. Hori (2008). "Lymphoid tissue engineering: invoking lymphoid tissue neogenesis in immunotherapy and models of immunity." *Semin Immunol* **20**(2): 137-146.
- Jakob, J. A., R. L. Bassett, Jr., C. S. Ng, J. L. Curry, R. W. Joseph, G. C. Alvarado, M. L. Rohlfs, J. Richard, J. E. Gershenwald, K. B. Kim, A. J. Lazar, P. Hwu and M. A. Davies (2012). "NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma." *Cancer* **118**(16): 4014-4023.
- Joffre, O. P., E. Segura, A. Savina and S. Amigorena (2012). "Cross-presentation by dendritic cells." *Nat Rev Immunol* **12**(8): 557-569.
- Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions." *Eur J Immunol* **27**(12): 3135-3142.
- Jusforgues-Saklani, H., M. Uhl, N. Blachere, F. Lemaitre, O. Lantz, P. Bousso, D. Braun, J. J. Moon and M. L. Albert (2008). "Antigen persistence is required for dendritic cell licensing and CD8+ T cell cross-priming." *J Immunol* **181**(5): 3067-3076.
- Kalchenko, V., S. Shivtiel, V. Malina, K. Lapid, S. Haramati, T. Lapidot, A. Brill and A. Harmelin (2006). "Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing." *J Biomed Opt* **11**(5): 050507.
- Kalergis, A. M. and J. V. Ravetch (2002). "Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fcγ receptors on dendritic cells." *J Exp Med* **195**(12): 1653-1659.
- Kalinski, P. and H. Okada (2010). "Polarized dendritic cells as cancer vaccines: directing effector-type T cells to tumors." *Semin Immunol* **22**(3): 173-182.
- Kantoff, P. W., C. S. Higano, N. D. Shore, E. R. Berger, E. J. Small, D. F. Penson, C. H. Redfern, A. C. Ferrari, R. Dreicer, R. B. Sims, Y. Xu, M. W. Frohlich and P. F. Schellhammer (2010). "Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer." *N Engl J Med* **363**(5): 411-422.
- Kawai, T. and S. Akira (2011). "Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity." *Immunity* **34**(5): 637-650.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, L. Rivoltini, S. L. Topalian, T. Miki and S. A. Rosenberg (1994). "Cloning of the gene coding for a shared human melanoma

- antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3515-3519.
- Kawakami, Y., S. Eliyahu, C. H. Delgado, P. F. Robbins, K. Sakaguchi, E. Appella, J. R. Yannelli, G. J. Adema, T. Miki and S. A. Rosenberg (1994). "Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(14): 6458-6462.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie and A. R. Currie (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**(4): 239-257.
- Kim, R., M. Emi and K. Tanabe (2007). "Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape." Immunology **121**(1): 1-14.
- Kirk, C. J., D. Hartigan-O'Connor and J. J. Mule (2001). "The dynamics of the T-cell antitumor response: chemokine-secreting dendritic cells can prime tumor-reactive T cells extranodally." Cancer Res **61**(24): 8794-8802.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky and G. Melino (2009). "Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009." Cell Death Differ **16**(1): 3-11.
- La Porta, C. A. (2007). "Drug resistance in melanoma: new perspectives." Curr Med Chem **14**(4): 387-391.
- Lappin, M. B., J. M. Weiss, V. Delattre, B. Mai, H. Dittmar, C. Maier, K. Manke, S. Grabbe, S. Martin and J. C. Simon (1999). "Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection." Immunology **98**(2): 181-188.
- Leblond, F., S. C. Davis, P. A. Valdes and B. W. Pogue (2010). "Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications." J Photochem Photobiol B **98**(1): 77-94.
- Lee, J. R., J. H. Shin, J. H. Park, S. U. Song and G. S. Choi (2007). "Combined treatment with intratumoral injection of dendritic cells and topical application of imiquimod for murine melanoma." Clin Exp Dermatol **32**(5): 541-549.
- Lewis, K. L. and B. Reizis (2012). "Dendritic cells: arbiters of immunity and immunological tolerance." Cold Spring Harb Perspect Biol **4**(8): a007401.
- Liu, Y. J. (2005). "IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors." Annu Rev Immunol **23**: 275-306.
- Longhi, M. P., C. Trumpfheller, J. Idoyaga, M. Caskey, I. Matos, C. Kluger, A. M. Salazar, M. Colonna and R. M. Steinman (2009). "Dendritic cells require a systemic type I interferon response to mature and induce CD4+ Th1 immunity with poly IC as adjuvant." J Exp Med **206**(7): 1589-1602.
- Lowy, D. R. and J. T. Schiller (2006). "Prophylactic human papillomavirus vaccines." J Clin Invest **116**(5): 1167-1173.
- Lutsiak, M. E., R. T. Semnani, R. De Pascalis, S. V. Kashmiri, J. Schlom and H. Sabzevari (2005). "Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide." Blood **105**(7): 2862-2868.
- Lutz, M. B. and S. Rossner (2007). "Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum." Immunobiology **212**(9-10): 855-862.
- Mac Keon, S., S. Gazzaniga, J. Mallerman, A. I. Bravo, J. Mordoh and R. Wainstok (2010). "Vaccination with dendritic cells charged with apoptotic/necrotic B16 melanoma induces the formation of subcutaneous lymphoid tissue." Vaccine **28**(51): 8162-8168.

- Machy, P., K. Serre and L. Leserman (2000). "Class I-restricted presentation of exogenous antigen acquired by Fcγ receptor-mediated endocytosis is regulated in dendritic cells." Eur J Immunol **30**(3): 848-857.
- Manches, O., G. Lui, J. P. Molens, J. J. Sotto, L. Chaperot and J. Plumas (2008). "Whole lymphoma B cells allow efficient cross-presentation of antigens by dendritic cells." Cytotherapy **10**(6): 642-649.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, U. E. Hopken, M. Ugucioni, M. Lipp, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2003). "Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming." J Exp Med **198**(4): 615-621.
- Melero, I., A. M. Grimaldi, J. L. Perez-Gracia and P. A. Ascierto (2013). "Clinical development of immunostimulatory monoclonal antibodies and opportunities for combination." Clin Cancer Res **19**(5): 997-1008.
- Merad, M. and M. G. Manz (2009). "Dendritic cell homeostasis." Blood **113**(15): 3418-3427.
- Merad, M., P. Sathe, J. Helft, J. Miller and A. Mortha (2013). "The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting." Annu Rev Immunol **31**: 563-604.
- Miloud, T., G. J. Hammerling and N. Garbi (2010). "Review of murine dendritic cells: types, location, and development." Methods Mol Biol **595**: 21-42.
- Miller, J. C., B. D. Brown, T. Shay, E. L. Gautier, V. Jovic, A. Cohain, G. Pandey, M. Leboeuf, K. G. Elpek, J. Helft, D. Hashimoto, A. Chow, J. Price, M. Greter, M. Bogunovic, A. Bellemare-Pelletier, P. S. Frenette, G. J. Randolph, S. J. Turley and M. Merad (2012). "Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage." Nat Immunol **13**(9): 888-899.
- Mitchell, M. S. (2003). "Combinations of anticancer drugs and immunotherapy." Cancer Immunol Immunother **52**(11): 686-692.
- Mordoh, J., C. Kairiyama, L. Bover and E. Solarolo (1997). "Allogeneic cells vaccine increases disease-free survival in stage III melanoma patients. A non randomized phase II study." Medicina (B Aires) **57**(4): 421-427.
- Nabel, G. J. (2013). "Designing tomorrow's vaccines." N Engl J Med **368**(6): 551-560.
- Nakahara, T., H. Uchi, A. M. Lesokhin, F. Avogadri, G. A. Rizzuto, D. Hirschhorn-Cymerman, K. S. Panageas, T. Merghoub, J. D. Wolchok and A. N. Houghton (2010). "Cyclophosphamide enhances immunity by modulating the balance of dendritic cell subsets in lymphoid organs." Blood **115**(22): 4384-4392.
- Napolitani, G., A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto and A. Lanzavecchia (2005). "Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells." Nat Immunol **6**(8): 769-776.
- Nasr, I. W., M. Reel, M. H. Oberbarnscheidt, R. H. Mounzer, F. K. Baddoura, N. H. Ruddle and F. G. Lakkis (2007). "Tertiary lymphoid tissues generate effector and memory T cells that lead to allograft rejection." Am J Transplant **7**(5): 1071-1079.
- Ossowski, L. and J. A. Aguirre-Ghiso (2010). "Dormancy of metastatic melanoma." Pigment Cell Melanoma Res **23**(1): 41-56.
- Palucka, K. and J. Banchereau (2013). "Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines." Immunity **39**(1): 38-48.
- Pang, B., J. Neijssen, X. Qiao, L. Janssen, H. Janssen, C. Lippuner and J. Neefjes (2009). "Direct antigen presentation and gap junction mediated cross-presentation during apoptosis." J Immunol **183**(2): 1083-1090.
- Parmiani, G., A. De Filippo, L. Novellino and C. Castelli (2007). "Unique human tumor antigens: immunobiology and use in clinical trials." J Immunol **178**(4): 1975-1979.
- Pecorino, L. (2012). Molecular biology of cancer, Oxford university press.
- Pizzurro, G. A., F. P. Madorsky Rowdo, L. M. Pujol-Lereis, L. A. Quesada-Allue, A. M. Copati, M. P. Roberti, J. L. Teillaud, E. M. Levy, M. M. Barrio and J. Mordoh (2013). "High lipid content of irradiated human melanoma cells does not affect cytokine-matured dendritic cell function." Cancer Immunol Immunother **62**(1): 3-15.

- Plymoth, A., S. Viviani and P. Hainaut (2009). "Control of hepatocellular carcinoma through hepatitis B vaccination in areas of high endemicity: perspectives for global liver cancer prevention." Cancer Lett **286**(1): 15-21.
- Podlaha, O., M. Riester, S. De and F. Michor (2012). "Evolution of the cancer genome." Trends Genet **28**(4): 155-163.
- Polak, M. E., N. J. Borthwick, M. J. Jager and I. A. Cree (2009). "Melanoma vaccines: The problems of local immunosuppression." Hum Immunol **70**(5): 331-339.
- Prehn, R. T. and J. M. Main (1957). "Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas." J Natl Cancer Inst **18**(6): 769-778.
- Pulendran, B. and R. Ahmed (2011). "Immunological mechanisms of vaccination." Nat Immunol **12**(6): 509-517.
- Radojcic, V., K. B. Bezak, M. Skarica, M. A. Pletneva, K. Yoshimura, R. D. Schulick and L. Luznik (2010). "Cyclophosphamide resets dendritic cell homeostasis and enhances antitumor immunity through effects that extend beyond regulatory T cell elimination." Cancer Immunol Immunother **59**(1): 137-148.
- Raz, A., W. L. McLellan, I. R. Hart, C. D. Bucana, L. C. Hoyer, B. A. Sela, P. Dragsten and I. J. Fidler (1980). "Cell surface properties of B16 melanoma variants with differing metastatic potential." Cancer Res **40**(5): 1645-1651.
- Reboulet, R. A., C. M. Hennies, Z. Garcia, S. Nierkens and E. M. Janssen (2010). "Prolonged antigen storage endows merocytic dendritic cells with enhanced capacity to prime anti-tumor responses in tumor-bearing mice." J Immunol **185**(6): 3337-3347.
- Roithmaier, S., A. M. Haydon, S. Loi, D. Esmore, A. Griffiths, P. Bergin, T. J. Williams and M. A. Schwarz (2007). "Incidence of malignancies in heart and/or lung transplant recipients: a single-institution experience." J Heart Lung Transplant **26**(8): 845-849.
- Rosenberg, S. A., J. C. Yang and N. P. Restifo (2004). "Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines." Nat Med **10**(9): 909-915.
- Ruiz, M. S., S. Mac Keon, S. Campisano, A. I. Bravo, S. Gazzaniga and R. Wainstok (2014). "CD207(+) cells recruitment to the vaccination site and draining lymph nodes after the administration of DC-Apo/Nec vaccine in mice." Vaccine **32**(11): 1229-1232.
- Salem, M. L., A. N. Kadima, S. A. El-Naggar, M. P. Rubinstein, Y. Chen, W. E. Gillanders and D. J. Cole (2007). "Defining the ability of cyclophosphamide preconditioning to enhance the antigen-specific CD8+ T-cell response to peptide vaccination: creation of a beneficial host microenvironment involving type I IFNs and myeloid cells." J Immunother **30**(1): 40-53.
- Scandella, E., Y. Men, S. Gillessen, R. Forster and M. Groettrup (2002). "Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells." Blood **100**(4): 1354-1361.
- Scheffer, S. R., H. Nave, F. Korangy, K. Schlote, R. Pabst, E. M. Jaffee, M. P. Manns and T. F. Greten (2003). "Apoptotic, but not necrotic, tumor cell vaccines induce a potent immune response in vivo." Int J Cancer **103**(2): 205-211.
- Schiavoni, G., F. Mattei, T. Di Pucchio, S. M. Santini, L. Bracci, F. Belardelli and E. Proietti (2000). "Cyclophosphamide induces type I interferon and augments the number of CD44(hi) T lymphocytes in mice: implications for strategies of chemoimmunotherapy of cancer." Blood **95**(6): 2024-2030.
- Schiavoni, G., A. Sistigu, M. Valentini, F. Mattei, P. Sestili, F. Spadaro, M. Sanchez, S. Lorenzi, M. T. D'Urso, F. Belardelli, L. Gabriele, E. Proietti and L. Bracci (2011). "Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis." Cancer Res **71**(3): 768-778.
- Schnurr, M., C. Scholz, S. Rothenfusser, P. Galambos, M. Dauer, J. Robe, S. Endres and A. Eigler (2002). "Apoptotic pancreatic tumor cells are superior to cell lysates in promoting cross-priming of cytotoxic T cells and activate NK and gammadelta T cells." Cancer Res **62**(8): 2347-2352.

- Schrama, D., L. O. Pedersen, P. Keikavoussi, M. H. Andersen, P. Straten Pt, E. B. Brocker, E. Kampgen and J. C. Becker (2002). "Aggregation of antigen-specific T cells at the inoculation site of mature dendritic cells." J Invest Dermatol **119**(6): 1443-1448.
- Schrama, D., H. Voigt, A. O. Eggert, R. Xiang, H. Zhou, T. N. Schumacher, M. H. Andersen, P. thor Straten, R. A. Reisfeld and J. C. Becker (2008). "Immunological tumor destruction in a murine melanoma model by targeted LTalpha independent of secondary lymphoid tissue." Cancer Immunol Immunother **57**(1): 85-95.
- Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.
- Shenenberger, D. W. (2012). "Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective." Am Fam Physician **85**(2): 161-168.
- Shklovskaya, E., B. Roediger and B. Fazekas de St Groth (2008). "Epidermal and dermal dendritic cells display differential activation and migratory behavior while sharing the ability to stimulate CD4+ T cell proliferation in vivo." J Immunol **181**(1): 418-430.
- Siegel, R., E. Ward, O. Brawley and A. Jemal (2011). "Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths." CA Cancer J Clin **61**(4): 212-236.
- Silva, M. T. (2010). "Secondary necrosis: the natural outcome of the complete apoptotic program." FEBS Lett **584**(22): 4491-4499.
- Spel, L., J. J. Boelens, S. Nierkens and M. Boes (2013). "Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: How signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation." Oncoimmunology **2**(11): e26403.
- Spranger, S., M. Javorovic, M. Burdek, S. Wilde, B. Mosetter, S. Tippmer, I. Bigalke, C. Geiger, D. J. Schendel and B. Frankenberger (2010). "Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075." J Immunol **185**(1): 738-747.
- Strydom, G., C. Bangert, M. Tauber, R. Strohal, T. Kopp and G. Stingl (2007). "Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells." J Exp Med **204**(6): 1441-1451.
- Steinman, R. M. (2012). "Decisions about dendritic cells: past, present, and future." Annu Rev Immunol **30**: 1-22.
- Steinman, R. M., J. C. Adams and Z. A. Cohn (1975). "Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen." J Exp Med **141**(4): 804-820.
- 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): 1142-1162.
- Strome, S. E., S. Voss, R. Wilcox, T. L. Wakefield, K. Tamada, D. Flies, A. Chapoval, J. Lu, J. L. Kasperbauer, D. Padley, R. Vile, D. Gastineau, P. Wettstein and L. Chen (2002). "Strategies for antigen loading of dendritic cells to enhance the antitumor immune response." Cancer Res **62**(6): 1884-1889.
- Suzuki, H., B. Wang, G. M. Shivji, P. Toto, P. Amerio, M. A. Tomai, R. L. Miller and D. N. Sauder (2000). "Imiquimod, a topical immune response modifier, induces migration of Langerhans cells." J Invest Dermatol **114**(1): 135-141.
- Swann, J. B. and M. J. Smyth (2007). "Immune surveillance of tumors." J Clin Invest **117**(5): 1137-1146.
- Tay, S. S., B. Roediger, P. L. Tong, S. Tikoo and W. Weninger (2014). "The Skin-Resident Immune Network." Curr Dermatol Rep **3**: 13-22.
- Terando, A. M., M. B. Faries and D. L. Morton (2007). "Vaccine therapy for melanoma: current status and future directions." Vaccine **25 Suppl 2**: B4-16.
- Tsujimoto, H., P. A. Efron, T. Matsumoto, R. F. Ungaro, A. Abouhamze, S. Ono, H. Mochizuki and L. L. Moldawer (2006). "Maturation of murine bone marrow-derived dendritic cells

- with poly(I:C) produces altered TLR-9 expression and response to CpG DNA." Immunol Lett **107**(2): 155-162.
- Umansky, V., O. Abschuetz, W. Osen, M. Ramacher, F. Zhao, M. Kato and D. Schadendorf (2008). "Melanoma-specific memory T cells are functionally active in Ret transgenic mice without macroscopic tumors." Cancer Res **68**(22): 9451-9458.
- van der Bruggen, P., C. Traversari, P. Chomez, C. Lurquin, E. De Plaen, B. Van den Eynde, A. Knuth and T. Boon (1991). "A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma." Science **254**(5038): 1643-1647.
- Verdijk, R. M., T. Mutis, B. Esendam, J. Kamp, C. J. Melief, A. Brand and E. Goulmy (1999). "Polyribonucleosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells." J Immunol **163**(1): 57-61.
- Villadangos, J. A. and L. Young (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-361.
- von Euw, E. M., M. M. Barrio, D. Furman, E. M. Levy, M. Bianchini, I. Peguillet, O. Lantz, A. Vellice, A. Kohan, M. Chacon, C. Yee, R. Wainstok and J. Mordoh (2008). "A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptotic/necrotic melanoma cells. Analysis of toxicity and immune response to the vaccine and of IL-10 -1082 promoter genotype as predictor of disease progression." J Transl Med **6**: 6.
- Wang, R. F., E. Appella, Y. Kawakami, X. Kang and S. A. Rosenberg (1996). "Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes." J Exp Med **184**(6): 2207-2216.
- Warger, T., P. Osterloh, G. Rechtsteiner, M. Fassbender, V. Heib, B. Schmid, E. Schmitt, H. Schild and M. P. Radsak (2006). "Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo." Blood **108**(2): 544-550.
- Weatherhead, S. C., M. Haniffa and C. M. Lawrence (2007). "Melanomas arising from naevi and de novo melanomas--does origin matter?" Br J Dermatol **156**(1): 72-76.
- Weber, J. (2009). "Ipilimumab: controversies in its development, utility and autoimmune adverse events." Cancer Immunol Immunother **58**(5): 823-830.
- Weinberg, R. A. (2014). The biology of cancer, Garland science.
- Weinstein, I. B. and K. Case (2008). "The history of Cancer Research: introducing an AACR Centennial series." Cancer Res **68**(17): 6861-6862.
- You, J. S. and P. A. Jones (2012). "Cancer genetics and epigenetics: two sides of the same coin?" Cancer Cell **22**(1): 9-20.
- Zhu, X. J., Z. F. Yang, Y. Chen, J. Wang and A. G. Rosmarin (2012). "PU.1 is essential for CD11c expression in CD8(+)/CD8(-) lymphoid and monocyte-derived dendritic cells during GM-CSF or FLT3L-induced differentiation." PLoS One **7**(12): e52141.
- Zitvogel, L., O. Kepp and G. Kroemer (2010). "Decoding cell death signals in inflammation and immunity." Cell **140**(6): 798-804.



## ABREVIATURAS

<b>ACK</b>	amonio-cloro-potasio (buffer)
<b>Apo/Nec</b>	células apoptóticas y necróticas del melanoma murino B16-F1
<b>BCG</b>	bacillo Calmette-Guerin
<b>BSA</b>	albúmina sérica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>CD(x)</b>	cúmulo ( <i>cluster</i> ) de diferenciación (x)
<b>CD+Apo/Nec</b>	(vacuna a base de) CDs más Apo/Nec puestas en contacto al momento de la vacunación (sin previo cocultivo <i>ex vivo</i> de 24 hs)
<b>CD-Apo/Nec</b>	CDs cocultivadas <i>in vitro</i> por 24 horas con Apo/Nec
<b>CDc</b>	CD convencional
<b>CDD</b>	células dendríticas dérmicas
<b>CDp</b>	CD plasmocitoide
<b>CDs</b>	células dendríticas
<b>CFSE</b>	5(6)-Carboxifluoresceína diacetato N-succinimidil éster
<b>CIC</b>	ciclofosfamida
<b>CL</b>	células de langerhans
<b>CLIP</b>	péptido intermediario similar a la corticotropina ( <i>Corticotropin-Like Intermediate Peptide</i> )
<b>CPA</b>	célula presentadora de antígeno
<b>cpm</b>	cuentas por minuto
<b>CR3</b>	receptor de complemento 3 ( <i>Complement Receptor 3</i> )
<b>CR4</b>	receptor de complemento 4 ( <i>Complement Receptor 3</i> )
<b>CTLA-4</b>	antígeno 4 asociado al linfocito T citotóxico/CD152 ( <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i> )
<b>DAMPs</b>	patrones moleculares asociados a daño ( <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>DAPI</b>	diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DiR</b>	<i>Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindotricarbocyanine Iodide</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminetetraacético ( <i>Ethilenediaminetetraacetic Acid</i> )
<b>ELISA</b>	ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>FBS</b>	suero fetal bobino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>Fc</b>	fragmento cristalizable
<b>FDA</b>	<i>Food and Drug Administration</i>
<b>Flt3</b>	Tirosina quinasa 3 similar a Fms ( <i>Fms-related tyrosine kinase 3</i> )
<b>GM-CSF</b>	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ( <i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> )
<b>HEV</b>	vénulas del endotelio alto ( <i>High Endothelial Venules</i> )
<b>HPV</b>	virus del papiloma humano ( <i>Human Papillomavirus</i> )
<b>HRP</b>	peroxidasa de rabanito ( <i>Horseradish Peroxidase</i> )
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.v.</b>	intravenosa
<b>IFN</b>	interferón
<b>Ig</b>	inmunoglobulina

<b>IL</b>	interleuquina
<b>IMI</b>	imiquimod
<b>Ly6G</b>	antígeno linfocitario 6G ( <i>Lymphocyte Antigen 6G</i> )
<b>MALT</b>	tejido linfoide asociado a mucosas ( <i>Mucosa-associated Lymphoid Tissue</i> )
<b>MAPK</b>	proteínas kinasas activadas por mitógeno ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
<b>MC</b>	melanoma cutáneo
<b>M-CSF</b>	factor estimulante de colonias de macrófagos ( <i>Macrophage colony-stimulating factor</i> )
<b>MHC-I</b>	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I ( <i>Major Histocompatibility Complex-I</i> )
<b>MHC-II</b>	complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II ( <i>Major Histocompatibility Complex-II</i> )
<b>NK</b>	citotóxicas naturales ( <i>Natural Killer</i> )
<b>NKT</b>	citotóxicas naturales T ( <i>Natural Killer T</i> )
<b>NOD</b>	dominio de oligomerización de unión a nucleótidos ( <i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i> )
<b>ON</b>	Toda la noche ( <i>Overnight</i> )
<b>OT-I</b>	<i>OVA-specific TCR transgenic mice I</i>
<b>OVA</b>	ovoalbúmina
<b>PAMPs</b>	patrones moleculares asociados a patógenos ( <i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> )
<b>PAP</b>	fosfatasa prostática ácida ( <i>Prostatic Acid Phosphatase</i> )
<b>PBMC</b>	células mononucleares de sangre periférica ( <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> )
<b>PBS</b>	buffer fosfato salino ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PD-1</b>	proteína de muerte programada 1 ( <i>Programmed cell Death 1</i> )
<b>PD-L1</b>	ligando 1 de muerte programada ( <i>Programmed cell Death Ligand 1</i> )
<b>PD-L2</b>	ligando 2 de muerte programada ( <i>Programmed cell Death Ligand 2</i> )
<b>PFA</b>	paraformaldehído
<b>PGE<sub>2</sub></b>	prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PNAd</b>	adresina de nódulo linfático periférico ( <i>Peripheral Node Addressin</i> )
<b>poly (I:C)</b>	<i>polyriboinosinic polyribocytidylic acid</i>
<b>RB</b>	retinoblastoma
<b>RER</b>	retículo endoplasmático rugoso
<b>RFcy</b>	receptor para el fragmento Fc de las IgG
<b>RIG-I</b>	gen I inducible por ácido retinoico ( <i>Retinoic acid-Inducible Gene 1</i> )
<b>RLC</b>	receptor de lectina tipo C
<b>RPMI</b>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
<b>RRP</b>	receptores de reconocimiento de patrones
<b>s.c.</b>	subcutáneo
<b>SIDA</b>	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
<b>TAP</b>	proteína transportadora asociada al procesamiento antigénico ( <i>Transporter associated with Antigen Processing</i> )
<b>TCR</b>	receptor de linfocitos T ( <i>T-Cell Receptor</i> )
<b>TLR</b>	receptor tipo toll ( <i>Toll-Like Receptor</i> )
<b>TNF</b>	factor de necrosis tumoral ( <i>Tumoral Necrosis Factor</i> )
<b>Treg</b>	linfocitos T regulatorios
<b>TRP</b>	proteína tirosinasa-relacionada ( <i>Tyrosinase-Related Protein</i> )
<b>Tyr</b>	tirosinasa
<b>UV</b>	ultravioleta

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> Subtipos y localización de CDs murinas.	15
<b>Tabla 2</b> Marcadores de superficie utilizados por citometría de flujo	44
<b>Tabla 3</b> Marcadores de superficie utilizados por inmunofluorescencia	50
<b>Tabla 4</b> Porcentajes de positividad de las CDs para diferentes marcadores de CDs y macrófagos	58
<b>Tabla 5</b> Viabilidad celular en función de la concentración de DiR	72
<b>Tabla 6</b> Porcentaje de positividad para los diferentes marcadores de maduración (I-A <sup>b</sup> , CD80 y CD86) de las CDs	93

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1</b> Capacidades del cáncer.	4
<b>Fig. 2</b> Fases de la progresión melanocítica tumoral.	7
<b>Fig. 3</b> Activación de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> naïve por CDs.	11
<b>Fig. 4</b> Familias de receptores endocíticos expresados por las CDs que median la internalización de antígenos.	17
<b>Fig. 5</b> Plasticidad de las CDs en la inducción de diferentes perfiles de respuesta en los linfocitos T naïve	20
<b>Fig. 6</b> Protección antitumoral de la vacuna CD-Apo/Nec	31
<b>Fig. 7</b> Caracterización ultraestructural de las Apo/Nec de 48 horas post-irradiación	53
<b>Fig. 8</b> Caracterización ultrastuctural de las CD durante el cocultivo con las Apo/Nec	55-56
<b>Fig. 9</b> Porcentaje de fagocitosis de Apo/Nec por CDs en función del tiempo de cocultivo	57
<b>Fig. 10</b> Histogramas de positividad para distintos marcadores de superficie en las fracciones CD11c <sup>+</sup> , CD11c <sup>-</sup> y CDs originales	60
<b>Fig. 11</b> Esquema de vacunación con CD-Apo/Nec y posterior desafío tumoral	61
<b>Fig. 12</b> Curva de supervivencia utilizando las vacunas CD-Apo/Nec CD11c <sup>+</sup> , CD-Apo/Nec CD11c <sup>-</sup> o CD-Apo/Nec	61
<b>Fig. 13</b> Fagocitosis de Apo/Nec por CDs, o por las fracciones CD11c <sup>+</sup> y CD11c <sup>-</sup>	62
<b>Fig. 14</b> Curva de supervivencia utilizando diferentes estrategias de vacunación con CD-Apo/Nec	64
<b>Fig. 15</b> Micrometástasis en el sitio de desafío tumoral	65
<b>Fig. 16</b> Nivel de anticuerpos anti-B16-F1 detectados por ELISA en suero de animales Vacunados	69
<b>Fig. 17</b> Migración de células CD-Apo/Nec a los ganglios drenantes	70
<b>Fig. 18</b> Curva de calibración para estimar el N° de CD-Apo/Nec en ganglios linfáticos	72
<b>Fig. 19</b> Biodistribución de una dosis de CD-Apo/Nec DiR hasta 120 h post-inyección	73

<b>Fig. 20</b>	Poblaciones celulares en el sitio de inyección de una dosis de vacuna CD-Apo/Nec	74
<b>Fig. 21</b>	Estructura pseudolinfoide detectada 120 hs post-vacunación con CD-Apo/Nec	76
<b>Fig. 22</b>	Poblaciones inmunes reclutadas al sitio al finalizar el esquema de vacunación	78
<b>Fig. 23</b>	Expresión de PNAd en el sitio de vacunación	80
<b>Fig. 24</b>	Linfocitos T regulatorios en ganglio drenante de animales vacunados con 1 o 4 dosis de vacuna	81
<b>Fig. 25</b>	Proliferación de linfocitos antígeno-específicos en el ganglio drenante de ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA	83
<b>Fig. 26</b>	Proliferación de linfocitos OVA-específicos en el sitio de vacunación de ratones vacunados con CD-Apo/Nec OVA	84
<b>Fig. 27</b>	Esquema de vacunación con CD-Apo/Nec, posterior desafío tumoral, y toma de muestras de animales protegidos y no protegidos	85
<b>Fig. 28</b>	Análisis de subpoblaciones de linfocitos T	86
<b>Fig. 29</b>	Evolución del peso de los animales inyectados con diferentes dosis de ciclofosfamida	89
<b>Fig. 30</b>	Esquemas de vacunación con precondicionamiento del huésped	90
<b>Fig. 31</b>	Curva de supervivencia al precondicionar al huésped a la vacunación con CD-Apo/Nec	91
<b>Fig. 32</b>	Estimulación de linfocitos alogénicos al estimular CDs con cóctel de citoquinas	92
<b>Fig. 33</b>	Estimulación de linfocitos alogénicos al estimular CDs con PIP	94
<b>Fig. 34</b>	Diferenciación <i>in vitro</i> de CDs utilizando diferentes densidades iniciales de precursores	96
<b>Fig. 35</b>	Caracterización de las vesículas lipídicas neutras en las CD, CD LPS y CD-Apo/Nec	98
<b>Fig. 36</b>	Respuesta inmune a la vacunación con CD-Apo/Nec	107
<b>Fig. 37</b>	Comparación de CDs y CD-Apo/Nec	111