

Tesis Doctoral

Caracterización de una vacuna compuesta por células dendríticas. Estudio del mecanismo de acción en la protección contra el melanoma murino B16F1

Campisano, Sabrina Edith

2015-03-27

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

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

Cita tipo APA:

Campisano, Sabrina Edith. (2015-03-27). Caracterización de una vacuna compuesta por células dendríticas. Estudio del mecanismo de acción en la protección contra el melanoma murino B16F1. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Campisano, Sabrina Edith. "Caracterización de una vacuna compuesta por células dendríticas. Estudio del mecanismo de acción en la protección contra el melanoma murino B16F1". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-27.

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

**Caracterización de una vacuna compuesta por
células dendríticas. Estudio del mecanismo de
acción en la protección contra el melanoma
murino B16F1**

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

Sabrina Edith Campisano

Director de tesis: Dra. Rosa Wainstok
Consejero de Estudios: Dra. Elba Vazquez

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biología Tumoral,
Departamento de Química Biológica, FCEN, UBA
(IQUIBICEN-CONICET)

Buenos Aires, 2015

INDICE

RESUMEN	-
SUMMARY	-
PUBLICACIONES	-
AGRADECIMIENTOS	-
INTRODUCCIÓN	1
1. Sección 1. Cáncer	1
1.1 Origen	1
1.2 Carcinogénesis: desarrollo del cáncer	1
1.3 Características inmunológicas de un tumor	2
2. Sección 2. Melanoma	3
2.1 Descripción. Incidencia y mortalidad	3
2.2 Estadificación clínica de la enfermedad	4
2.3 Tratamientos actuales contra el melanoma	5
3. Sección 3. Respuesta inmune y cáncer	6
3.1 Cambios en los antígenos asociados al tumor	7
3.2 Resistencia de las células tumorales a los mecanismos de apoptosis y necrosis	7
3.3 Inmunosupresión mediada por el tumor	7
3.4 Poblaciones del sistema inmune esenciales en la inmunosupresión generada por el tumor	8
3.4.1 Balance T <i>helper</i> 1 / T <i>helper</i> 2 (Th1 / Th2)	9
3.4.2 Balance de macrófagos M1 / M2	9
3.4.3 Neutrófilos: balance N1 / N2 y su rol en cáncer	11
3.4.4 Células mieloides inmaduras: MDSCs	12
3.4.5 LTs <i>helper</i> regulatorios: LTs Regs	13
3.4.6 LB regulatorios: LBs Regs	14
3.4.7 IL-17 e IL-23. Respuesta inmune mediada por células Th17	15
3.4.8 Células dendríticas	15
4. Sección 4. Inmunoterapia del cáncer basada en células dendríticas	18
4.1 CD cargadas <i>ex vivo</i> con antígenos asociados al tumor	20
4.2 Direccionamiento de antígenos <i>in vivo</i>	21
4.3 Antígenos tumorales dirigidos <i>in vivo</i> hacia las CD empleando anticuerpos	21
4.4 Alternativas terapéuticas dirigidas contra el TME	22
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Animales	26
1.1 Ratones de la cepa C57BL/6	26
1.2 Ratones balb-c	26
1.3 Ratones transgénicos OT-I	26
1.4 Ratones transgénicos OT-II	27
2. Líneas celulares	27

3.	Detección de micoplasma	28
4.	Inducción de apoptosis y necrosis	28
5.	Obtención de CD a partir de precursores de MO	28
6.	Purificación de CD CD11c⁺. Obtención de las fracciones CD⁺ y CD⁻	29
7.	Co-cultivo con células apoptóticas - necróticas (Apo-Nec)	29
8.	Inmunización de ratones C57BL/6	30
9.	Tinción con May-Grünwald Giemsa	30
10.	Determinación de antígenos de superficie por Inmunofluorescencia	31
11.	Endocitosis de FITC-Dextran	31
12.	Fagocitosis de células Apo-Nec	32
	12.1 Marcación con CFSE	32
	12.2 Marcación con PKH26	32
13.	Disgregación de tejidos	33
	13.1 Ganglios linfáticos	33
	13.2 Bazo	33
	13.3 Sitio de vacunación	33
14.	Capacidad estimuladora alogeneica <i>in vitro</i>. Reacción mixta Linfocitaria	34
15.	Capacidad estimuladora antígeno-específica. Proliferación de LTs CD4⁺ respondedores a OVA	34
16.	Proliferación de LTs OT-I en respuesta a células de MO obtenidas de ratones inmunizados con CD-OVA o CD/Apo-Nec-Ova	35
17.	Producción de IL-10 e IL-12	35
	17.1 Elisa para detectar secreción	35
	17.2 Determinación de reservorios intracelulares	36
18.	Determinación de la expresión de citoquinas y quimioquinas, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	36
	18.1 Extracción de ARN	36
	18.2 Retrotranscripción del ARN a cADN	37
	18.3 Condiciones de ciclado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	37
	18.4 Secuencia de primers	38
19.	Caracterización de los macrófagos (M1 / M2) y neutrófilos (N1 / N2) presentes en el cultivo de CD	39
20.	Determinación de los niveles de ON y urea en los sitios de ratones vacunados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec	40
21.	Análisis estadísticos	40
	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
	Capítulo I: Caracterización fenotípica de las CD	41
	1.1 Descripción del cultivo primario de CD a lo largo de 7 días	41
	1.2 Identificación de neutrófilos en el cultivo CD. Variación de su proporción en las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ luego de la separación inmuno-magnética	42
	1.3 Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD	44
	DISCUSIÓN. Capítulo I	48
	Capítulo II: Caracterización funcional de las CD	50

2.1	Eficiencia de captación antigénica de las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ en comparación con las CD sin seleccionar. Fagocitosis de células Apo-Nec	50
2.2	Eficiencia de captación antigénica de las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ en comparación con las CD sin seleccionar. Endocitosis de FITC-Dextran	51
2.3	Capacidad estimuladora alogeneica. Cultivo mixto linfocitario	52
2.4	Capacidad estimuladora antígeno-específica. Cultivo con LTs CD4 ⁺ OT-2	53
2.5	Producción de citoquinas: la vacuna CD/Apo-Nec no secreta IL-12 cuando es administrada	54
2.6	Expresión de citoquinas y quimioquinas en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec	56
2.7	Caracterización de los macrófagos y neutrófilos presentes en el cultivo heterogéneo de CD	58
	DISCUSIÓN. Capítulo II	60
	Capítulo III. Caracterización del mecanismo de protección anti-tumoral de la vacuna CD/Apo-Nec	64
3.1	Inmunización de ratones C57BL/6. Las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ cooperan para conferir protección <i>in vivo</i>	64
3.2	Progresión tumoral en ratones no protegidos, inmunizados con CD/Apo-Nec, CD ⁺ /Apo-Nec y CD ⁻ /Apo-Nec	66
3.3	Proporción de macrófagos y neutrófilos M1/N1 vs. M2/N2 reclutados en el sitio de vacunación	67
3.4	Expresión de citoquinas y quimioquinas en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD ⁺ /ApoNec y CD ⁻ /ApoNec	68
3.5	Transporte de antígenos de proteína OVA hacia MO en ratones inmunizados con CD-OVA	69
3.6	Transporte de antígenos de proteína OVA hacia MO en ratones inmunizados con CD/Apo-Nec-Ova	70
	DISCUSIÓN. Capítulo III	72
	CONCLUSIONES	79
	BIBLIOGRAFÍA	82
	ABREVIATURAS	-
	ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	-

RESUMEN

Caracterización de una vacuna compuesta por células dendríticas. Estudio del mecanismo de acción en la protección contra el melanoma murino B16F1

Se caracterizaron de forma fenotípica y funcional las células dendríticas (CD) derivadas del cultivo de precursores de médula ósea, y se estudió el mecanismo mediante el cual la vacuna CD/Apo-Nec, constituida por CD co-cultivadas con células apoptóticas y necróticas del melanoma murino B16F1 (Apo-Nec), genera protección anti-tumoral.

Las CD se separaron empleando microesferas magnéticas anti-CD11c, y las dos poblaciones resultantes en términos de positividad para CD11c (CD⁺ y CD⁻), se estudiaron junto a las CD.

Se demostró que la población de CD obtenida luego de 7 días de cultivo con el factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos murino (mGM-CSF), es heterogénea y presenta aproximadamente un 60% de CD CD11c⁺. El 26,6% de las células presentes en la fracción CD⁺ co-expresó los antígenos de superficie CD11c y F4/80, y el 75,4% resultó ser doble positiva para CD11c y CD11b. La fracción CD⁺ también expresó Ly6-G. La fracción CD⁻ quedó enriquecida en macrófagos CD11c⁻/F4/80⁺ (44,7%), algunos de los cuales co-expresaron Ly6G (41,8%); y en neutrófilos F4/80⁻/Ly6-G⁺ (34,6%).

Las fracciones CD⁺ y CD⁻ mostraron una capacidad similar para fagocitar y endocitar antígenos, y expresaron niveles similares de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II y moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 y CD86, respecto a la población de CD. Sin embargo, sólo la vacuna CD/Apo-Nec fue capaz de conferir una protección significativa. Luego del co-cultivo no se detectó interleuquina-12, ni intracelularmente ni en el sobrenadante de la vacuna CD/Apo-Nec. Por lo cual, la protección obtenida sería independiente de su habilidad para secretar esta citoquina en el momento de ser administrada.

No detectamos una polarización de los macrófagos y neutrófilos derivados del cultivo de CD hacia un fenotipo M1/N1 o M2/N2, antes o después del co-cultivo, lo cual podría relacionarse con la falta de expresión de interferón- γ , y de secreción de interleuquina-10 e interleuquina-12 por parte de las células.

Las vacunas constituidas por las fracciones CD⁺ y CD⁻ (CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec), indujeron en los sitios de inmunización, la expresión de interleuquina-10 y

una elevada producción de óxido nítrico, lo cual podría explicar en parte su incapacidad para conferir protección anti-tumoral.

Los resultados obtenidos indicarían que existe una interacción entre las poblaciones celulares que conforman el cultivo de CD. Variaciones en el número de dichas poblaciones resultarían en la falta de protección; por lo cual todas las células presentes en la vacuna CD/Apo-Nec serían necesarias para inducir protección contra el melanoma murino B16-F1.

Palabras clave: células dendríticas; melanoma; vacuna; inmunoterapia, murino, médula ósea.

SUMMARY

Characterization of a vaccine composed of dendritic cells. Study of the mechanism of action conferring protection against murine B16F1 melanoma

Dendritic cells (DC) were derived from murine bone marrow precursors, phenotypically and functionally characterized and used to describe the mechanism by which the CD/Apo-Nec vaccine, comprising DC co-cultured with apoptotic and necrotic cells from murine B16F1 melanoma (Apo-Nec), induces anti-tumoral protection.

DC were separated with anti-CD11c microbeads and the two populations identified in terms of CD11c positivity (DC⁺ and DC⁻) were also studied.

The population of DC obtained after 7 days of culture with murine granulocyte and macrophage colony stimulating factor (mGM-CSF), was shown to be heterogeneous, comprising about 60% CD11c⁺ DC. 26.6% of the cells in the DC⁺ fraction co-expressed CD11c⁺ and F4/80 markers and 75.4% of the DC⁺ fraction were positive for both CD11c and CD11b markers. The DC⁺ fraction also expressed Ly6G. The DC⁻ fraction was richer in CD11c⁻/F4/80⁺ macrophages (44.7%), some of which co-expressed Ly6G (41.8%), and F4/80⁻/Ly6-G⁺ neutrophils (34.6%). The DC⁺ and DC⁻ fractions displayed similar capacities to phagocyte and endocytose antigens and even expressed levels of the major histocompatibility complex class II and the costimulatory molecules CD80, CD83 and CD86 similar to those found in the DC fraction. However, only DC/ApoNec vaccine was capable to induce significant protection. After co-culture, no detectable level of IL-12 was recorded in DC/ApoNec vaccine, either in supernatant or intracellularly. Therefore, the protection obtained seemed to be independent of the vaccine's ability to secrete this cytokine at the time of injection.

The macrophages and neutrophils derived from the DC culture did not polarize toward a phenotype M1/N1 or M2/N2, before or after the co-culture, which could be related with the lack of expression of interferon- γ , and secretion of interleukin-10 and interleukin-12 by the cells.

The vaccines composed of DC⁺ or DC⁻ fractions (DC⁺/Apo-Nec and DC⁻/Apo-Nec), induced the expression of interleukin-10 and an elevated production of nitric oxide in the immunization sites, which could explain in part, their inability to confer anti-tumoral protection.

These results indicate a synergy between the cell populations that make up the DC culture. Variations in the relative size of these populations could prevent anti-

tumoral protection. Thus all of the cell types present in the DC/Apo-Nec vaccine are necessary to induce protection against murine B16F1 melanoma.

Key words: dendritic cells; melanoma; vaccine; immunotherapy, murine, bone marrow.

PUBLICACIONES

Los resultados presentados en esta Tesis fueron parcialmente publicados en:

1. Campisano S., Mac Keon S., Gazzaniga S., Ruiz M.S., Traian M.D., Mordoh J., Wainstok R. Anti-melanoma vaccinal capacity of CD11c-positive and -negative cell populations present in GM-CSF cultures derived from murine bone marrow precursors. *Vaccine* 2013; 31(2):354-61.
2. Ruiz M.S., Mac Keon S., Campisano S., Bravo A.I., Gazzaniga S., Wainstok R. CD207+ cells recruitment to the vaccination site and draining lymph nodes after the administration of DC-Apo/Nec vaccine in mice. *Vaccine* 2014; 32(11):1229-32.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quisiera agradecer a las entidades que financiaron el proyecto: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), CONICET, Universidad de Buenos Aires y Fundación Sales.

Quisiera agradecer a la Fundación Ciencias Exactas y Naturales, y nuevamente a ANPCyT y CONICET por otorgarme las becas que me permitieron realizar la Carrera de Doctorado.

A la Dra. Rosa Wainstok por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su dirección y sus valiosas opiniones.

Al Dr. José Mordoh por su gran generosidad, sus consejos y por la supervisión del trabajo.

A las personas que día a día me han acompañado y ayudado durante la realización de este estudio, tanto los integrantes del Laboratorio de Cancerología del Instituto Leloir (Sole, Flor, Marie, Lau, Anto, Juan y Ceci), como mis compañeros del Laboratorio de Biología Tumoral en la facultad (Sil, Sol, Cristian, Fer, Nadia, Alana, Rodri y Hernán). Gracias a todos ustedes por sus enseñanzas, por hacerme mejor persona, por su paciencia, ayuda, por los consejos, el afecto y la amistad.

Quisiera agradecer a los integrantes del Dpto. de Qca. Biológica por toda la ayuda brindada, la buena predisposición y el respeto.

A mis padres por enseñarme y transmitirme los verdaderos valores, por ser mi ejemplo de honestidad, por su amor incondicional y su confianza.

Quiero agradecerles a mis viejos amigos, por el apoyo, la paciencia y el cariño.

A Fabián, mi novio, por su valiosa ayuda y su contención.

A todos y cada una de las personas que me acompañaron a lo largo de esta etapa ayudándome y guiándome.

GRACIAS A TODOS!!!

INTRODUCCIÓN

Sección 1. Cáncer

1.1. Origen

El cáncer se origina a partir de una alteración en la división celular. Las células pueden eventualmente formar tumores malignos al dividirse descontroladamente, y adquirir la habilidad de migrar hacia otras regiones del cuerpo (Chow, 2010; Blanpain, 2013).

Existe una estricta regulación del ciclo celular a través de proteínas que interactúan entre sí en una secuencia específica de eventos. Algunas de esas proteínas están codificadas por proto-oncogenes y estimulan el crecimiento y la división celular. Otras proteínas están involucradas en la restricción del ciclo celular y la inducción de apoptosis, y se hallan codificadas por los genes supresores de tumores. Las mutaciones originadas tanto en proto-oncogenes, lo cual origina oncogenes; como en genes supresores tumorales provocan la transformación de una célula normal en maligna (Chow, 2010; Blanpain, 2013).

1.2. Carcinogénesis: desarrollo del cáncer

La carcinogénesis es un proceso gradual en el desarrollo de una neoplasia. Este proceso puede ser un fenómeno activo, inducido por uno o varios agentes químicos, físicos o biológicos; o un fenómeno pasivo donde la carcinogénesis ocurre de manera espontánea. En ambos casos, la predisposición genética y la edad influyen dicho proceso (Lipkin, 1979; Pitot and Dragan, 1991; Barret, 1993).

La carcinogénesis ocurre en tres estadios: iniciación, promoción y propagación. Varios carcinógenos son potentes inductores que causan alteraciones en la estructura del ADN, generando cambios permanentes e irreversibles que se transmiten durante la división celular. Sin embargo, muchos otros no actúan a través de este mecanismo, pero sí pueden afectar los estadios de promoción y propagación, promoviendo de forma indirecta el desarrollo del cáncer (Lipkin, 1979; Pitot and Dragan, 1991; Barret, 1993).

1.3. Características inmunológicas de un tumor

Los tumores comprenden grupos heterogéneos de células de diversos orígenes, tales como células estromales, endoteliales y una gran variedad de células del sistema inmune. Esta población heterogénea produce múltiples señales que individual o colectivamente promueven el desarrollo tumoral. El sistema inmune está constantemente patrullando el cuerpo en busca de agentes infecciosos y células aberrantes con el objetivo de destruirlas, durante un proceso denominado inmunovigilancia. Una respuesta inmune efectiva conduce a la identificación y eliminación de las células tumorales. Sin embargo, la inmunovigilancia puede generar una presión selectiva sobre las células tumorales, las cuales pueden suprimir la expresión de ciertos antígenos de superficie, desarrollar la capacidad de persistir en un estado de equilibrio o *dormancy*, o incluso escapar por completo de la respuesta inmune antitumoral, conduciendo a la progresión del tumor (Visvader, 2011; Burkholder et al., 2014).

Los procesos de inmunovigilancia y sus tres posibles resultados: eliminación, equilibrio y escape, se hallan referidos al proceso de inmunoección. Para permanecer viables, continuar creciendo y prosperar, los tumores deben no sólo enfrentar la respuesta inmune dentro de su microambiente sino también mantener ciertas características propias, tales como el auto-abastecimiento de señales de crecimiento, inflamación y angiogénesis (Burrell et al., 2013; Burkholder et al., 2014). En este sentido, Hanahan y Weinberg han identificado seis de las capacidades más importantes compartidas por la mayoría de los tumores (**Figura 1**), que conllevan a un mismo resultado final (Hanahan and Weinberg, 2011).

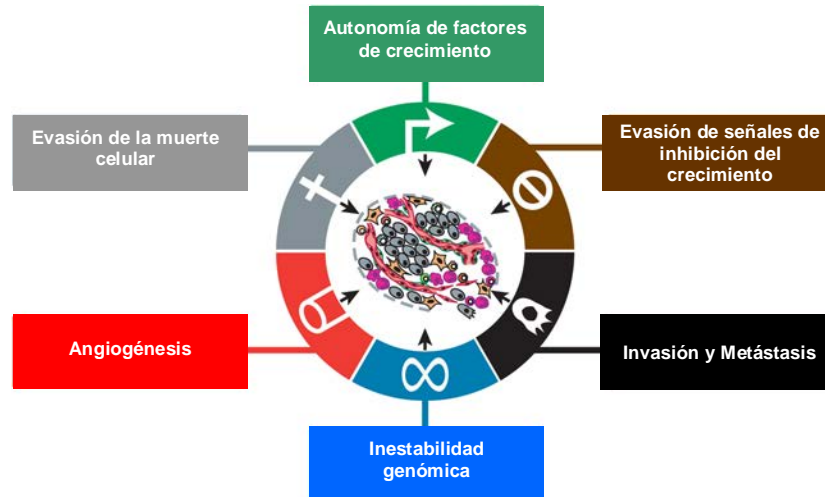


Figura 1: Las características del Cáncer. Adaptado de Hanahan D. y Weinberg R.A., 2011 (Hanahan and Weinberg, 2011)

Sección 2. Melanoma

2.1. Descripción. Incidencia y Mortalidad

El melanoma cutáneo es un tumor maligno originado en los melanocitos, los cuales derivan de la cresta neural y producen el pigmento melanina. La probabilidad de desarrollarlo es mayor en personas de piel clara. Es el menos frecuente entre los cánceres de piel pero es el que presenta la mayor tasa de mortalidad (75 %), en gran medida debido a su elevado potencial metastásico (Narayanan et al, 2010; Shenenberger, 2012; Hawryluk and Tsao, 2014). La radiación ultravioleta es un factor de riesgo, que causa daños en el ADN y mutaciones genéticas que favorecen la aparición y el desarrollo del tumor (Narayanan et al, 2010; Chang et al, 2014). El melanoma ocupa el quinto lugar entre los tipos más comunes de cáncer diagnosticados en hombres, en EE.UU, y el séptimo lugar en mujeres (Siegel et al., 2014). A partir de los 60 años, los hombres tienen prácticamente el doble de probabilidades de presentar melanoma que las mujeres del mismo grupo etario (Siegel et al., 2014).

2.2. Estadificación clínica de la enfermedad

El melanoma puede dividirse clínicamente en cinco estadios (Balch et al. 2009). En el estadio cero (o melanoma *in situ*), se observan melanocitos anormales confinados en la epidermis. En el estadio 1 se detecta una neoplasia sin evidencias de diseminación del cáncer hacia los ganglios linfáticos o sitios distantes. Se divide en dos subclases: 1A y 1B. En el estadio 1A el tumor no mide más de 1 mm de espesor (índice de Breslow) y no presenta ulceración. Se detecta menos de una mitosis por mm². En el estadio 1B el tumor no mide más de 1 mm de espesor y presenta ulceración; o mide más de 1 mm, pero no más de 2 mm y no presenta ulceración. Se detecta una o más mitosis por mm². En el estadio 2 tampoco hay evidencias de diseminación a ganglios linfáticos o sitios distantes, y se divide en las subclases 2A, 2B y 2C. En el estadio 2A el tumor mide más de 1, pero no más de 2 mm de espesor y presenta ulceración; o mide más 2 mm, pero no más de 4 mm y no presenta ulceración. En el estadio 2B el tumor mide más de 2 mm, pero no más de 4 mm y presenta ulceración; o mide más de 4 mm y no está ulcerado. En el estadio 2C el tumor tiene más de 4 mm de espesor y está ulcerado. En el estadio 3 el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos regionales pero no hay evidencias de metástasis a distancia. Puede tener cualquier espesor y estar o no ulcerado. En el estadio 4 el cáncer metastatózizó en otros órganos del cuerpo, tales como pulmón, hígado, cerebro, hueso, tejido blando o tracto gastrointestinal, o incluso en sitios de la piel alejados del tumor primario (Balch et al. 2009).

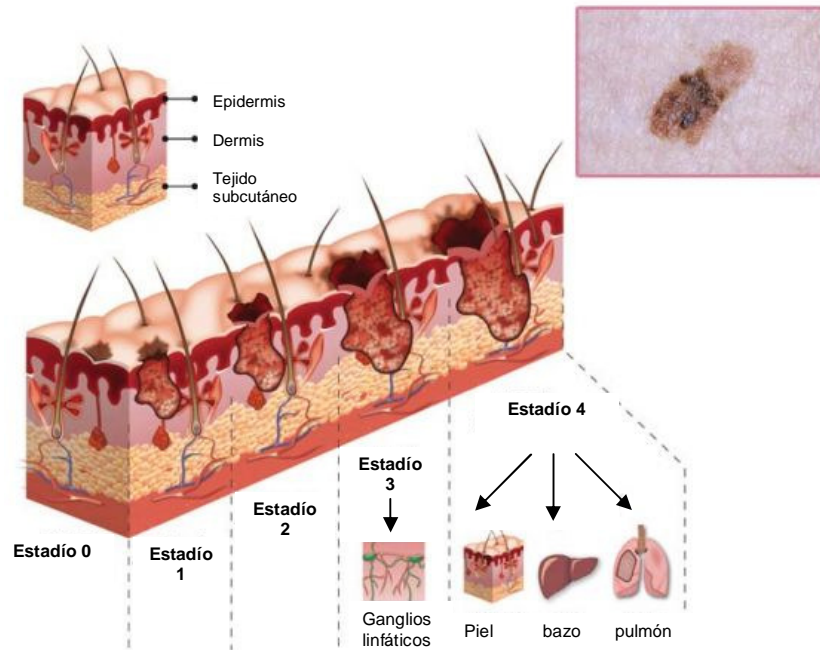


Figura 2: Etapas en el desarrollo de un melanoma cutáneo. Basado en la estadificación de la enfermedad propuesta por Balch et al. 2009.

2.3. Tratamientos actuales contra el melanoma

La supervivencia de pacientes con melanoma está directamente relacionada con la detección temprana. El tratamiento adecuado depende de las características del tumor y del estadio en el cual fue diagnosticado. Si se detecta de forma temprana el tumor se extirpa quirúrgicamente y es altamente curable. Se sugiere un margen de 5 mm de escisión en los casos de melanoma *in situ* (Rigel and Carucci, 2000; Erikson and Miller, 2010). En los casos en que el tumor tenga menos de 1 mm de espesor se recomienda extirpar un margen de 1 cm de tejido circundante. No se aconseja extirpar ganglios linfáticos y se considera posible realizar una terapia adyuvante sólo en los casos de alto riesgo (Rigel and Carucci, 2000). En los casos en que el tumor tenga entre 1 y 4 mm de espesor se recomienda extirpar un margen de 2 a 3 cm de tejido circundante. En este caso se recomienda realizar una biopsia del ganglio centinela, y si esta resulta positiva, una disección completa de los ganglios linfáticos regionales. Se aconseja una terapia adyuvante (Rigel and Carucci, 2000). En los casos en que el tumor tenga más de 4 mm de espesor se recomienda extirpar un margen de 2 a 3 cm de tejido circundante y realizar una disección de los ganglios linfáticos, si es clínicamente posible. En estos casos se aconseja una terapia adyuvante. La

radioterapia es usada con menos frecuencia, pero puede ser útil si la cirugía está contraindicada (Rigel and Carucci, 2000; Erikson and Miller, 2010).

El melanoma ha sido considerado, desde hace ya varios años, un blanco prometedor de terapias inmunoterapéuticas. En 1995, la administración de medicamentos y alimentos (FDA) aprobó el uso de interferón **(IFN)-α2b** para el tratamiento de melanoma en estadíos 2B y 3, y en 1998 aprobó el uso de interleuquina **(IL)-2** para el tratamiento de melanoma avanzado (Rigel and Carucci, 2000).

En el año 2011 la FDA aprobó tres fármacos con capacidad de prolongar la supervivencia de pacientes: **ipilimumab** (Yervoy™), un anticuerpo monoclonal (mAb) que bloquea el antígeno 4 asociado a linfocitos T (LTs) citotóxicos (CTLA-4); **vemurafenib** (Zelboraf®), una droga cuyo blanco es la proteína mutada del gen BRAF en la posición 600 (V600E), la cual se encuentra en aproximadamente el 50 % de los melanomas; y **peginterferon alfa-2b** (Amaria et al., 2011; Di Trollo et al., 2012; Acharya and Jeter, 2013; <http://www.fda.gov>). En el año 2013 la FDA aprobó un fármaco constituido por la combinación de dos drogas para tratar melanoma en estadio avanzado: mekinist (**trametinib**), un inhibidor selectivo de MEK, en combinación con tafinlar (**dabrafenib**), un inhibidor selectivo de BRAF (Paraiso et al., 2010; Flaherty et al., 2012; <http://www.fda.gov>). En el transcurso del año 2014, aprobó el uso de **pembrolizumab**, y recientemente en diciembre de 2014, el uso de opdivo (**nivolumab**), una droga que inhibe al receptor-1 de muerte programada (PD-1) y está indicada para tratar pacientes con melanoma no resecable o avanzado, que no han respondido previamente a otras drogas (Robert et al., 2014; Robert et al., 2015; <http://www.fda.gov>).

Actualmente, una gran cantidad de ensayos clínicos están en curso, entre ellos varios en fase clínica III, cuyo enfoque inmunoterapéutico se muestra prometedor (<http://clinicaltrials.gov>).

Sección 3. Respuesta Inmune y Cáncer

La respuesta inmune anti-tumoral, tanto en pacientes como en modelos murinos suele ser insuficiente para erradicar la enfermedad. Si bien los procesos de inflamación e inmunovigilancia cooperan para eliminar al tumor, las células transformadas han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune, que consisten principalmente en alterar la expresión de ciertos antígenos de superficie, generar resistencia a los mecanismos de apoptosis y necrosis, alterar el balance de células de la inmunidad innata y adaptativa en el microambiente tumoral (TME), y generar metástasis (Corona et al., 1996; Narayanan et al., 2010; Erickson and Miller;

2010; Paraiso et al., 2010; Visvader, 2011; Amaria et al., 2011; Hanahan and Weinberg, 2011; Siegel et al., 2012; Flaherty et al., 2012; Burrell et al., 2013; Gallois and Bhardwaj; 2013; Acharya and Jeter; 2013; Burkholder et al., 2014).

3.1. Cambios en los antígenos asociados al tumor

El cese o disminución en la expresión de antígenos asociados al tumor (TAAs), es un proceso de selección natural a través del cual los subclones que no son reconocidos, pueden sobrevivir frente a una presión inmunológica. El reconocimiento de TAAs por LTs, es crítico en el proceso de inmunoección. La pérdida de expresión de antígenos tumorales o de presentación antigénica en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I (MHC I), es necesaria y suficiente para que ocurra el proceso de inmunoección (DuPage et al., 2012; Vesely and Schreiber; 2013). Asimismo, la insensibilidad al IFN- γ en los mecanismos de presentación antigénica, representa otra estrategia empleada por las células tumorales para evadir la respuesta inmune (Dunn et al., 2005).

3.2. Resistencia de las células tumorales a los mecanismos de apoptosis y necrosis

El proceso de apoptosis es importante para prevenir la supervivencia y proliferación de células que posean mutaciones en oncogenes. El bloqueo de este proceso, mediante el incremento de proteínas anti-apoptóticas o la pérdida / mutación de los receptores de muerte expresados en la superficie del tumor, tales como el ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (TRAIL) o FAS, facilita el desarrollo del tumor (Mahidhara, 2005; Ozören and El-Deiry; 2003; Okada and Mak, 2004; Gerl and Vaux, 2005).

3.3. Inmunosupresión mediada por el tumor

La inmunidad innata y adaptativa mediada por LTs, representa el blanco primario de la inmunosupresión inducida por el tumor (Burkholder et al., 2014).

El IFN- γ induce la degradación de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) en una variedad de células, incluyendo macrófagos, células dendríticas (CD) y células tumorales. El catabolismo del aminoácido triptofano en cáncer es considerado un importante factor capaz de suprimir la respuesta inmune. Las células de diferentes tumores, incluyendo próstata, colon y recto, páncreas, cérvix, endometrio, estómago,

pulmón, ovario, vejiga, esófago y piel, entre otros, pueden incrementar la expresión de IDO, lo cual genera la depleción de triptofano y su conversión en quinureninas. Este producto inhibe la activación de LTs e induce apoptosis (Fallarino et al., 2002; Mullera et al., 2008; Sucher et al., 2010; Platten et al., 2012).

Por otro lado, la secreción de galectinas, tales como galectina-1 (Gal-1), pueden impedir la actividad y supervivencia de los LTs y estimular la angiogénesis, por lo cual juega un rol fundamental en la promoción del escape tumoral (Rubinstein et al., 2004).

Los tumores también pueden inhibir directamente al sistema inmune, mediante la expresión de ciertas moléculas sobre su superficie celular, tales como los antígenos leucocitarios humanos (HLA)-G y HLA-E, y los ligandos del receptor-1 de muerte programada (PD-L)1 y PD-L2. La interacción entre PD-1 y sus ligandos es una de las estrategias más importantes que emplean los tumores para escapar del proceso de inmunovigilancia. Esta interacción inhibe la proliferación de LTs, induce una disminución en la producción de citoquinas, anergia y/o apoptosis. Por esta razón, PD-1 se ha transformado en blanco de la inmunoterapia contra el cáncer (Flemming, 2014; Burkholder et al., 2014; Robert et al., 2014; Robert et al., 2015). En este sentido, la vacuna basada en *Listeria monocytogenes* (*Lm*), que secreta antígenos fusionados a un fragmento de listeriolisina O (LLO), vacuna (*Lm*-LLO), ha demostrado ser terapéuticamente efectiva en varios modelos murinos de cáncer, debido a su habilidad para inducir una respuesta inmune potente y específica. Sin embargo, la infección con *Lm* también induce un aumento de PD-L1 en las células inmunes. El tratamiento combinado de la vacuna *Lm*-LLO y un anticuerpo anti-PD-1, incrementó su eficacia inmune y terapéutica (Mkrtichyan et al., 2013).

Por otro lado, las células tumorales pueden secretar citoquinas que poseen un efecto inmunosupresor directo sobre el sistema inmune, incluyendo el factor de crecimiento transformante (TGF)- β y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Katz et al., 2013; Liying et al., 2013).

3.4. Poblaciones del sistema inmune esenciales en la inmunosupresión generada por el tumor

Las células tumorales instruyen poblaciones de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs), células endoteliales y diferentes tipos de células del sistema inmune, para suprimir colectivamente la respuesta anti-tumoral, mientras mantienen suficiente potencial inflamatorio y angiogénico en el TME como para promover el crecimiento y progresión del tumor (Burkholder et al., 2014; Kim et al., 2005; Ryungsa et al., 2006).

Las células del sistema inmune que inducen progresión tumoral, incluyen macrófagos y neutrófilos de tipo 2 (M2 y N2 respectivamente), LTs CD4⁺, LTs regulatorios (LTs Regs), linfocitos B (LBs) activados, y células supresoras derivadas mieloides (MDSCs) (Kim et al., 2005; Ryungsa et al., 2006; Burkholder et al., 2014).

3.4.1. Balance T *helper* 1 / T *helper* 2 (Th1 / Th2)

Las poblaciones de células Th1 y Th2 derivan de LTs CD4⁺ *naïve*. Si éstos son expuestos a IL-12 tienden a diferenciarse en células Th1; por el contrario, si son expuestos a IL-4 e IL-13 se diferencian a células Th2. Una respuesta inmune mediada por células Th1 está inducida normalmente por infecciones microbianas, y las citoquinas que se liberan son aquellas típicamente asociadas a la función citotóxica: factor de necrosis tumoral (TNF)- α , IFN- γ , IL-2 e IL-12. Éstas incrementan la capacidad citotóxica de los macrófagos M1, LTs citotóxicos (CTLs), células asesinas naturales (NK), y células T asesinas naturales (NK-T). Por el contrario, una respuesta inmune mediada por células Th2 se asocia con asma, alergia e infecciones con helmintos, y las citoquinas que se liberan incluyen elevados niveles de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (Mosmann and Coffman, 1989; Constant and Bottomly, 1997; Burkholder et al., 2014).

En cáncer todas estas señales trabajan en conjunto, no sólo para suprimir la maduración de las células Th1 y promover las de tipo Th2, sino también para inhibir la citotoxicidad mediada por LTs, promover una respuesta inmune humoral mediada por LBs, e instruir macrófagos asociados al tumor (TAMs) (Xu et al, 2011; De Monte et al., 2011; Protti and De Monte, 2012).

3.4.2. Balance de macrófagos M1 / M2

Los macrófagos son un componente esencial de la inmunidad innata y juegan un rol central en la inmunidad adaptativa contra patógenos, y en la homeostasis del tejido (Burkholder, 2014).

Las células del linaje monocitos-macrófagos están caracterizadas por su considerable diversidad y plasticidad. En los tejidos, los fagocitos mononucleares responden al ambiente (productos microbianos, células dañadas, linfocitos activados, etc.), con la adquisición de distintos fenotipos funcionales. Los macrófagos pueden adquirir una activación clásica o M1, en respuesta al estímulo con IFN- γ , o una activación alternativa o M2, en respuesta al estímulo con IL-4 / IL-13 (Martinez et al.,

2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012; Martinez and Gordon, 2014).

El fenotipo M1 está caracterizado por la expresión de elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras, tales como IL-12, IL-23, TNF- α , sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y MHC I / II, la elevada producción de especies reactivas de nitrógeno (RNS) y oxígeno (ROS), la inducción de una respuesta Th1, y una potente actividad microbicida y tumoricida. En contraste, los macrófagos M2 están caracterizados por la expresión de una variedad de moléculas anti-inflamatorias, tales como IL-10, TGF- β , y arginasa-1. Están involucrados en la inmunidad contra parásitos, remodelación del tejido, progresión tumoral y funciones inmunoregulatorias. Poseen una eficiente capacidad fagocítica, expresan receptores de manosa y galactosa, y producen ornitina y urea a través de la actividad de la enzima arginasa-1 (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012; Martinez and Gordon, 2014). La ornitina es un precursor de L-prolina, la cual se halla involucrada en la síntesis de colágeno; y de poliaminas, involucradas en la proliferación celular (Hao et al., 2012; Durante, 2013).

Los macrófagos M1 y M2 representan extremos de un continuo y la polarización del fenotipo M1 / M2 puede ser revertida, tanto *in vitro* como *in vivo* (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012; Martinez and Gordon, 2014).

En la mayoría de los tumores, tanto en humanos como en modelos murinos, se considera que los macrófagos infiltrados en los últimos estadios de la enfermedad poseen un fenotipo M2, comúnmente llamados TAMs. Estos macrófagos generan un microambiente inmunosupresivo, a la vez que secretan una variedad de citoquinas, quimioquinas y proteasas que promueven el crecimiento, angiogénesis y metástasis del tumor, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF), VEGF y la enzima ciclooxigenasa-2 (COX2). Los TAMs son atraídos al microambiente por el factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF), el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), producidos por las propias células tumorales, los CAFs u otras células asociadas al mismo (Gazzaniga et al, 2007; Martinez et al., 2008; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012).

La infiltración de TAMs en el tumor está asociada a un mal pronóstico en diferentes tipos de cáncer (Steidl et al., 2010; Chen et al., 2011).

3.4.3. Neutrófilos: balance N1 / N2 y su rol en cáncer

Los neutrófilos han sido considerados, por mucho tiempo, sólo como células efectoras de vida corta de la inmunidad innata, con un rol primario en la resistencia contra patógenos extracelulares e inflamación aguda. Están caracterizados por su habilidad para fagocitar, liberar enzimas líticas de sus gránulos y producir ROS con potencial antimicrobiano (Nathan, 2006; Houghton, 2010; Borregaard, 2010).

Sin embargo, en la década del 90' este concepto limitado fue desafiado al demostrarse que los neutrófilos pueden sobrevivir mucho más tiempo (Colotta et al., 1992; Kozo et al., 2002; Costantini et al., 2010), y tanto sea espontáneamente como luego de una estimulación adecuada, pueden producir numerosas citoquinas, quimioquinas y factores angiogénicos. Estos incluyen, ligandos de quimioquinas motivo C-X-C: (CXCL)-1, CXCL-2, CXCL-3, CXCL-4, CXCL-5, CXCL-6, CXCL-7, CXCL-8, CXCL-9, CXCL-10, CXCL-11; ligandos de quimioquinas motivo C-C: (CCL)-2, CCL-3, CCL-4, CCL-17, CCL-18, CCL-19, CCL-20, CCL-21, CCL-22; citoquinas pro-inflamatorias: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-9, IL16, IL-17A, IL-17F, IL-18, factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF); citoquinas anti-inflamatorias: IL-1RA, IL-4, IL-10, TGF- β 1, TGF- β 2; citoquinas inmunoregulatorias: IFN- α , IFN- γ , IL-12, IL-23; factores estimuladores de colonias: de granulocitos (G-CSF), de macrófagos (M-CSF), de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-3, factor de células madre (SCF); factores angiogénicos y fibrogénicos: factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina (HB-EGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2), TGF- α , VEGF, proquinetina 2; y miembros de la superfamilia TNF: ligando inductor de apoptosis (APRIL), factor activador de LBs (BAFF), CD30L, CD95L, LIGHT, linfotóxina (LT)- β , ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) y TRAIL (Mantovani et al., 2011; Dumitru et al., 2013; Tecchio et al., 2013). Sin embargo, existen diferencias entre los neutrófilos humanos y murinos en cuanto a su capacidad para expresar citoquinas (Cassatella, 1999; Ethuin et al., 2004; Pelletier^a et al., 2010; Pelletier^b et al., 2010).

Los neutrófilos poseen la capacidad de establecer interacciones con otras células del sistema inmune, incluyendo macrófagos, CD, células NK, LBs, LTs y células madre mesenquimales. Además, pueden migrar hacia los ganglios linfáticos de una manera dependiente del receptor de quimioquinas motivo C-C (CCR)7, o a través de la circulación sanguínea (Ellis and Beaman, 2004; Kumar and Sharma, 2010; Mantovani, 2011; Abi Abdallah et al., 2011).

En los ganglios linfáticos, los neutrófilos pueden interactuar con las CD para modular la presentación antigénica (Bennouna et al., 2003; van Gisbergen^a et al.,

2005; Ludwig et al., 2006), e interferir en la habilidad de las CD y macrófagos para presentar antígenos, aparentemente compitiendo por el antígeno disponible (Yang et al., 2010). Los neutrófilos también pueden interactuar con LTs *naïve* CD8⁺ en los ganglios drenantes (Beauvillain et al., 2007). Por lo tanto, estas células se consideran un componente clave en los circuitos regulatorios y efectores de la inmunidad innata y adaptativa (Nathan, 2006).

En contraste con los bien caracterizados TAMs, la significancia de los granulocitos en cáncer recién está emergiendo. En pacientes con diferentes tipos de cáncer, se ha observado un incremento en el número de neutrófilos, tanto en sangre periférica como en el tejido tumoral. Estos estudios relacionaron la presencia de neutrófilos con un mal pronóstico, lo cual sugiere que podrían tener un efecto pro-tumoral. Además, una serie de estudios funcionales realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, demostraron que los neutrófilos asociados al tumor (TANs) promueven angiogénesis, inmunosupresión, migración, invasión y metástasis (Dumitru et al., 2013). El reclutamiento de estas células en los tumores, se debería a la presencia de las quimioquinas CXC, que producen las células tumorales y los TAMs (Tecchio et al., 2013; Jamieson et al., 2012; Dumitru et al., 2013).

Si bien los neutrófilos pueden adquirir un fenotipo pro-tumoral o N2, en respuesta a TGF- β , caracterizado por una elevada expresión de arginasa-1, la inhibición de esta molécula promueve la reprogramación de los neutrófilos hacia un fenotipo N1, caracterizado por una gran actividad citotóxica, elevada capacidad para producir peróxido de hidrógeno, elevada expresión de TNF y moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM1); y una menor expresión de arginasa-1. En presencia de neutrófilos N1, se produce un incremento en la activación de LTs CD8⁺, lo cual resulta en una actividad anti-tumoral efectiva (Fridlender et al., 2009; Dumitru et al., 2013).

Por todo lo expuesto, los TANs podrían jugar un rol importante en la inmunomodulación del cáncer.

3.4.4. Células mieloides inmaduras: MDSCs

Las MDSCs son un grupo heterogéneo de células que poseen un fenotipo inmaduro. En ratón, comparten la expresión de los antígenos de superficie Gr-1 (Ly6C y Ly6G) y CD11b, (Gr-1⁺ CD11b⁺). El equivalente humano de las MDSCs expresa linaje negativo (Lin⁻), CD14⁻, HLA-DR⁻, CD15⁺, CD34⁺, CD11b⁺, CD33⁺ y CD13⁺ (Bronte et al., 1998; Bronte et al., 2000; Talmadge, 2007).

Las MDSCs poseen la capacidad de inhibir la proliferación de LTs CD4⁺ y CD8⁺, bloquear la activación de las células NK y polarizar la maduración de los LTs

hacia un fenotipo pro-tumoral Th2 (Seung et al., 1995; Bronte et al., 1998; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Weiss et al., 2014). La proliferación de las MDSCs se relacionaría de forma inversa con los niveles de CD maduras en el tumor, y poseen un rol clave en el balance de macrófagos M1 / M2. En presencia de IL-10, el contacto directo entre las MDSCs y los macrófagos M1, provoca una disminución en la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) e IL-12, lo cual afecta directamente la capacidad presentadora de antígenos de los macrófagos y las CD, deteriorando así el mecanismo de inmunovigilancia (Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Ostrand-Rosenberg et al., 2012).

Las MDSCs también pueden inhibir las funciones citotóxicas de las células NK, LBs y LTs, mediante la expresión de arginasa-1 e iNOS. La enzima arginasa-1 metaboliza el aminoácido L-arginina, el cual es crítico en la activación de los LTs; además de ser el precursor de la producción de óxido nítrico (ON). Cuando la actividad de iNOS es elevada, y los niveles de L-arginina son bajos, en lugar de producir ON, comienzan a producir ROS y especies reactivas de óxido nítrico (RNOS). Esto resulta en inflamación, anergia de LTs y daño carcinogénico en el ADN (Talmadge, 2007; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Bronte, 2009; Gallois and Bhardwaj, 2013). La actividad combinada de arginasa-1 e iNOS en las MDSCs infiltradas en un tumor, induce inmunosupresión de LTs. Por lo cual, la coexpresión de ambas enzimas provee un marcador molecular de MDSCs inmunosupresoras (Talmadge, 2007). Algunos autores, sostienen que estas células promueven el desarrollo tumoral incrementando la angiogénesis, a la vez que inhiben la inmunidad anti-tumoral mediada por LTs. Las MDSCs disminuyen significativamente la expresión de IFN- γ en los tejidos tumorales, lo cual sugiere que juegan un rol determinante en la inmunosupresión (Burkholder et al., 2014). Además, pueden inducir la proliferación de LTs Regs dependiente de TGF- β e IL-10 (Ghiringhelli et al., 2005; Huang et al., 2006).

Elevados niveles de MDSCs en el TME y sangre periférica, han sido correlacionados con un mal pronóstico y un tiempo medio de vida corto en varios tipos de cáncer (Srivastava et al., 2012; Markowitz et al., 2013; Kiessling et al., 2014).

3.4.5. LTs *helper* regulatorios: LTs Regs

Los LTs Regs, juegan un rol importante en la prevención de la respuesta inmune contra antígenos propios. Sin embargo, es común encontrar poblaciones de LTs Regs, tanto en sangre periférica como en el TME de pacientes con cáncer metastásico e invasivo, donde favorecen un ambiente supresor e inhiben la respuesta inmune anti-tumoral (Sakaguchi, 2004; Oleinika et al., 2012).

Los LTs Regs se identifican por expresar en su superficie celular los antígenos CD4, CD25 y FOXP3 (CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺), y normalmente se hallan en tejidos linfoides. Asociados a tumores se relacionan con un mal pronóstico (Curiel et al., 2004; Bates et al., 2006; Petersen et al., 2006; Hiraoka et al., 2006; Gao et al., 2007; Griffiths et al., 2007; Perrone et al., 2008; Jordanova et al., 2008; Jensen et al., 2009;).

Los LTs Regs expresan receptores inhibitorios: CTLA-4, PD-1 e inmunoglobulina de células T y de mucina 3 (Tim-3), que contribuyen a su función supresora a través de diferentes mecanismos (Tai et al., 2012). A través de CTLA-4 pueden inducir una disminución en la expresión de las moléculas CD80 y CD86 sobre las CD (Oderup et al., 2006). Además, compiten con otras células del sistema inmune por IL-2, mediante la expresión de su receptor CD25 con una afinidad 100 veces mayor (Anthony and Restito; 2005).

La interacción entre el receptor CD40 expresado en las MDSCs y su ligando CD40L, expresado en los LTs Regs, en presencia de TGF- β e IL-10, sería necesaria para inducir la expansión de estos linfocitos (Pan et al., 2010). Asimismo, el IFN- γ induce en las MDSCs, un incremento en la expresión de CD40, IL-10 y TGF- β , lo cual a su vez inhibe a las poblaciones de células anti-tumorales efectoras (Huang et al., 2006; Pan et al., 2010).

3.4.6. LB regulatorios: LBs Regs

Los LB son los responsables de la liberación de anticuerpos asociados con la respuesta inmune humoral.

La inhibición de la presentación antigénica asociada a los LBs Regs es crucial en la inmunomodulación del cáncer, tal como quedó demostrado a partir de la paradójica observación de que la presencia de auto-anticuerpos en el suero o en el TME, se correlaciona con una baja supervivencia en los pacientes (DeNardo et al., 2007).

Los inmunomoduladores APRIL y BAFF, posiblemente secretados por neutrófilos N2, han sido detectados en carcinomas de mama y otros tumores (Biragyn and Longo, 2010; Tecchio et al., 2013). Estas citoquinas contribuirían manteniendo LBs pro-tumorales en el TME, que a su vez secretarían IL-6 e IL-10, induciendo la polarización de los macrófagos hacia un fenotipo M2 y previniendo la maduración de las CD (DeNardo et al., 2007; Biragyn and Longo, 2012).

Por todo esto, el papel de los LBs Regs en la respuesta inmune anti-tumoral no debería desestimarse.

3.4.7. IL-17 e IL-23. Respuesta inmune mediada por células Th17

Las células Th17 representan el cuarto fenotipo de células T *helper*, son diferentes de las Th1 y Th2 aunque todas provienen del mismo progenitor T inmaduro. La diferenciación de las células Th17 es inducida por TGF- β , IL-6, IL-1 α , IL-1 β e IL-23; y se caracterizan por producir IL-17, IL-2, GM-CSF, IFN- γ , y TNF- α (Zou and Restifo; 2010).

El rol de las células Th17 en asociación con IL-17 e IL-23 en la biología del tumor, no está aún del todo claro y según ciertos autores podrían comportarse tanto como supresoras (DeNardo et al., 2010; Gnerlich et al., 2010; Terhune et al., 2013), como promotoras del tumor (DeNardo et al., 2010), dependiendo del contexto en el que se encuentren. La IL-17 y las células de la respuesta Th17 se hallan implicadas en la resistencia tumoral frente a ciertas terapias anti-angiogénicas, debido a que inducen en los CAFs un incremento en la expresión del factor estimulador de colonias (CSF), el cual se halla asociado al reclutamiento y expansión de MDSCs (Chung et al., 2013). Asimismo, la IL-17 y demás citoquinas secretadas por las células Th17, inducen mediadores que promueven la granulopoyesis y consecuentemente la acumulación y proliferación de neutrófilos, con posibles implicancias en la inmunoección del cáncer (Cua and Tato, 2010; Pelletier^b et al., 2010).

3.4.8. Células dendríticas

En el año 2011 Ralph Steinman fue galardonado con el Premio Nobel en Medicina, por el descubrimiento de las CD y su rol en la inmunidad adaptativa (Steinman and Cohn, 1973). Las CD son las células presentadoras de antígenos (APCs) más potentes del sistema inmune, capaces de activar los mecanismos de la inmunidad adaptativa mediante su habilidad para muestrear el ambiente, y capturar y presentar antígenos a LTs (Banchereau and Steinman, 1998).

Las CD inmaduras (iCD) se caracterizan por expresar moléculas de MHC II, principalmente en el compartimento endosomal tardío; un nivel reducido de moléculas co-estimuladoras, tales como CD40, CD80, CD86 y ligando OX40 (OX40L); y un conjunto particular de receptores de citoquinas (Palucka and Banchereau, 2012). En ausencia de un estímulo adecuado de maduración, las iCD presentan antígenos a LTs en el contexto de señales inhibitorias, promoviendo por lo tanto, tolerancia periférica (Steinman et al., 2003; Watkins and Hurwitz, 2012; Idoyaga et al., 2013). Por el contrario, las CD maduras (mCD) poseen una limitada habilidad para capturar antígenos pero expresan niveles elevados de moléculas de MHC II sobre su superficie

celular; adquieren la capacidad de migrar hacia los ganglios linfáticos debido a la expresión de receptores de quimioquinas específicos, tales como CCR7, y secretan grandes cantidades de citoquinas / quimioquinas (Palucka and Banchereau, 2012; Merad et al., 2013). Por lo tanto, las mCD son altamente eficientes en la activación de una respuesta inmune adaptativa, mucho más que cualquier otra APC profesional, incluyendo LBs y macrófagos (Steinman, 2012).

Las CD son las únicas APCs capaces de presentar antígenos extracelulares a LTs CD8⁺ en el contexto del MHC I, un proceso conocido como presentación cruzada que es crucial en la inmunidad anti-tumoral (Gallois and Bhardwaj, 2013).

Las CD se clasifican en varios subtipos distintos, en función del fenotipo y la morfología de las células (Ueno et al., 2007; Ueno ^a et al., 2010; Ueno ^b et al., 2010; Satpathy et al., 2012; Palucka and Banchereau ^a, 2013; Klechevsky and Banchereau, 2013; Heath and Carbone, 2013). Los dos subtipos principales incluyen a las CD mieloides (también conocidas como clásicas o convencionales), y CD plasmocitoides. Las CD mieloides murinas son altamente eficientes en presentar antígenos de forma cruzada (Bachem et al., 2010; Crozat et al., 2010; Jongbloed et al., 2010; Poulin et al., 2010; Joffre et al., 2012), y serían requeridas *in vivo* para alcanzar una respuesta inmune óptima contra antígenos extraños, y posiblemente también contra aquellos asociados a tumores (Shortman and Heath, 2010).

Las CD mieloides se diferencian a partir de precursores mieloides, expresan el antígeno CD11c e incluyen a las CD dérmicas, células de Langerhans, CD intersticiales y CD interdigitantes. Las CD mieloides se encuentran en tejidos periféricos, órganos linfoides y sangre, y se caracterizan por secretar grandes cantidades de IL-12 frente a un estímulo antigénico. Esta citoquina media el incremento en la actividad citotóxica de las células NK y LTs CD8⁺, está involucrada en la diferenciación de LTs naïve en células Th1, y estimula la producción de IFN- γ y TNF- α por parte de LTs y células NK (Gallois and Bhardwaj, 2013).

Las CD plasmocitoides se caracterizan por producir elevados niveles de IFN- γ luego de una infección viral, generando así una fuerte respuesta inmune de tipo Th1 (Siegal et al., 1999; Cella et al., 2000; Gilliet et al., 2002). En condiciones basales, se encuentran en sangre y órganos linfoides, tales como el timo, médula ósea (MO), bazo, amígdalas y en los ganglios linfáticos. Las CD plasmocitoides también se encuentran en varios tipos de cáncer, pero su rol en la respuesta inmune anti-tumoral no está del todo claro, y existen evidencias de que podrían tener un comportamiento pro-tumoral (Le Mercier et al., 2013). Varios estudios sugieren que defectos numéricos y / o funcionales en cuanto a subtipos específicos de CD en el tejido, facilitarían la oncogénesis, progresión tumoral y quimioresistencia (Taieb et al., 2006; Chaput et al.,

2008; Tomihara et al., 2010; Michaud et al., 2011; Noessner et al., 2012; Scarlett et al., 2012; Senovilla et al., 2012; Kroemer et al., 2013; Ma et al., 2013; Sisirak et al., 2013). Niveles elevados de CD mieloides dentro del tumor se asocian con un mejor pronóstico clínico (Galluzzi et al., 2012; Reichert et al., 2001; Ikeguchi et al., 1998; Ishigami et al., 2003; Kakeji et al., 1993; Ishigami et al., 1998; Okuyama et al., 1998; Ishigami et al., 2000; Saito et al., 2007; Daud et al., 2008; Cai et al., 2006; Yin et al., 2003; Nakakubo et al., 2003; Honig et al., 2005; Chang et al., 2007; Furihata et al., 1993; Iwamoto et al., 2003; Dieu-Nosjean et al., 2008; Sautes-Fridman et al., 2011; Ladanyi et al., 2007; Kobayashi et al., 2007; Miyagawa et al., 2004; Cai et al., 2006; Coventry and Morton, 2003; Kohrt et al., 2005). Sin embargo, la acumulación de CD tolerogénicas dentro de lesiones neoplásicas, incluyendo CD mieloides CD208⁺ y CD plasmocitoides CD123⁺, constituye un factor de mal pronóstico clínico (Treilleux et al., 2004; Sandel et al., 2005; Ishigami et al., 2010; Galluzzi et al., 2012; Jensen et al., 2012; Labidi-Galy et al., 2012; Conrad and Gilliet, 2013). Aparentemente, en los estadios iniciales de la progresión de un tumor las CD son inmunocompetentes y capaces de inducir la expansión de una respuesta específica mediada por LTs, sin embargo en tumores avanzados las CD se vuelven inmunosupresoras (Scarlett et al., 2012).

Ciertos factores derivados de los tumores, tales como IDO, triptofano 2,3-dioxigenasa (TDO), CCL-2, VEGF, TGF- β , M-CSF, GM-CSF, IL-6 e IL-10, poseen un impacto negativo sobre las CD (Gallois and Bhardwaj, 2013). TGF- β induce la acumulación de LTs Regs, MDSCs y macrófagos M2 (Massague, 2008). IL-6 y M-CSF estimulan la diferenciación de monocitos a macrófagos, en lugar de hacerlo a CD (Chomarat et al., 2000). IL-10 convierte CD inmunoestimuladoras en tolerogénicas e induce anergia de LTs citotóxicos CD8⁺ (Steinbrink et al., 1999). La inhibición de la vía de las MAPK en el melanoma humano portador de la mutación BRAF V600E, reduce la producción de citoquinas inmunosupresoras, tales como IL-6, IL-10 y VEGF, y restituye la producción de IL-12 y TNF- α por parte de las CDs (Sumimoto et al, 2006; Gallois and Bhardwaj; 2013; Ott et al, 2013). El transductor de señal y activador de la transcripción 3 (Stat-3), es otro factor de transcripción que regula la expresión de citoquinas inmunosupresoras (Kawakami, 2013).

Por otro lado, CCL2 recluta monocitos inflamatorios que expresan su receptor CCR2, como así también TAMs, promoviendo la malignidad (Qian et al., 2011). El VEGF estaría involucrado en varios mecanismos de la fisiopatología del tumor, incluyendo la inhibición de la diferenciación de las CD (Gabrilovich et al., 1998).

En cuanto a la enzima IDO, sería empleada por las CD tanto convencionales como plasmocitoides, para estimular la activación de LTs Regs (Munn et al., 2002; Manches et al., 2008).

La metaloproteinasa 2 (MMP-2) puede expresarse en células tumorales y/o estromales y está asociada a estadíos tardíos en la progresión del cáncer, por lo cual representa un factor de mal pronóstico clínico (Egeblad and Werb, 2002; Kessenbrock et al., 2010). MMP-2 actúa como ligando directo del receptor de tipo *toll* (TLR)-2 expresado por las CD, induciendo la sobreexpresión de OX40L y la polarización hacia una respuesta Th2 (Godefroy et al., 2012).

Otra molécula involucrada en la supresión tumoral mediada por CD es la prostaglandina E2 (PGE2), el producto del gen ciclooxigenasa-2 (COX2), la cual induce proliferación de células Th2 y junto a la expresión de citoquinas asociadas a este tipo de respuesta, limita la producción de IFN- γ y produce un efecto opuesto al de la señalización mediada por IL-12 (Wu et al., 1998).

Sección 4. Inmunoterapia del cáncer basada en células dendríticas

La vacunación representa uno de los métodos más efectivos para prevenir enfermedades. Mientras las vacunas preventivas están diseñadas para bloquear la diseminación de una enfermedad, las vacunas terapéuticas están diseñadas para eliminar su causa (Palucka and Banchereau ^b, 2013). Debido a que las CD son consideradas las células presentadoras de antígenos más potentes del sistema inmune (Banchereau and Steinman, 1998), comúnmente son empleadas en el diseño de vacunas terapéuticas anti-tumorales.

Varios estudios han demostrado que las vacunas basadas en CD, son capaces de inducir una respuesta inmune antitumoral basada en la activación y proliferación de LTs CD4⁺ y CD8⁺ (Porgador et al., 1996; Schuler and Steinman, 1997). En la última década, ha habido un enorme progreso en el aprendizaje de la biología de las CD y como consecuencia, un incremento en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. Sin embargo, la respuesta inmune antitumoral comúnmente se halla deteriorada en pacientes con cáncer y la supresión o modulación de la funcionalidad de las CD que ejerce el TME, juega un rol determinante en la falta de una potente respuesta inmune anti-tumoral a largo plazo (Gallois and Bhardwaj, 2013; Palucka and Banchereau ^b, 2013). Este limitado éxito podría también explicarse en función de las condiciones subóptimas empleadas para generar potentes CD inmunoestimuladoras (Gallois and Bhardwaj, 2013; Goyne and Cannon, 2013). Los ensayos clínicos han demostrado en su conjunto, la viabilidad y seguridad de las

vacunas basadas en CD en fase I y II, pero no han logrado demostrar una fuerte eficacia en ensayos clínicos que involucran tumores en fase III (Schadendorf et al., 2006; Higano et al., 2009; Kantoff et al., 2010; Higano et al., 2010; Cheever et al., 2011). La inmunoterapia basada en CD requiere ser optimizada con respecto al estímulo de maduración empleado, el tipo y la forma en la que se administrará el antígeno, el subtipo y el número de CD que serán inyectadas, y la frecuencia, vía y sitio de inyección (Gallois and Bhardwaj, 2013).

No existe actualmente un consenso sobre cuál es la estrategia óptima para generar CD con aplicaciones en inmunoterapia. La administración de una vacuna basada en CD plasmocitoides en pacientes con melanoma ha demostrado ser segura y ejercer una fuerte respuesta inmunoestimuladora (Tel et al., 2013), con lo cual sería posible cultivar no sólo CD convencionales, sino también plasmocitoides con fines inmunoterapéuticos contra el cáncer (Tel^a et al., 2012; Tel^b et al., 2012; Aspord et al., 2012; Tel et al., 2013).

Es necesario que exista una adecuada maduración de las CD previo a la vacunación, para prevenir la inducción de tolerancia mediada por LTs Regs. En algunos ensayos clínicos se han usado cócteles estandarizados de citoquinas proinflamatorias, compuestas por TNF- α , IL-1b, IL-6, y PGE2, que inducen un aumento en la expresión de moléculas de MHC y co-estimuladoras (Lee et al., 2002). Sin embargo, ciertos estudios sugieren que las CD maduras con este tipo de cóctel no son capaces de inducir la producción de IL-12p70, y que por el contrario atraen poblaciones de LTs Regs y células Th2 (Morelli et al., 2003; Jongmans et al., 2005; Krause et al., 2007). Otro cóctel de citoquinas compuesto por TNF α , IL-1b, ácido poliinosínico-policitidílico (Poly I:C), IFN- α , e IFN γ , dió mejores resultados y demostró estimular la secreción de IL-12 mediada por las CD (Mailliard et al., 2004; Lee et al., 2008). Una estrategia alternativa de maduración que ha logrado mejorar la función de las CD *in vivo*, involucra la administración directa de activadores del sistema inmune, tales como agonistas de TLRs (TLR7, TLR8, TLR9), *FMS-like* tirosina quinasa 3 (Flt3L), o CD40L (Sabbatini et al., 2012; Fang et al., 2013).

Otro factor que limita el éxito de las vacunas basadas en CD es su baja migración a los órganos linfoides secundarios. La mayoría de las CD inyectadas permanece en los sitios de inyección y menos de un 5 % alcanza los ganglios linfáticos (Verdijk et al., 2009; Mac Keon et al., 2010). La administración de las CD vía múltiples rutas o directamente dentro de los ganglios linfáticos podría mejorar su migración, y por ende la respuesta clínica (Gallois and Bhardwaj, 2013).

Las vacunas basadas en CD pueden clasificarse en 3 principales grupos, en base al principio terapéutico: **(1)** CD cargadas *ex vivo* con preparaciones enriquecidas

en antígenos asociados al tumor (Zitvogel et al., 1996; Goldszmid et al., 2003; Kjaergaard et al. 2003; liu et al., 2004; Sukhorukov et al., 2006; Cathelin et al., 2011; Campisano et al., 2013); **(2)** CD cargadas *in vivo* con antígenos asociados al tumor (Welters et al., 2008; Mkrtychyan et al., 2013); y **(3)** antígenos tumorales dirigidos *in vivo* hacia la superficie de las CD, empleando mAbs (Bonifaz et al., 2004; Klechevsky et al., 2010; Tacken ^a et al., 2011; Tacken ^b et al., 2011; Wang, 2012; Cruz et al., 2012; Schreibelt et al., 2012; Tacken et al., 2012; Garcia-Vallejo et al., 2013).

4.1. CD cargadas *ex vivo* con antígenos asociados al tumor

Las CD pueden ser cargadas *ex vivo*, con antígenos asociados al tumor, en presencia de señales de maduración apropiadas, de diferentes formas: **(1)** incubación de iCD con lisados autólogos o células apoptóticas / necróticas tumorales (De Matos et al., 1998; Chen et al., 2001; Paczesny et al., 2001; Goldszmid et al., 2003; Kokhaei et al., 2003; Kokhaei et al., 2004; Bercovici et al., 2008; von Euw et al., 2008; Fucikova et al., 2011; Chiang et al., 2013; Reyes et al., 2013; Kandalaf et al., 2013); **(2)** incubación de iCD con antígenos recombinantes asociados al tumor (Mayordomo et al., 1995; Ossevoort et al., 1995; Mayordomo et al., 1996; Paglia et al., 1996; Zitvogel et al., 1996; Mayordomo et al., 1997; Mackey et al., 1998; Fernandez et al., 1999; Kantoff et al., 2010; Higano et al., 2010; Cheever et al., 2011); **(3)** transfección de CD con una masa de RNA extraída de células malignas, RNAs codificantes de antígenos asociados al tumor o vectores de expresión de antígenos asociados al tumor (Li et al., 2003; Minami et al., 2003; Schmidt et al., 2003; Zeis et al., 2003; Jung et al., 2004; Liu et al., 2004; Blalock et al., 2012; Lee et al., 2013); y **(4)** fusión de CD con células tumorales inactivadas (Kjaergaard et al., 2003; Kokhaei et al., 2003; Sukhorukov et al., 2006; Errington et al., 2006; Cathelin et al., 2011; Tan et al., 2013; Rosenblatt et al., 2013; Koido et al., 2013; Chen et al., 2014).

La primera vacuna contra el cáncer basada en CD y aprobada por la FDA, fue Provenge® de Dendreon, en 2010. Provenge es una preparación celular autóloga enriquecida en CD, cultivada *ex vivo* en presencia de una proteína de fusión constituida por GM-CSF y fosfatasa ácida prostática (PAP), (PAP/GM-CSF). Se emplea para tratar pacientes con cáncer prostático metastásico, en base a los resultados obtenidos en ensayos clínicos de fase III; a partir de los cuales se observó un incremento promedio de 4 meses de supervivencia comparado con la vacuna placebo (Kantoff et al., 2010; Higano et al., 2010; Cheever et al., 2011). Este promisorio pero modesto resultado, deja en claro que deben realizarse más esfuerzos destinados a mejorar la eficacia de las vacunas basadas en CD.

4.2. Direccionamiento de antígenos *in vivo*

Los tumores expresan varios antígenos que son reconocidos por el sistema inmune. Estos antígenos pueden derivar de virus oncogénicos: proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano (HPV), productos de mutaciones, antígenos de diferenciación: tirosinasa, proteína 1 relacionada con la tirosinasa (TRP)-1, TRP-2, glicoproteína 100 (gp100), antígeno de melanoma reconocido por células T 1 (MART1), o variantes sobre-expresadas, tal como el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2/neu) (Gallois and Bhardwaj, 2013).

La inmunoterapia basada en el empleo de péptidos cortos provenientes de antígenos tumorales, presenta ciertas limitaciones debido a que sólo pueden ser empleados en pacientes con alelos HLA conocidos, que presenten esos epítopes en ausencia de un procesamiento natural (Gallois and Bhardwaj, 2013). De forma alternativa, las vacunas basadas en el empleo de péptido largos con frecuencia no inducen una potente respuesta celular mediada por LTs CD8⁺, debido a una ineficiente presentación cruzada de antígenos exógenos por parte de las CD. Sin embargo, los péptidos largos sintéticos representan una alternativa más eficiente (Welters et al., 2008). El uso de vectores virales y bacterianos, representa otra alternativa para cargar antígenos tumorales sobre las CD (Mkrtichyan et al., 2013). En algunos casos, el vector podría codificar citoquinas y moléculas co-estimuladoras, y por lo tanto inducir la maduración de las CD sin necesitar un estímulo separado de maduración. La desventaja de este método es que la inmunidad pre-existente contra los vectores empleados reduce su habilidad para inducir una respuesta inmune adecuada (Di Paola et al., 2006).

4.3. Antígenos tumorales dirigidos *in vivo* hacia las CD empleando anticuerpos

Existen diferentes técnicas: **(1)** antígenos tumorales fusionados a mAbs dirigidos hacia la superficie de las CD, específicamente hacia el receptor DEC-205, la molécula de adhesión intercelular no asociada a integrina, específica de CD (DC-SIGN), o lectinas de tipo C (CLEC4A y CLEC9A) (Hawiger et al., 2001; Bonifaz et al., 2002; Bonifaz et al., 2004; Tacke et al., 2005; Adotevi et al., 2007; Berraondo et al., 2007; Klechevsky et al 2010; Tacke^b et al., 2011; Cruz et al., 2012; Schreiber et al., 2012; Tacke et al., 2012); y **(2)** antígenos tumorales encapsulados en inmunoliposomas (Copland et al., 2003; van Broekhoven et al., 2004; Badiee et al., 2007). Este tipo de vacuna ha demostrado inducir una respuesta inmune potente

mediada por LTs CD4⁺ e incrementos en la producción de anticuerpos (Hawiger et al., 2001; Bonifaz et al., 2002; Bonifaz et al., 2004). Para evitar tolerancia periférica todas estas técnicas requieren de la administración de señales de maduración adecuadas (Bonifaz et al., 2002; Hawiger et al., 2001), tales como Poly I:C, CD40L y Flt3L (Gallois and Bhardwaj et al., 2013).

Cada una de las estrategias mencionadas ofrece ventajas y desventajas únicas (Tacken et al., 2007; Galluzzi et al., 2012).

4.4. Alternativas terapéuticas dirigidas contra el TME

Para potenciar la eficacia *in vivo* de las vacunas basadas en CD y de esta forma optimizar los resultados clínicos, es necesario resolver el fenómeno de inmunosupresión generado por el TME. Entre los métodos más promisorios para activar la inmunidad anti-tumoral se encuentra el bloqueo de los *check-points* o puntos de control, tales como CTLA-4 (Hawiger et al., 2001). El bloqueo de esta molécula empleando anticuerpos neutralizantes (Ipilimumab y Tremelimumab) ha demostrado incrementar la respuesta inmune transformándose en una droga prometedora para el tratamiento de pacientes con melanoma (Yuan et al., 2008; Hodi et al., 2010; Amaria et al., 2011). Ipilimumab (Yervoy) ya fue aprobado por la FDA para tratar melanomas irresecables o metastásicos, basado en el incremento de supervivencia de los pacientes (Hodi et al., 2010; Amaria et al., 2011).

La molécula PD-L1 es expresada por diferentes tipos celulares que infiltran el TME, incluyendo las CD. El bloqueo de este ligando induce una regresión duradera y estabilización prolongada de la enfermedad, en pacientes con cáncer avanzado, incluyendo cáncer de pulmón de células no pequeñas, melanoma y de riñón (Brahmer et al., 2012). Además, recientemente fue aprobado el uso de Opdivo (nivolumab), una droga que inhibe la proteína PD-1 (Robert ^a et al., 2014; Robert ^b et al., 2014; <http://www.fda.gov>). El bloqueo conjunto de PD-1 y Tim-3 en LTs CD8⁺ humanos, demostró incrementar de forma significativa la proliferación de LTs y la producción de citoquinas *in vitro* (Fourcade et al., 2010; Sakuishi et al., 2010; Baitsch et al., 2012), y controlar el crecimiento tumoral *in vivo*, en diferentes modelos de cáncer, incluyendo melanoma (Sakuishi et al., 2010; Ngiow et al., 2011).

En síntesis, el proceso de supresión inmune inducido por el tumor depende del reclutamiento de CAFs, TAMs, TANs, MDSCs, LTs Regs, y otras poblaciones celulares que alteran el balance de las células anti-tumorales en el TME. Esto resulta en inflamación y angiogénesis, como así también en un incremento de neutrófilos N2,

macrófagos M2, y células Th2; y en una disminución del número de CTLs y APCs. Por lo tanto, la red de citoquinas establecida promueve el crecimiento tumoral.

Por todo esto, es necesario que los métodos inmunoterapéuticos consigan: (1) la reprogramación inmunosupresiva que ejerce el TME; (2) la optimización de la función de las CD; y (3) el incremento de la inmunidad mediada por LTs. Se espera que de esta forma se consiga proveer una inmunidad anti-tumoral duradera y mejorar la expectativa y calidad de vida de los pacientes con cáncer.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Antecedentes de la hipótesis de trabajo:

A partir de estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se ha podido demostrar que la vacunación con CD provenientes de MO y cargadas con células apoptóticas y necróticas del melanoma murino B16F1 (Apo-Nec), (vacuna CD/Apo-Nec), es capaz de estimular *in vivo* la proliferación de LTs CD4⁺ y CD8⁺ e inducir inmunidad a largo plazo (Goldszmid et al., 2003). Asimismo, se ha demostrado que luego de la inmunización se produce una escasa migración de la vacuna hacia los ganglios linfáticos (~0,8 %), mientras que la mayoría de las células permanecen en el sitio de inyección, formando parte de una estructura de tejido pseudolinfoide terciario (Mac Keon et al., 2010). Esta estructura recluta gran variedad de poblaciones celulares, tales como macrófagos, neutrófilos y LTs CD8⁺ y CD4⁺, lo cual podría explicar la protección alcanzada con la vacuna (Mac Keon et al., 2010). Además, se ha observado que luego de la inmunización se induce un rápido reclutamiento de CD CD207⁺ en el sitio de vacunación y que esta movilización disminuye en función del tiempo transcurrido luego de la vacunación. En forma paralela se observó un reclutamiento de CD CD207⁺ al ganglio drenante a tiempos más largos (Ruiz et al., 2014).

Hipótesis de trabajo:

Existe una interacción entre las CD CD11c⁺ y las demás células derivadas del cultivo de MO con GM-CSF, que es necesaria para inducir protección contra el melanoma murino B16F1.

Objetivo general:

Potenciar la eficiencia de protección de la vacuna CD/Apo-Nec contra el melanoma murino B16F1, aumentando la inmuoestimulación y disminuyendo la inmunosupresión.

Objetivos Específicos:

1. Identificar las poblaciones celulares involucradas en la respuesta anti-tumoral alcanzada con la vacuna CD/Apo-Nec, mediante la caracterización fenotípica del cultivo heterogéneo de CD, obtenido a partir de precursores de MO incubados durante 7 días con GM-CSF (Capítulo I).
2. Determinar la contribución relativa de las CD CD11c⁺ y de las demás células derivadas del cultivo de MO en la protección anti-tumoral alcanzada con la vacuna CD/Apo-Nec, mediante la caracterización de sus propiedades funcionales *in vitro*, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec (Capítulo II).
3. Comprender el mecanismo mediante el cual la vacuna CD/Apo-Nec ejerce protección antitumoral frente al desafío con células viables de melanoma murino B16F1 (Capítulo III).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales

Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en ambientes con temperatura controlada y ciclos de luz / oscuridad regulados; y se utilizaron cuando alcanzaron 8-12 semanas de edad.

Todos los experimentos con animales fueron realizados acorde a las normas éticas utilizadas por el comité institucional de cuidado y uso de animales de experimentación (CICUAL).

1.1. *Ratones de la cepa C57BL/6*

Durante la realización de este trabajo de Tesis, se utilizó como modelo de melanoma cutáneo la cepa murina C57BL/6 (B6; H-2^b). Los ratones 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) y en el de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires (Buenos Aires).

1.2. *Ratones balb-c*

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

1.3. *Ratones transgénicos OT-I*

Los ratones transgénicos OT-I 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 LTs CD8⁺ con TCR específico para el péptido SIINFEKL: residuos 257-264 de la proteína ovoalbúmina (OVA) asociado a H-2Kb. Los ratones OT-I poseen el fondo genético de la cepa C57BL/6.

1.4. **Ratones transgénicos OT-II**

Los ratones transgénicos OT-II fueron criados y genotipificados por la Dra. Paula Berguer (Fundación Instituto Leloir). Los ratones OT-II poseen solamente un clon de LTs CD4⁺ con TCR específico para el péptido ISQAVHAAHAEINEAGR (residuos 323-339 de la proteína ovoalbúmina) asociado a I-A(b). Los ratones OT-II poseen el fondo genético de la cepa C57BL/6.

2. **Lineas celulares**

Las líneas celulares empleadas durante el desarrollo de esta Tesis, se mantuvieron en cultivo continuo y en una atmósfera con condiciones de humedad y temperatura controladas (5 % CO₂; 37° C). Todas las células se mantuvieron libres de micoplasma y la ausencia del mismo se analizó periódicamente utilizando la coloración de Hoechst, tal como se describe en Sección 3.

El melanoma murino B16 (H-2^b) (línea B16F1), es un tumor no inmunogénico de origen espontáneo, que expresa niveles bajos o no detectables de moléculas de MHC I, no expresa moléculas de MHC II, y es altamente tumorigénico (Fidler and Nicolson, 1978). La línea B16F1 de crecimiento en forma de capa monoaderente, se mantuvo en cultivo en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich, MO) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco® by Life Technologies, o Natocor, Argentina), 2 mM L-glutamina, 100 U / ml penicilina y 100 g / ml estreptomycin (*Life Technologies*, Gaithersburg, MD). Para inducir el desarrollo del tumor en los animales, las células se cosecharon luego de ser incubadas con una solución de ácido etildiaminotetraacético (EDTA) 0,5 mM, a 37° C, durante 5 minutos, y lavadas sucesivamente con buffer fosfato (PBS). 1,3 x 10⁴ células se resuspendieron en 0,1 ml de PBS e inyectaron en ratones C57BL/6 en forma subcutánea (s.c) en el flanco derecho. El tamaño tumoral se midió con un calibre día por medio.

La línea B16F1 transformada que expresa OVA (B16F1-OVA), también de crecimiento en forma de capa monoaderente, se mantuvo en cultivo bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad que la línea B16F1, pero en medio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO) suplementado con 10 % FBS. El día posterior al descongelamiento se agregó antibiótico *hygromycin B* (Roche) al medio de cultivo, a una concentración final de 100 µg / ml, para seleccionar aquellas células eficientemente transformadas. El cultivo se mantuvo en selección en los sucesivos pasajes celulares.

3. Detección de micoplasma

La detección de micoplasma se realizó utilizando la coloración de Hoechst (Chen, 1977). Brevemente, las células se sembraron sobre un cubreobjetos previamente flameado en alcohol, en una placa de Petri de 35 mm de diámetro, con 2 ml del medio de cultivo correspondiente, y se incubaron durante 24 hs en estufa a 37° C. Sin descartar el medio se agregó fijador de Carnoy (metanol: ácido acético 3:1) durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, se descartó el fijador y se repitió el último paso. El vidrio con las células adheridas se dejó secar al aire libre y una vez seco se agregó el colorante de Hoechst (0,5 g / ml) (Calbiochem). Se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos protegido de la luz, y luego se lavó 2 veces con agua destilada. Nuevamente, se dejó secar el vidrio al aire libre y se montó sobre un portaobjetos con la cara conteniendo las células adheridas hacia abajo. El resultado se observó bajo el microscopio de fluorescencia, donde la contaminación con micoplasma se evidenció por la presencia de un puntillado fluorescente intra y / o inter-citoplasmático.

4. Inducción de apoptosis y necrosis

La apoptosis y necrosis de células B16F1 y B16F1-OVA se indujo con radiación ionizante. Cuando el cultivo alcanzó un 70-80 % de confluencia, las células se cosecharon empleando una solución de EDTA 0,5 mM, y se lavaron con PBS. Luego, las células se resuspendieron en DMEM o RPMI respectivamente, sin FBS, en botellas de cultivo de 25 cm² (completando el volumen total de la botella para evitar que quede aire en su interior), y se irradiaron con una dosis de 70 Gy, en un Siemens Lineal Accelerator (Instituto Alexander Fleming, Buenos Aires, Argentina). Las células irradiadas se conservaron en nitrógeno (N₂) líquido y se descongelaron 48 hs previo al co-cultivo.

5. Obtención de CD a partir de precursores de MO

Las CD se obtuvieron a partir de precursores de MO de ratones C57BL/6 utilizando el método descrito por Lutz y colaboradores, levemente modificado (Lutz et al., 1999). Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂. Se extirparon cuidadosamente fémures y tibias, y los restos de tejido muscular se removieron con la ayuda de una gasa estéril. Los huesos se sumergieron en etanol (EtOH) 70 % durante 3 minutos y luego se colocaron en una placa conteniendo PBS 1X. A continuación se

cortaron las epífisis de ambos extremos y se extrajo la MO mediante inyecciones sucesivas con PBS 1X, empleando una jeringa de 1 ml con aguja de 25G 5/8. Luego se colocó la suspensión celular en un tubo cónico de 50 ml. Las células se lavaron 2 veces, se contaron (excluyendo los glóbulos rojos), obteniéndose entre 15 y 30×10^6 leucocitos por ratón. Para la obtención de CD los leucocitos se cultivaron en presencia de GM-CSF murino (Preprotech, Mexico DF, Mexico). En el día 0, se sembraron 3×10^6 leucocitos por placa de Petri de bacteriología de 100 mm de diámetro, en 8 ml de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, MO) suplementado con 10 % FBS, 100 U / ml penicilina, 100 g / ml estreptomina (*Life Technologies*, Gaithersburg, MD), y 0,16 g GM-CSF. En el día 3, se agregaron 8 ml de medio completo fresco a las placas. En el día 5, se centrifugaron 8 ml del medio condicionado y las células se resuspendieron en 8 ml de medio completo fresco. En el día 7, las células se cosecharon y emplearon en los diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo* realizados.

6. Purificación de CD CD11c⁺. Obtención de las fracciones CD⁺ y CD⁻

Las CD CD11c⁺ se purificaron por selección positiva, empleando microesferas magnéticas recubiertas con mAb anti-CD11c (Miltenyi Biotec, Alemania). Una parte de las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD, se lavó primero con PBS y luego con PBS / 0,5 % albúmina sérica bovina (BSA) / 2 mM EDTA, pH 7,2 (buffer MACS). Posteriormente, las células se bloquearon con 20 % de suero murino estéril o *rat anti-mouse* CD16/32 (2 μ l / 1×10^6 células), en 400 μ l finales de buffer. Se realizó una incubación de 45 min a 0° C y posteriormente las células se lavaron con buffer (sólo en el caso de previa incubación con *rat anti-mouse* CD16/32). Después de retirar el sobrenadante, las células se resuspendieron en 400 μ l de buffer y se agregaron 100 μ l de microesferas magnéticas. Se realizó una incubación de 30 minutos a 4° C, mezclando las células en el tubo cada 5 minutos. Luego se realizó un lavado y se resuspendieron en 500 μ l de buffer. Las células CD11c⁺ (fracción CD⁺), se obtuvieron por aplicación de un campo magnético utilizando las columnas miniMACS (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. Las células CD11c⁻ eluidas (fracción CD⁻), junto a la fracción fracción CD⁺ y a la población heterogénea inicial de CD, se emplearon en los diferentes experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados.

7. Co-cultivo con células Apo-Nec

Las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻, se co-cultivaron con células Apo-Nec, o Apo-Nec-Ova en una relación 1:1, a 37°

C, en atmósfera con 5 % de CO₂, durante 24 hs, en el medio de cultivo condicionado de las CD, en tubos ppt (Sempercare) o en placas de 24 pocillos (1 x 10⁶ / ml). Transcurrido ese tiempo, las células se lavaron con PBS 1X para eliminar las proteínas del suero y se emplearon en los diferentes experimentos *in vivo* e *in vitro* realizados.

8. Inmunización de ratones C57BL/6

El esquema de inmunización consistió en la administración de 4 dosis de vacuna (1 cada 7 días), durante 4 semanas consecutivas. Ratones machos de 8 semanas de edad, fueron vacunados de forma s.c. en el flanco izquierdo con las siguientes preparaciones celulares:

CD/Apo-Nec: cultivo heterogéneo de CD co-cultivado con células Apo-Nec

CD⁺/Apo-Nec: fracción CD⁺ co-cultivada con células Apo-Nec

CD⁻/Apo-Nec: fracción CD⁻ co-cultivada con células Apo-Nec

PBS: vehículo (control negativo)

Todos los ratones recibieron 2 x 10⁵ células en cada inyección, en 0,1 ml de PBS. Una semana después de completar el esquema de vacunación, los animales recibieron un desafío de 1,3 x 10⁴ células B16F1 viables, inyectadas de forma s.c en el flanco derecho. Los animales se examinaron periódicamente y se consideraron positivos cuando el tumor fue palpable. El tamaño del tumor se midió empleando un calibre de *vernier*, y el volumen se calculó según la fórmula $d^2 \times D/2$, donde d corresponde al diámetro menor y D al diámetro mayor medidos. Los animales con tumor se sacrificaron cuando éstos alcanzaron el tamaño máximo permitido, o cuando se encontraban severamente ulcerados.

En el caso de los animales libres de tumor, los experimentos se terminaron 14 semanas luego del desafío tumoral.

Los experimentos *in vivo* incluyeron entre 3 y 10 ratones por grupo.

9. Tinción con May-Grünwald Giemsa

Se realizaron extendidos de células provenientes del cultivo heterogéneo de CD y de las fracciones CD⁺ y CD⁻, sobre vidrios polilisinados y se tiñeron con los colorantes de May-Grünwald Giemsa. Para ello, inicialmente se fijó el preparado con 30 gotas del colorante May-Grünwald durante 1 minuto. Luego se agregaron 30 gotas de agua corriente y se mezclaron las soluciones empleando una pipeta tipo Pasteur.

Se dejó en contacto 1 minuto. Luego se volcó el líquido y cubrió el frotis durante 15 minutos con el colorante de Giemsa diluído (1 gota / 1 ml de agua corriente). Finalmente, se volcó la solución, se lavó con agua corriente y se dejó secar al aire libre. Los extendidos se observaron bajo un microscopio OLYMPUS BX40F-3, se realizó un conteo de 100 células por extendido y se tomaron fotos representativas con una cámara acoplada al microscopio, modelo OLYMPUS DP72.

10. Determinación de antígenos de superficie por inmunofluorescencia

Las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻ se bloquearon con suero de cabra 10 % o *rat anti-mouse* CD16/32 (clon 2.4G2), (BD Bioscience, NJ). Las células se incubaron con mAbs: CD11c-PE (HL3), Ly6G-PE (1A8), I-Ab, (AF6-120.1), CD80 (1G10/B755), CD83-APC (Michel-19), CD86 (GL1), (todos de BD Biosciences); F480 (Cl:A3-1), (AbD Serotec, Alemania) o sobrenadante de hibridoma *rat anti-mouse* CD11b. Para la realización de la inmunofluorescencia indirecta, se realizó una segunda incubación con un anticuerpo secundario: policlonal *goat anti-mouse immunoglobulins-FITC* (DakoCytomation, Dinamarca) o *goat anti-rat cy5 conjugated IgG* (Jackson, PA), luego de la incubación con el mAb primario. Para el análisis por citometría de flujo, las células se fijaron en paraformaldehído 2 % y se analizaron empleando un citómetro de flujo FACS ARIA. Se emplearon controles de isotipo correspondientes a cada uno de los mAbs empleados, como control de unión inespecífica.

Para el análisis por microscopía confocal, luego de la incubación con los anticuerpos correspondientes, se realizaron extendidos de las células provenientes de la fracción CD sobre vidrios polilisinados, se cubrieron con un cubreobjetos e inmediatamente se observaron y fotografiaron empleando el microscopio confocal ubicado en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Luego, las imágenes se analizaron con el software Zeiss LSM Image Browser.

11. Endocitosis de FITC-Dextran

La capacidad endocítica del cultivo heterogéneo de CD y de las fracciones celulares CD⁺ y CD⁻, se evidenció utilizando *fluorescein isothiocyanate-dextran* (FITC-Dextran) (Invitrogen, CA). CD, CD⁺ y CD⁻ maduras o no durante 24 hs con lipopolisacárido (LPS) (2 g / ml) (Sigma-Aldrich, MO), se incubaron en presencia de 1 g / l de FITC-Dextran, en medio RPMI 10 % FBS, a 37° C o 0° C, durante 30 minutos. Luego, se realizaron sucesivos lavados con PBS 1X y las células se fijaron en

paraformaldehído 2 %. Finalmente se realizó el análisis por citometría de flujo y la capacidad endocítica se expresó como el porcentaje de células positivas.

12. Fagocitosis de células Apo-Nec

Para evaluar la capacidad fagocítica, las células Apo-Nec se tiñeron usando PKH26® (Sigma–Aldrich, MO) y luego se co-cultivaron con CD, CD⁺ y CD⁻, las cuales fueron previamente teñidas con CFSE (Sigma Aldrich, MO). Luego de 24 hs de co-cultivo, las células se fijaron con paraformaldehído 2 % y se analizaron por citometría de flujo. La fagocitosis de células Apo-Nec se definió como el porcentaje de células doble positivas.

12.1. Marcación con CFSE

El CFSE (carboxi-fluorescein diacetato succinimidil éster) 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. Para marcar las células, primero se realizó un lavado con PBS 5% FBS. Luego se agregaron 200 µl de la solución de tinción (CFSE 10 µM en PBS 5% FBS) por cada 1×10^6 células. Se incubaron 15 minutos en estufa a 37° C, y luego se lavaron con PBS 5% FBS. Para finalizar se realizaron 2 lavados más con PBS.

12.2. 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 con PBS. Luego se removió el sobrenadante y las células se resuspendieron en diluyente C (Sigma, MO) a razón de 0,5 ml cada 1×10^7 células. Luego se agregó la solución de tinción 20 µM de PHK26 en diluyente C, a razón también de 0,5 ml cada 1×10^7 células (concentración final 10 µM de PKH26). Las células se mezclaron por pipeteo e incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz. La reacción se frenó agregando FBS e incubando durante 1 minuto. Luego se agregó

medio de cultivo completo y se centrifugó 5 minutos a 300g. Se descartó el sobrenadante, y se realizaron dos lavados más en medio completo.

13. Disgregación de tejidos

Los animales se sacrificaron utilizando una cámara de CO₂.

13.1. 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 en placas de Petri de 35 mm de diámetro conteniendo PBS 1X helado, y se cortaron con una tijera. Luego, utilizando el émbolo de una jeringa se presionaron los trozos contra el fondo de la placa para liberar las células. La suspensión se pasó a través de un filtro de 40 µm (Becton Dickinson), presionando los restos de tejido con el émbolo de una jeringa.

13.2. Bazo

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

13.3. Sitio de vacunación

Los ratones se depilaron 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 aproximadamente 1 cm² de piel de la zona inguinal, correspondiente a la zona de inyección de la vacuna y se colocó en una placa de Petri de 35 mm, conteniendo PBS helado. Cuando el tejido fue empleado para

determinar la expresión de citoquinas y quimioquinas, mediante la técnica de RT-PCR, éste se pasó a un tubo cónico conteniendo 1ml de Trizol (TriReagent, GenBiotech) y se lisó durante 1 minuto, en hielo, con la ayuda de un aparato que rompe mecánicamente el tejido, llamado ultraturrax. Cuando el tejido fue empleado para determinar los niveles de ON y actividad arginasa-1, primero se pesó y luego se pasó a un tubo cónico conteniendo PBS helado. Finalmente, también se lisó el tejido durante 1 minuto, en hielo, con la ayuda de un ultraturrax,.

14. Capacidad estimuladora alogeneica *in vitro*. Reacción mixta linfocitaria

Las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻, cocultivadas o no con células Apo-Nec, se trataron con mitomicina C (Delta Farma, Argentina) (20 g / ml), durante 30 minutos a 37^o C, y luego se emplearon en ensayos de reacción mixta linfocitaria, tendientes a evaluar su capacidad para estimular LTs efectores alogeneicos, obtenidos de ganglios linfáticos de ratones BALB/c. Se emplearon tres relaciones de células estimuladoras / efectoras (1/10, 1/100 y 1/1000), manteniéndose constantes las células efectoras en 2 x 10⁵ células / pocillo. Se emplearon placas de 96 pocillos con fondo en U y cada una de las determinaciones se hizo por triplicado. Se usó concanavalina A (3 g / ml) como control positivo. Luego de 3 días se agregó timidina-H³ a los co-cultivos (0,5 Ci / pocillo), se incubaron durante 18 hs y luego se cosecharon con un *Nunc Cell Harvester* 8 (Nalge Nunc International Corp., USA). La incorporación de timidina-H³ se determinó con un contador de centelleo líquido (Wallac).

15. Capacidad estimuladora antígeno-específica. Proliferación de LTs CD4⁺ respondedores a OVA

Las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻, se co-cultivaron con células Apo-Nec-OVA durante 24 hs, y luego se evaluó su capacidad para estimular LTs provenientes de ratones OT-II, extraídos de bazo y purificados empleando microesferas magnéticas anti-CD4. Se emplearon tres relaciones de células estimuladoras / efectoras (1/10, 1/100 y 1/1000), manteniéndose constantes las células efectoras en 2 x 10⁵ células / pocillo. Se emplearon placas de 96 pocillos con fondo en U y cada una de las determinaciones se hizo por triplicado. Se usó péptido ISQAVHAAHAEINEAGR (residuos 323-339 de la proteína ovoalbúmina) (30 µM), para el control positivo *in vitro*. Luego de 3 días se agregó

timidina- H^3 (0,5 Ci / pocillo), se incubó durante 18 hs y finalmente las células se cosecharon empleando un *Nunc Cell Harvester 8* (Nalge Nunc International Corp., USA). La incorporación de timidina- H^3 se determinó con un contador de centelleo líquido (Wallac).

16. Proliferación de LTs OT-I en respuesta a células de MO obtenidas de ratones inmunizados con CD-OVA o CD/Apo-Nec-Ova

Se evaluó la capacidad de las células de MO extraídas de ratones previamente inmunizados con una única dosis de 200.000 células CD-OVA o CD/Apo-Nec-Ova, para inducir la proliferación *in vitro* de LTs extraídos de ganglios linfáticos de ratones OT-I, 4 y 24 horas luego de la inmunización. La vacunación con CD-OVA se realizó de forma i.p., en tanto que la vacunación con CD/Apo-Nec-Ova se realizó de forma s.c. Las CD ($0,5 \times 10^6$ células / ml) se incubaron *in vitro* con la proteína OVA (10 μ g / ml) *overnight*, o con células Apo-Nec-Ova (1:1), durante 24 hs y luego se inyectaron en ratones C57BL/6 *wild type*. Transcurridas 4 o 24 hs se sacrificaron los animales, se extrajeron las células de la MO de cada ratón individualmente, se incubaron con mitomicina C (Delta Farma, Argentina) (20 μ g / ml), durante 30 minutos a 37° C, y luego se emplearon como células estimuladoras de LTs Ova específicos. Se usó la relación de células estimuladoras / efectoras 1/10, empleando 2×10^5 células efectoras / pocillo. Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo en U y cada una de las determinaciones se hizo por triplicado. Como control positivo *in vitro* se usó el cargado de CD con péptido SIINFEKL (residuos 257-264 de la proteína ovoalbúmina) (30 μ M), proteína OVA o células Apo-Nec-Ova. Como control negativo *in vivo*, se inyectaron ratones con PBS o proteína OVA (1 μ g en 0,1 ml de PBS). Luego de 3 días se agregó timidina- H^3 (0,5 Ci / pocillo) y se incubaron durante 18 hs. Posteriormente se cosecharon las células con un *Nunc Cell Harvester 8* (Nalge Nunc International Corp., USA). La incorporación de timidina- H^3 se determinó con un contador de centelleo líquido (Wallac).

17. Producción de IL-10 e IL-12

17.1. ELISA para detectar secreción

Se determinó la secreción de IL-10 e IL-12 en los sobrenadantes derivados de CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec suplementado con IFN- γ (1000 U / ml) + LPS (1 μ g / ml), CD solas o CD suplementadas con IFN- γ (1000 U / ml) + LPS (1 μ g / ml), empleando

un *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) con el correspondiente BD OptEIA™ Set Mouse (BD Bioscience, NJ), según las recomendaciones del fabricante. Las muestras de sobrenadantes se tomaron cada 6 hs a lo largo de un periodo de 24 hs.

17.2. Determinación de reservorios intracelulares

Para la detección de reservorios, las CD, CD/Apo-Nec y Apo-Nec se trataron con Brefeldin A (Sigma–Aldrich, MO) para Inhibir la secreción vía Golgi y producir una acumulación intracelular de IL-10 e IL-12. Luego las células se fijaron, permeabilizaron e incubaron con los correspondientes mAbs: *rat anti-mouse* IL-12-APC (p40/p70) o IL-10-APC (JES5-16E3), (BD Biosciences, NJ). Se emplearon controles de isotipo de cada uno de los mAb empleados, como control de unión inespecífica.

18. Determinación de la expresión de citoquinas y quimioquinas, *in vitro* e *in vivo*

Se determinó la expresión de citoquinas y quimioquinas asociadas a la respuesta inflamatoria y a la formación y manutención de estructuras linfoides terciarias, tanto en el cultivo heterogéneo de CD como en las fracciones CD⁺ y CD⁻, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec (*in vitro*). También se determinó en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec (*in vivo*).

18.1. Extracción de ARN

Para extraer el ARN total de las células, inicialmente los sitios de vacunación se lisaron con Trizol (TriReagent, GenBiotech), en hielo, empleando un ultraturrax, tal como se describe en la sección 13.3. Las células obtenidas *in vitro*, se lisaron con Trizol, en hielo, pipeteando intensamente durante 1 minuto. Luego, los lisados se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 µl de cloroformo (Merck) en cada tubo, se agitaron durante 15 segundos e incubaron 3 minutos a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 10.500 rpm, durante 15 minutos, a 4° C. Se tomó la fase acuosa superior conteniendo el ARN y se precipitó con 0,5 ml de isopropanol (Merck). Los tubos se incubaron durante 24 hs a -20° C. Luego, se realizó una centrifugación a 10.500 rpm, durante 10 minutos, a 4° C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet agregando 1,5 ml de EtOH 75 %

(Merck). Los tubos se vortexearon y centrifugaron a 8.300 rpm, durante 5 minutos, a 4° C. Luego se descartó el sobrenadante y dejando los tubos abiertos en una gradilla, cubiertos con papel aluminio, se dejó secar el pellet durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, el ARN se resuspendió en 100 µl de H₂O destilada (Roux Ocefa) y se incubó durante 10 minutos a 55-60° C en un baño térmico. Después de resuspender correctamente, se determinó la concentración de ARN y la relación de absorbancia 260 / 280 nm, empleando el Nanodrop de la Dra. Cybele García, ubicado en el Departamento de Química Biológica-FCEN-UBA. Una relación de absorbancia 260 / 280 nm ~ 2 se consideró como buena.

18.2. Retrotranscripción del ARN a cADN

Se incubaron, en cada caso, 2 µg de ARN con 2 µl de oligo (dT15) (0,5 µg / µl) (Genbiotech), en agua destilada, a 70° C durante 10 minutos, en un baño térmico. Al finalizar la incubación, los tubos se colocaron inmediatamente en hielo y luego de realizar un *spindown*, se agregó la siguiente mezcla de reacción en cada uno de ellos:

- 5 µl de M-MLV 5X Reaction Buffer (Promega)
- 1,25 µl de dATP, 10 mM (Genbiotech)
- 1,25 µl de dCTP, 10 Mm (Genbiotech)
- 1,25 µl de dGTP, 10 Mm (Genbiotech)
- 1,25 µl de dTTP, 10 Mm (Genbiotech)
- 0,6 µl de RNAsin (Genbiotech)
- 1 µl de M-MLV Reverse Transcriptase (Promega)

Los tubos se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, luego 1 hr a 37-42° C, y finalmente, 15 minutos a 70° C en un baño térmico. Después de realizar un *spindown*, se agregó 40 µl de agua destilada en cada tubo, el cADN se alicuotó y guardó a -80° C.

18.3. Condiciones de ciclado para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se preparó la siguiente mezcla de reacción por tubo:

- 2,5 µl de 10X PCR Buffer (PB-L, Productos Bio-Lógicos)

- 0,5 l de 10 mM dNTPs (Genbiotech)
- 0,75 l de 50 mM de MgCl₂ (PB-L, Productos Bio-Lógicos)
- 0,1 l de Taq DNA Polymerase (PB-L, Productos Bio-Lógicos)
- 16,9 l de H₂O destilada
- 1,25 l de 10 M Primer mix
- 3 l de templado de cADN

Luego de realizar un *spidown*, los tubos se colocaron en un termociclador y se empleó el siguiente programa:

94° C	4 minutos	}	40 X
94° C	40 segundos		
55° C	40 segundos		
72° C	1 minuto		
72° C	5 minutos		
4° C	∞		

18.4. Secuencia de primers

En la Tabla 1, se muestra la secuencia de los primers (Genbiotech) empleados para amplificar el ADN correspondiente a las citoquinas y quimioquinas ensayadas. La expresión del gen constitutivo que codifica para β-actina se empleó como control de integridad del ADN, y su amplificación por PCR se evaluó en cada corrida.

Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 2 %. Se empleó 50bp DNA Ladder (Genbiotech). Los geles se incubaron 1 hr con bromuro de etidio (0,5 mg / ml). Las bandas de ADN se evidenciaron empleando el aparato G-box perteneciente al Departamento de Química Biológica, FCEN-UBA.

Citoquina / quimioquina	Secuencia de primers empleados (5'->3')		Longitud del producto
	Forward	Reverse	
β -actina	TGCCCTGAGGCTCTTTCCAGC	ACGCAGCTCAGTAACAGTCCGC	382 bp
IFN- γ	TCAACAACCCACAGGTCCAGCG	AACCCCGCAATCACAGTCTTGCC	386 bp
LT- β	ACGGCGTCTATTACCTCTACTGCC	CGTGTACCATAACGACCCGT	209 bp
CCL-19	GCCTCAGATTATCTGCCATGGC	AGACACAGGGCTCCTTCTGGTG	341 pb
CCL-21	ATGATGACTCTGAGCCTCC	GAGCCCTTTCCTTTCTTTCC	347 bp
CXCL-12	GCCCTTCAGATTGTTGCACGGC	AAAGCTCCATTGTGCACGGGCG	338 bp
CXCL-13	ATGAGGCTCAGCACAGCAACGC	CCATTTGGCACGAGGATTCACA	246 bp
IL-10	TAAGGCTGGCCACACTTGAG	GCTGTACAAAGGCAGACAA	326 bp
IL-12 a	CCTTGATCTGGCGTCTACA	GTCTTCAGCAGGTTTCGGGA	255 bp
IL-12 b	TCTCCTTCCCTGTCGCTAA	AGCAGATGTGAGTGGCTCAG	406 bp

Tabla 1: Primers empleados en las PCRs. Se muestra la secuencia de los primers empleados para amplificar el ADN correspondiente a las citoquinas y quimioquinas ensayadas y la longitud del producto correspondiente.

19. Caracterización de los macrófagos (M1 / M2) y neutrófilos (N1 / N2) presentes en el cultivo de CD

Se midió *in vitro* la producción de ON y la actividad de la enzima arginasa-1, en CD, CD⁺ y CD⁻, co-cultivadas o no con células Apo-Nec. Las células empleadas para la determinación de ON se lisaron en PBS, mediante ciclos de congelación y descongelación en N₂ líquido. Las células empleadas para la determinación de arginasa-1, se lisaron empleando Tritón x100 0,1 % en buffer Tris HCL 25mM, con inhibidores de proteasas: EDTA 5 mM y phenylmethyldulfonyl fluoride (PMCF) 1X, durante 30 minutos a 37° C, con agitación. El ON liberado se midió mediante la reacción de Griess, empleando el kit *Nitrate / Nitrite Colorimetric Assay* (Cayman), según las recomendaciones del fabricante. La determinación de actividad arginasa-1 se realizó según el método descrito por Corraliza y colaboradores (Corraliza et al., 1994). En ambos casos, se midió la absorbancia del producto colorimétrico a 540nm, empleando un FLUOstar OPTIMA *Microplate Reader*, perteneciente al Departamento de Química Biológica de la FCEN-UBA.

20. Determinación de los niveles de ON y urea en los sitios de ratones vacunados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec

Cinco días luego de completar el esquema de vacunación, los sitios de inyección de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec fueron extraídos y disgregados, tal como se describe en sección 13.3. Los lisados se centrifugaron a 10.000 xg durante 20 minutos, a 4° C. Se colectó el sobrenadante y se volvió a centrifugar. Nuevamente se tomó el sobrenadante y el volumen total se dividió en dos tubos, cada uno conteniendo 0,5 ml. A los tubos que se emplearon para la determinación de ON, se les agregó 0,5 ml de PBS helado, y a los que se emplearon para la determinación de arginasa-1, se les agregó 0,5 ml de PBS helado con inhibidores de proteasas (EDTA 5 mM, PMCF 1X). Inmediatamente después se guardaron a -20° C hasta el día siguiente, en el cual se llevó a cabo la determinación de los niveles de ON y urea, tal como se describió en la sección anterior.

21. 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), se utilizó para los análisis de *One-Way ANOVA of variance* y *Tukey's Comparison Test*, luego de haber sido chequeados los supuestos que deben cumplir los datos para emplear pruebas paramétrica, con la ayuda del programa Infostat versión 2013 (Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>). Los datos derivados de la caracterización morfológica se analizaron mediante una tabla de contingencia (estadístico Chi²), y los datos de progresión tumoral se analizaron mediante una prueba T para muestras Independientes, empleando en ambos casos, el programa Infostat. Para todos los análisis se utilizó un $\alpha=0,05$ y la siguiente nomenclatura: * p <0,05, ** p <0,01 y *** p <0,001.

CAPITULO I

Caracterización fenotípica de las CD

Inicialmente, se describió de forma fenotípica el cultivo de CD obtenido a partir de precursores de MO, incubados durante 7 días con GM-CSF. La importancia de esta caracterización radicó en la posibilidad de identificar las células involucradas en la respuesta anti-tumoral alcanzada con la vacuna CD/Apo-Nec. Para ello, y como primera aproximación, se llevó a cabo una descripción de la evolución de las células presentes en el cultivo, a partir de microfotografías tomadas en momentos clave del desarrollo del mismo. Asimismo y en una segunda etapa, se realizó una tinción con los colorantes de May Grünwald Giemsa para describir la morfología del núcleo de las células presentes en el cultivo de CD; y por último, se emplearon diferentes mAbs para identificar, tanto por citometría de flujo como por microscopía confocal, la expresión de antígenos de superficie asociados a determinados subtipos celulares o estados de maduración. Como estrategia para poder caracterizar particularmente las CD propiamente dichas o CD11c⁺, se llevó a cabo una separación inmuno-magnética, empleando microesferas acopladas a mAbs anti-CD11c, tal como se describe en Materiales y Métodos (Sección 6), lo cual permitió purificarlas a partir del cultivo heterogéneo de CD y luego estudiarlas individualmente.

1.1. Descripción del cultivo primario de CD a lo largo de 7 días

Se analizó la progresión del cultivo de CD derivado de precursores de MO, a lo largo de 7 días de incubación con GM-CSF. Las células recién colocadas en la placa se encuentran dispersas en el medio de cultivo (**Figura 3 A**). Al tercer día, ya comienzan a observarse agregados celulares que indican una intensa proliferación celular (**Figura 3 B**). Asimismo comienzan a hacerse evidentes células de aspecto más opaco y alargado que se hallan adheridas a la placa. En el quinto día de cultivo se observa una intensa proliferación celular que continúa hasta el día 7 (**Figura 3 C**). La mayoría de las células son de aspecto brillante y se encuentran o no formando parte de agregados celulares. Durante el último día de cultivo, la mayoría de las células ya han sido liberadas de dichos agregados y poseen las típicas prolongaciones que definen a las CD (**Figura 3 D**).

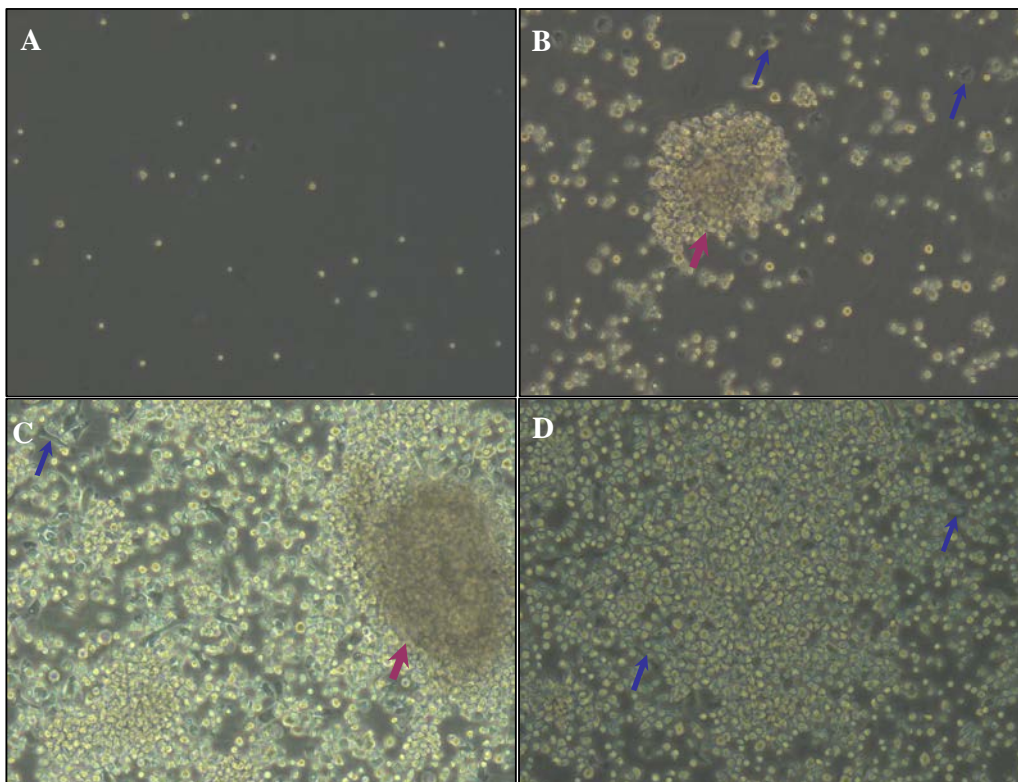


Figura 3: Descripción temporal del cultivo primario de CD. Los precursores de MO se cultivaron durante 7 días en presencia de GM-CSF. Las células recién plaqueadas (A) se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Al tercer día (B), comienzan a observarse agregados celulares que indican una intensa proliferación celular (flechas púrpura), y células de aspecto más opaco y alargado que se han adherido a la placa (flechas azules). Al quinto día de cultivo (C), se observa una intensa proliferación celular. Al séptimo día, las células ya han sido liberadas de los agregados y poseen las típicas prolongaciones que definen a las CD (D). Magnificación original 200 x.

1.2. Identificación de neutrófilos en el cultivo CD. Variación de su proporción en las fracciones CD⁺ y CD⁻ luego de la separación inmuno-magnética

El cultivo de CD se diferenció *in vitro* a partir de precursores de MO, en presencia de GM-CSF. Luego de la separación inmuno-magnética se identificaron dos poblaciones en términos de expresión de CD11c: CD⁺ (CD11c⁺) y CD⁻ (CD11c⁻). Se analizó la morfología de los precursores de MO, de las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD, y de aquellas presentes en cada una de las fracciones, mediante una tinción con May-Grünwald Giemsa. Tal como se puede observar en la **Figura 4 A**, la MO contiene gran variedad de precursores, algunos de los cuales presentan una morfología típica de neutrófilos. Luego del cultivo con GM-CSF y de la separación inmuno-magnética, la fracción CD⁺ quedó enriquecida en células mononucleares

(98%) y prácticamente todos los neutrófilos fueron colectados en la fracción CD⁻ (40%) (Figura 4 B-D). Las diferencias de porcentaje entre CD, CD⁺ y CD⁻ fueron estadísticamente significativas, $\text{Chi}^2 < 0,0001$ (Figura 4 E).

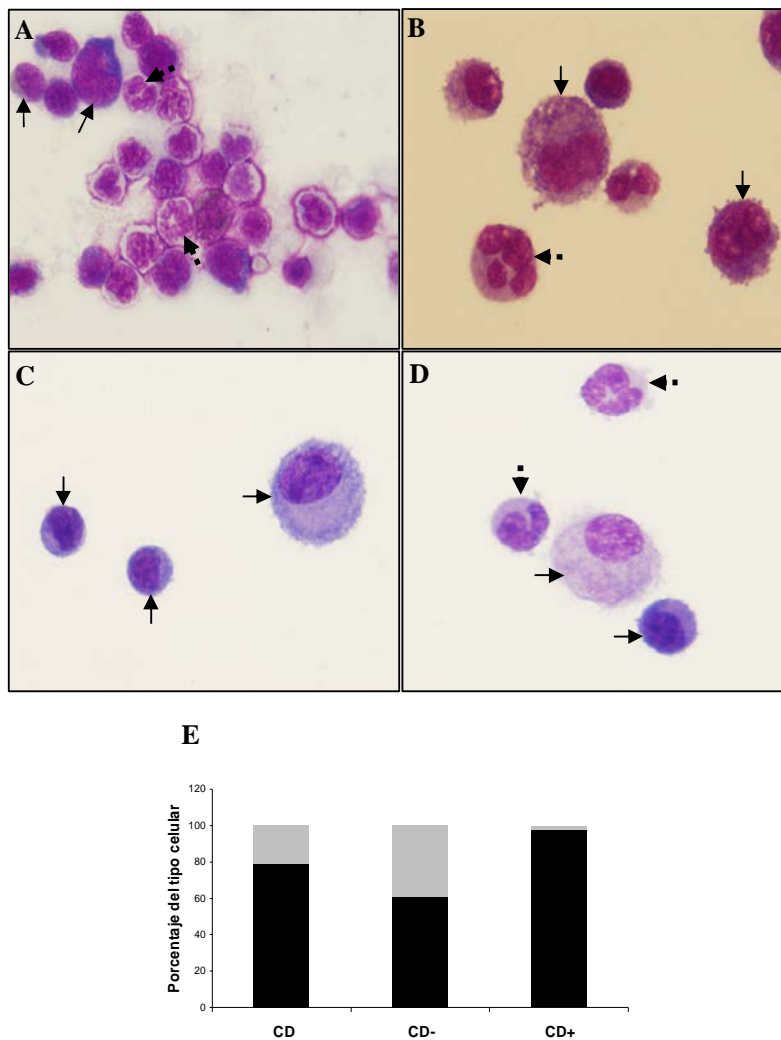


Figura 4: Morfología de las células teñidas con May-Grünwald Giemsa. Neutrófilos (flechas punteadas) y células mononucleares (flechas completas) presentes en precursores de MO, obtenidos de fémures y tibias (A), cultivo heterogéneo de CD (B), y fracciones celulares: CD⁺ (C) y CD⁻ (D). Magnificación original 1000 x. (E) Porcentaje de neutrófilos (barra gris) vs. células mononucleares (barras negras) en cada caso. Los conteos se realizaron a partir de 100 células por extendido. $\text{Chi}^2 < 0,0001$.

1.3. Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD

Las células presentes en el cultivo de CD sin seleccionar, y en las fracciones obtenidas luego de la separación inmuno-magnética (CD^+ y CD^-), se incubaron con los anticuerpos correspondientes (Materiales y Métodos, Sección 10), y luego se analizaron por citometría de flujo. El cultivo heterogéneo de CD también se caracterizó mediante microscopía confocal.

Tal como se esperaba, la expresión de CD11c fue mayor en la fracción celular CD^+ (media \pm SD: $77,6 \pm 15,1$ %) y difirió significativamente de las CD no purificadas (media \pm SD: $50,3 \pm 8$ %; $p < 0,01$) y de la fracción CD^- (media \pm SD: $15,4 \pm 4,2$ %; $p < 0,001$). (**Figura 5**).

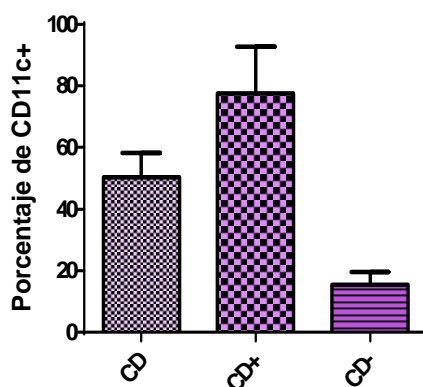


Figura 5: Porcentaje de células CD11c⁺ en CD, CD⁺ y CD⁻. Las células se incubaron con el mAb anti-CD11c y analizaron por citometría de flujo. CD vs. CD⁺ $p < 0,01$; CD vs. CD⁻ $p < 0,001$; CD⁺ vs. CD⁻ $p < 0,001$. La media representa el promedio de 10 experimentos.

Aproximadamente el 26,6 % de las células presentes en la fracción CD^+ co-expresaron CD11c y F4/80 (**Figuras 6 y 8 A**), y el 75,4 % resultaron ser doble positivas para CD11c y CD11b. La fracción CD^+ también expresó Ly6-G (**Figura 6**), un marcador celular típico de neutrófilos. La fracción CD^- quedó enriquecida en células CD11c⁺/F4/80⁺ (44,7 %), un fenotipo atribuido a los macrófagos, alguno de los cuales co-expresaron Ly6-G (41,8 %). Las células con un fenotipo F4/80⁻/Ly6-G⁺ (34,6 %) presentaron características de neutrófilos (**Figura 6**). Estos últimos dos subtipos celulares podrían corresponderse con las células observadas por microscopía confocal en el cultivo de heterogéneo de CD (**Figura 8 B**). Las fracciones CD^+ y CD^- expresaron niveles similares de CD80, CD83, CD86 y MHC II (**Figura 7**). Además se identificaron

células que expresaron conjuntamente MHCII⁺ y Ly6G⁺ en el cultivo de CD. (Figura 8 C).

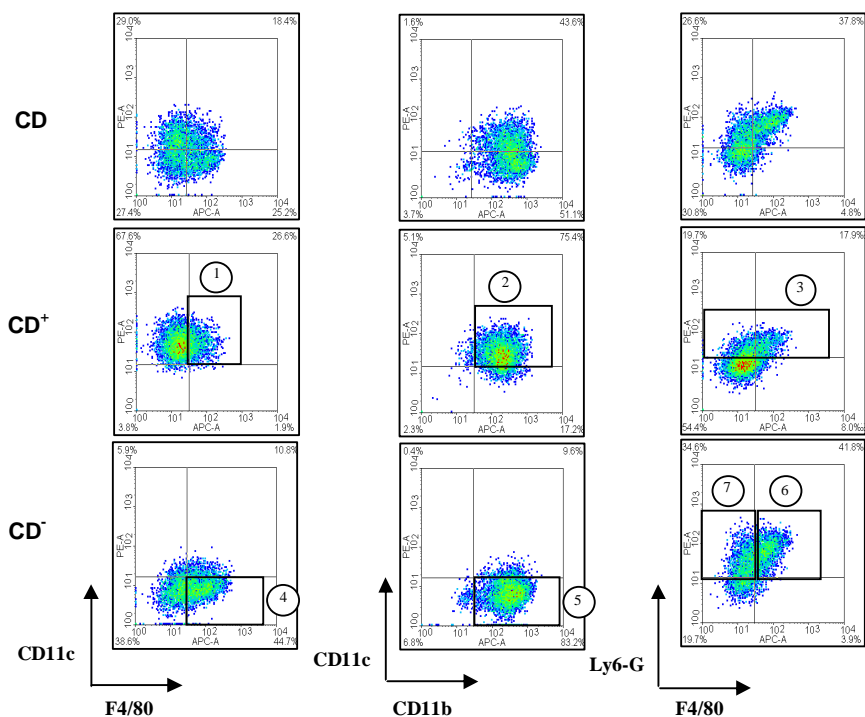


Figura 6: Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD y en las fracciones celulares CD⁺ y CD⁻. Luego de la separación inmuno-magnética con microesferas anti-CD11c, las células se incubaron con los mAbs *anti-mouse* CD11c, F4/80, Ly6-G y CD11b y luego se analizaron por citometría de flujo. Se muestran los *density plots* correspondientes a determinaciones dobles: 1: CD CD11c⁺/F4/80⁺; 2: CD CD11c⁺/CD11b⁺; 3: CD CD11c⁺/Ly6-G⁺; 4: macrófagos CD11c⁺/F4/80⁺; 5: células CD11c⁻/CD11b⁺; 6: macrófagos CD11c⁻/F4/80⁺/Ly6-G⁺; 7: neutrófilos CD11c⁻/F4/80⁺/Ly6-G⁺. Los resultados son representativos de 2 a 10 experimentos en cada caso.

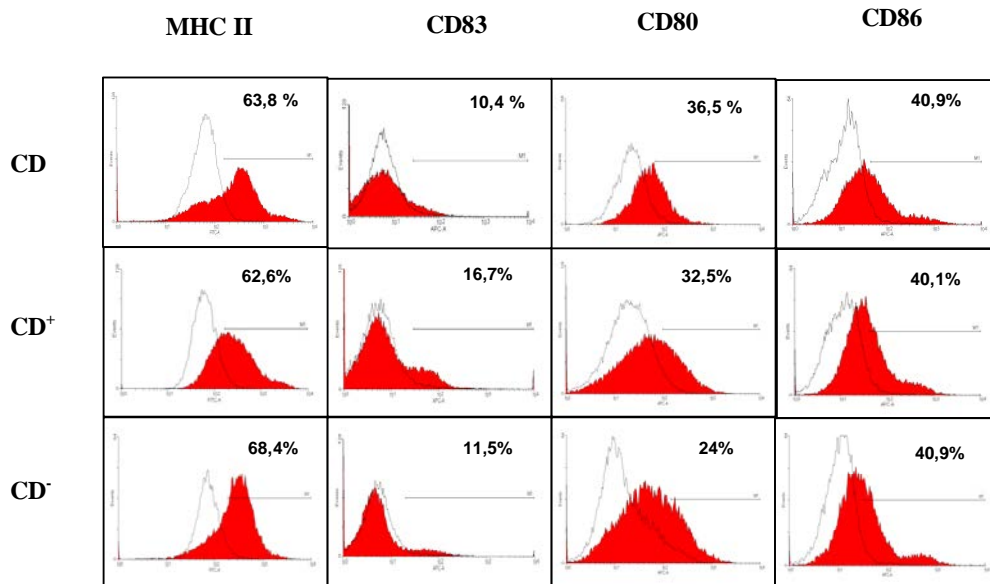


Figura 7: Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD y en las fracciones celulares CD⁺ y CD⁻. Luego de la separación magnética con microesferas anti-CD11c, las células se incubaron con los mAbs *anti-mouse* MHCII CD80, CD83 y CD86 y luego se analizaron por citometría de flujo. Los histogramas vacíos representan controles de isotipo. Los resultados son representativos de 2 a 10 experimentos en cada caso.

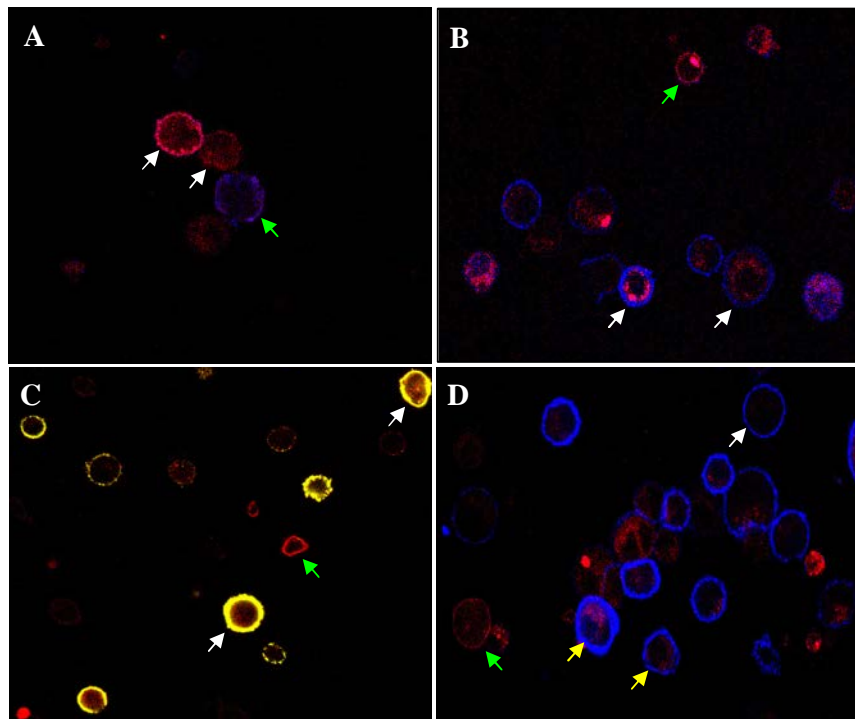


Figura 8: Expresión de antígenos de superficie en el cultivo heterogéneo de CD. Las células se incubaron con los mAbs *anti-mouse* CD11c, F4/80, Ly6G, CD11b y MHCII, y luego se observaron y

fotografiaron bajo un microscopio confocal. Se muestran imágenes representativas correspondientes a determinaciones dobles, analizadas con el software Zeiss LSM Image Browser. A: células incubadas con *anti-mouse* CD11c + F4/80; célula CD11c⁺F4/80⁻ (flecha blanca), CD11c⁺F4/80⁺ (flecha verde). B: células incubadas con *anti-mouse* Ly6-G + F4/80; células Ly6-G⁺F4/80⁺ (flecha blanca), Ly6-G⁺F4/80⁻ (flecha verde). C: células incubadas con *anti-mouse* Ly6-G + MHC II; células Ly6-G⁺MHC II⁺ (flecha blanca), Ly6-G⁺MHC II⁻ (flecha verde). D: células incubadas con *anti-mouse* Ly6-G + CD11b; célula Ly6-G⁻CD11b⁺ (flecha blanca), Ly6-G⁺CD11b⁻ (flecha verde), Ly6-G⁺CD11b⁺ (flecha amarilla). Magnificación original 600 x.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO I

A partir de estos resultados, hemos logrado determinar que los precursores de MO cultivados durante 7 días con GM-CSF dieron lugar al desarrollo de una población heterogénea de células, enriquecida en CD CD11c⁺ y con una proporción significativa de neutrófilos Ly6-G⁺ y macrófagos F4/80⁺. Ciertos autores han identificado en MO neutrófilos murinos morfológicamente y funcionalmente maduros (Boxio et al., 2004), lo cual en parte coincide con lo que observamos luego de la tinción con May-Grünwald Giemsa. Si bien es sabido que este tipo de células tiene un corto periodo de vida en la sangre, no fue sorprendente encontrarlos en nuestro cultivo ya que el GM-CSF genera señales anti-apoptóticas que previenen la apoptosis de los neutrófilos (Kozo et al., 2002), e incluso estimulan un incremento en la expresión de marcadores de activación, tales como CD11b (Costantini et al., 2010). Sin embargo este marcador también se expresa en otras células que provienen del linaje mieloide (Gilliet et al., 2002; Maruyama et al., 2005), lo cual explica el elevado porcentaje de CD11b encontrado en todas las fracciones.

Luego de la separación inmuno-magnética con microesferas anti-CD11c, los macrófagos y neutrófilos fueron colectados en la fracción CD⁺, representando éstos últimos un 40 % del número total de células observadas mediante la tinción con May-Grünwald Giemsa. Es importante destacar que este resultado coincidió con el obtenido por citometría de flujo, empleando el mAb anti-Ly6-G (34,6 %). De manera similar, el porcentaje de neutrófilos identificados en la fracción CD mediante la tinción celular (20 %) coincidió con el obtenido luego de la incubación con el mAb (26,6 %). En contraste, en la fracción CD⁺ sólo el 2 % del número total de células fue identificado como neutrófilos de acuerdo a su morfología nuclear típica, mientras que el 19,7 % expresó Ly6-G. Esto sugiere que el porcentaje remanente de Ly6-G expresado por esta fracción está asociado con CD CD11c⁺. En este sentido, se sabe que las células que derivan del sistema mononuclear y los granulocitos poseen varias características similares como consecuencia de derivar de progenitores comunes de MO (Wu and Liu, 2007). Por lo tanto, no es llamativo que puedan compartir ciertos antígenos de superficie.

Asimismo, tanto en el cultivo heterogéneo de CD como en la fracción CD⁺ hemos identificado una subpoblación de células que expresan CD11c y F4/80. Se ha demostrado que ciertas células de origen mieloide pueden co-expresar ambos marcadores y exhibir un fenotipo que algunos autores prefieren clasificar como

“células dendríticas que expresan F4/80” (Miloud et al., 2010), mientras otros autores prefieren hacerlo como “macrófagos que expresan CD11c” (Hume, 2008).

También hemos identificado una subpoblación celular que co-expresa los antígenos de superficie F4/80 y Ly6-G. Algunos autores han encontrado células de origen mieloide doble positivas (F4/80⁺ Ly6G⁺) en la cavidad peritoneal de ratones, en respuesta a infecciones bacterianas sistémicas, luego del tratamiento con *monophosphoryl lipid A*. Esta población tiene características compatibles con el linaje monocito / macrófago (Romero et al., 2011). Asimismo, sostienen que las células F4/80⁻ Ly6G⁺, tienen características de neutrófilos (Romero et al., 2011). Las células MHCII⁺ / Ly6G⁺ identificadas mediante microscopía confocal en el cultivo de CD, podrían representar neutrófilos capaces de presentar antígenos, (Abi Abdallah et al., 2011) o bien APCs, tales como células dendríticas o macrófagos, que a su vez expresen Ly6-G. En este sentido, Matsushima y colaboradores han descrito que tanto los neutrófilos inmaduros como maduros son capaces de diferenciarse en células con un fenotipo híbrido no reconocido previamente, cuando se cultivan en presencia de GM-CSF (Matsushima et al., 2013). Estos híbridos celulares exhiben fenotipo y funcionalidad dual, tanto de neutrófilos como de células dendríticas, pudiendo expresar marcadores típicos de uno (Ly6G, CXCR2, y 7/4) u otro tipo celular (CD11c, MHCII, CD80, and CD86), respectivamente (Matsushima et al., 2013; Geng et al., 2013).

CAPITULO II

Caracterización funcional de las CD

Una vez identificadas las principales poblaciones celulares presentes en el cultivo heterogéneo de CD, se procedió a realizar una caracterización *in vitro* de las propiedades funcionales de las CD CD11c⁺ y CD11c⁻, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec, de manera de poder identificar la contribución relativa de cada una de ellas en la protección anti-tumoral alcanzada (Goldszmid et al., 2003). Para ello se evaluó de forma comparativa con las CD sin seleccionar, su capacidad para capturar, procesar y presentar antígenos y para generar una respuesta de tipo Th1/Th2. Asimismo, se procedió a caracterizar los macrófagos y neutrófilos presentes en el cultivo de CD, en M1/N1 o M2/N2. Por último, considerando que experimentos previos habían demostrado que la inmunización con CD/Apo-Nec inducía la formación de una estructura de tejido pseudo-linfoide terciario en el sitio de vacunación (Mac Keon et al., 2010), se analizó la capacidad de las CD sin seleccionar y de las fracciones CD⁺ y CD⁻, para producir citoquinas y quimioquinas asociadas a la respuesta inflamatoria, y a la formación y manutención de estructuras linfoides terciarias.

2.1. Eficiencia de captación antigénica de las fracciones CD⁺ y CD⁻ en comparación con las CD sin seleccionar. Fagocitosis de células Apo-Nec.

Se examinó la capacidad de las fracciones CD⁺ y CD⁻ para fagocitar células Apo-Nec, y se comparó con la del cultivo heterogéneo de CD. Tal como se observa en la **Figura 9**, las fracciones CD⁺ (27 %) y CD⁻ (31,8 %) mostraron una eficacia similar al cultivo de CD (24,5 %) para realizar tal proceso y no difirieron significativamente entre sí.

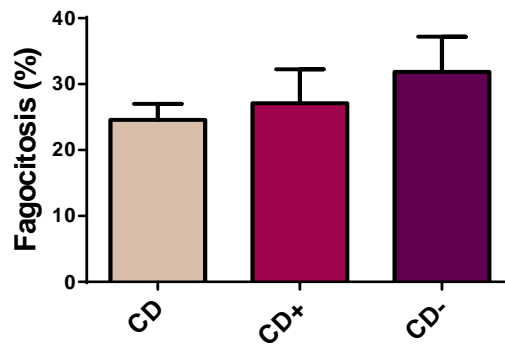


Figura 9: Eficiencia de captación de antígenos de las CD sin seleccionar y de las fracciones CD⁺ y CD⁻. Fagocitosis de células Apo-Nec. La figura representa un promedio de 2 experimentos. Como control negativo se realizó un experimento similar a 0° C.

2.2. Eficiencia de captación antigénica de las fracciones CD⁺ y CD⁻ en comparación con las CD sin seleccionar. Endocitosis de FITC-Dextran

La capacidad de las células presentes en el cultivo de CD sin seleccionar y en las fracciones CD⁺ y CD⁻ para endocitar antígenos, se evaluó empleando partículas de FITC-Dextran. Tal como se observa en la **Figura 10**, CD (59,5%), CD⁺ (48,1%) y CD⁻ (57,9%) presentaron una eficiencia similar para endocitar partículas. Sin embargo, luego de la incubación con LPS dicha capacidad disminuyó significativamente en todos los casos, comparado con las células no incubadas con LPS, $p < 0,001$ (**Figura 10**), demostrando que las células no están completamente maduras luego de 7 días de cultivo con GM-CSF, y que por el contrario son capaces de responder a un estímulo madurativo.

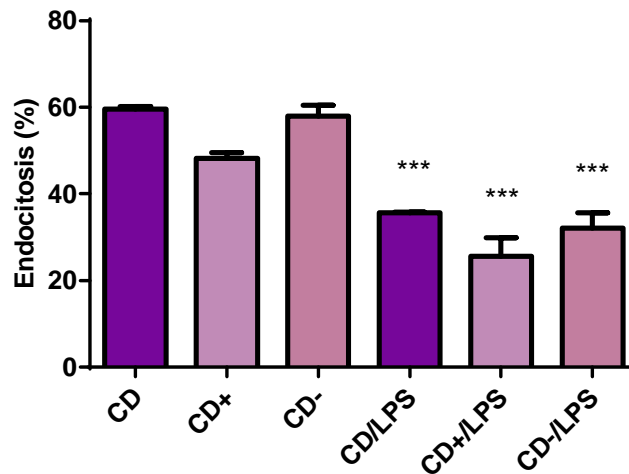


Figura 10: Eficiencia de captación de antígenos de las CD sin seleccionar y de las fracciones CD⁺ y CD⁻. Endocitosis de FITC-Dextran. Se muestra 1 de 2 experimentos representativos. Como control negativo se realizó un experimento similar a 0° C. (***) p < 0,001.

2.3. Capacidad estimuladora alogeneica. Cultivo mixto linfocitario

Las células presentes en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻, cocultivadas o no con células Apo-Nec, se emplearon para evaluar su capacidad estimuladora frente a LTs efectores alogeneicos, obtenidos a partir de ganglios linfáticos provenientes de ratones BALB/c.

Tal como se muestra en la **Figura 11**, tanto las fracciones CD⁺ y CD⁻ como las CD sin seleccionar, fueron capaces de estimular LTs con respecto a los controles negativos (medio de cultivo vs. CD p < 0,001; medio de cultivo vs. CD⁺ p < 0,001; medio de cultivo vs. CD⁻ p < 0,001; Apo-Nec vs. CD p < 0,01; Apo-Nec vs. CD⁺ p < 0,001; Apo-Nec vs. CD⁻ p < 0,001), siendo CD⁺ la fracción más potente (CD⁺ vs. CD p < 0,001; CD⁺ vs. CD⁻ p < 0,001). Luego del co-cultivo, CD⁺ y CD⁻ disminuyeron su capacidad estimuladora (CD⁺ vs. CD⁺/Apo-Nec p < 0,001; CD⁻ vs. CD⁻/Apo-Nec p < 0,01), mientras que permaneció estadísticamente igual en CD.

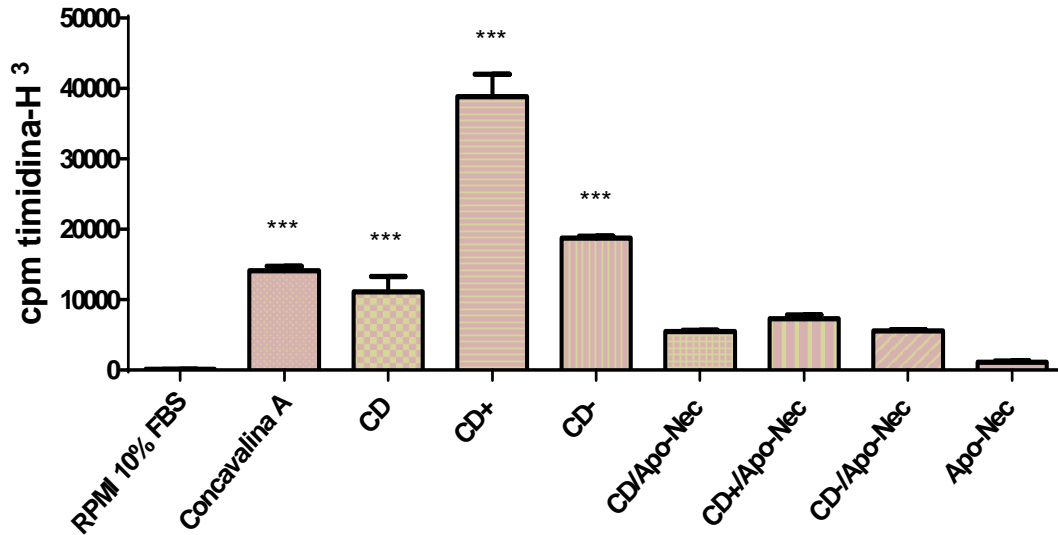


Figura 11: Capacidad estimuladora allogeneica. Cultivo mixto linfocitario. CD, CD⁺ y CD⁻, co-cultivadas o no con células Apo-Nec, fueron incubadas con mitomicina C y empleadas para estimular LTs naïve allogeneicos. Todos los tratamientos incluyeron LTs (se muestra sólo la relación células estimuladoras/LT: 1/10). Se usó concanavalina A como control positivo. Se muestra 1 de 2 experimentos representativos. (***) p < 0,001.

2.4. Capacidad estimuladora antígeno-específica. Cultivo con LTs CD4⁺ OT-2

Considerando que tanto las CD sin seleccionar como las fracciones CD⁺ y CD⁻ obtenidas luego de la separación magnética, expresan MHC II de forma comparable (Capítulo I), se evaluó la capacidad de cada una de dichas poblaciones celulares (CD, CD⁺ y CD⁻) luego del co-cultivo con células Apo-Nec-Ova, para estimular *in vitro* LTs CD4⁺ respondedores a OVA, extraídos del bazo de un ratón OT-2 y purificados a través de una columna cargada con microesferas magnéticas anti-CD4. Tal como se observa en la **Figura 12**, ninguna de las fracciones celulares fue capaz de estimular de forma significativa la proliferación de LTs CD4⁺, luego del co-cultivo con células Apo-Nec-Ova (CD⁺/Apo-Nec-Ova y CD⁻/Apo-Nec-Ova), como así tampoco CD/Apo-Nec-Ova (p > 0,05). Por lo tanto, no se encontraron evidencias de que las células derivadas del cultivo de precursores de MO sean capaces de presentar Ags provenientes de células Apo-Nec-Ova, *in vitro*, en el contexto del MHC II, ni antes ni después de la separación inmuno-magnética.

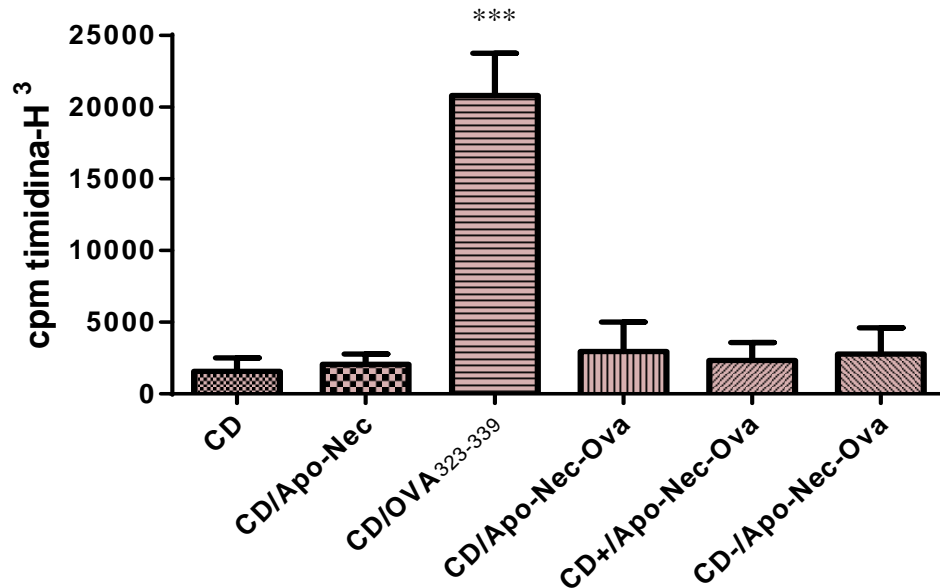


Figura 12: Capacidad estimuladora antígeno-específica. Cultivo con LTs CD4⁺. CD, CD⁺ y CD⁻ co-cultivadas con células Apo-Nec-Ova, fueron empleadas para estimular LTs naïve provenientes de un ratón OT-2. Todos los tratamientos incluyeron LTs (se muestra sólo la relación células estimuladoras/LTs: 1/10). Se usó péptido OVA₃₂₃₋₃₃₉ como control positivo. Controles negativos: CD sin seleccionar (CD), y co-cultivadas con células Apo-Nec (CD/Apo-Nec). Se muestra un promedio de 2 experimentos. (***) p <0,001.

2.5. Producción de citoquinas: la vacuna CD/Apo-Nec no secreta IL-12 cuando es administrada

Con la intención de determinar si la eficacia de la vacuna CD/Apo-Nec podría estar relacionada con la secreción activa de IL-12 por las células fagocíticas que la componen, al momento de ser administrada en los animales, se determinó la secreción de esta citoquina en los sobrenadantes derivados de CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec + IFN- + LPS, CD o CD + IFN- + LPS, a intervalos regulares durante un periodo de 24 hs. Las CD y la vacuna CD/Apo-Nec no secretaron niveles detectables de IL-12 durante un periodo de 24 hs. En contraste, cuando CD o CD/Apo-Nec se incubaron con IFN- + LPS, se detectaron elevados niveles de IL-12 pero sólo durante las primeras 6 hs de cocultivo (media \pm SD: 1430 \pm 73 pg/ml y 621 \pm 17,4 pg/ml respectivamente). Posteriormente, a las 24hs no fue posible detectar secreción (**Tabla 2 A**). Además, no se detectó IL-10 ni en el sobrenadante de las CD ni en el de la vacuna CD/Apo-Nec, durante el periodo de 24 h. Sin embargo, cuando CD/Apo-Nec se incubó en presencia de IFN- + LPS, se detectaron bajos niveles de IL-10 pero sólo

durante las primeras 6 hs de cocultivo (media \pm SD: $38,9 \pm 12,2$ pg/ml), tornándose indetectables luego de 24 hs (**Tabla 2 B**).

Asimismo, para explorar si la vacuna CD/Apo-Nec poseía la habilidad de sintetizar IL-10 y/o IL-12, se llevó a cabo una citometría de flujo para detectar dichas citoquinas intracelularmente. Como se observa en el histograma (**Figura 13**), ni CD/Apo-Nec ni CD contenían reservorios intracelulares de IL-10 o IL-12.

A

Intervalos de tiempo (horas)	Secreción de IL-12 (pg / ml)			
	CD	CD + IFN- + LPS	CD/Apo-Nec	CD/Apo-Nec + IFN- + LPS
0 a 6	0	1430 ± 73	0	$621 \pm 17,4$
6 a 12	0	423 ± 27	0	163 ± 15
12 a 18	0	0	0	0
18 a 24	0	0	0	0

B

Intervalos de tiempo (horas)	Secreción de IL-10 (pg / ml)			
	CD	CD + IFN- + LPS	CD/Apo-Nec	CD/Apo-Nec + IFN- + LPS
0 a 6	0	0	0	$38,9 \pm 12,2$
6 a 12	0	0	0	0
12 a 18	0	0	0	0
18 a 24	0	0	0	0

Tabla 2: Secreción de IL-10 e IL- 12. Se determinó la concentración (pg / ml) de IL-10 e IL-12, en los sobrenadantes derivados de CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec + IFN- + LPS, CD y CD + IFN- + LPS, a intervalos regulares durante un periodo de 24 hs. Se muestra un experimento representativo de 2. Campisano et al., 2013.

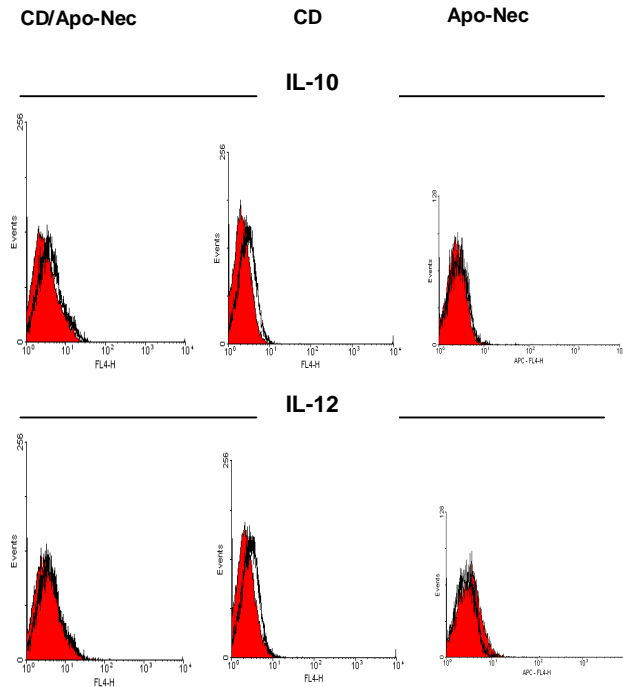


Figura 13: Reservorio intracelular de IL-10 e IL-12. Se determinó en CD/Apo-Nec, CD y Apo-Nec, luego de 24hs de cultivo. Los histogramas vacíos representan el control de isotipo. Se muestra un experimento representativo de 2. Campisano et al., 2013.

2.6. Expresión de citoquinas y quimioquinas en el cultivo heterogéneo de CD y en las fracciones CD⁺ y CD⁻ antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec

En base a resultados previos del laboratorio, a partir de los cuales se observó la formación de una estructura de tejido pseudo-linfoide terciario en el sitio de vacunación con CD/Apo-Nec, nos dispusimos a evaluar la expresión de citoquinas y quimioquinas asociadas a la respuesta inflamatoria y a la formación y manutención de estructuras linfoides terciarias, tanto en el cultivo heterogéneo de CD como en las fracciones CD⁺ y CD⁻, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec. Mediante la técnica de RT-PCR se determinó la expresión de las siguientes citoquinas: IFN- γ , CXCL12, CXCXL-13, CCL-19, CCL21 y LT- . Se empleó β -actina como control de integridad del ADN.

No se encontró expresión de las citoquinas ensayadas en el cultivo de CD, ni antes ni después del co-cultivo con células Apo-Nec (CD y CD/Apo-Nec), sobre un total de 3 experimentos realizados. Sin embargo, las fracciones CD⁺ y CD⁻ fueron

capaces de expresar LT- β , antes y después del co-cultivo. La fracción CD⁺ expresó dicha citoquina en 2 de 4 experimentos realizados, es decir, en un 50% de las determinaciones; CD⁻ la expresó en 2 de 3 experimentos (66%); CD⁺/Apo-Nec la expresó en 1 de 3 experimentos (33%), y CD⁻/Apo-Nec la expresó en 2 de 3 experimentos (66%). En las **Figuras 14 A y B**, se muestran los geles correspondientes a 2 experimentos diferentes donde se observa la expresión de LT- β en las fracciones CD⁺ y CD⁻, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec.

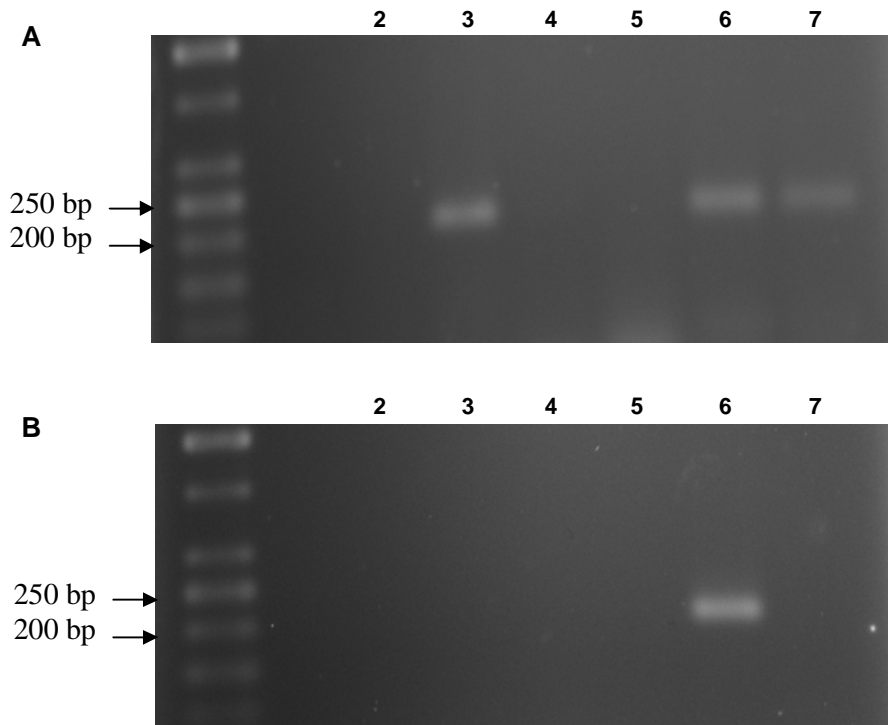


Figura 14: Expresión de LT- β . CD, CD⁺ y CD⁻ co-cultivadas o no con células Apo-Nec, fueron empleadas en ensayos de retrotranscripción (RT)-PCR. La figura muestra las bandas correspondientes a LT- β (209 bp) en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. A: 2: CD, 3: CD⁺, 4: CD⁻, 5: CD/Apo-Nec, 6: CD⁺/Apo-Nec, 7: CD⁻/Apo-Nec. B: 2: CD, 3: CD/Apo.Nec, 4: CD⁺, 5: CD+/Apo-Nec, 6: CD⁻, 7: CD⁻/Apo-Nec.

2.7. Caracterización de los macrófagos y neutrófilos presentes en el cultivo heterogéneo de CD.

Considerando que el cultivo heterogéneo de CD contiene una importante proporción de macrófagos y neutrófilos, se procedió determinar el subtipo de dichas células, con la intención de clasificarlas en M1 / N1 o M2 / N2. Para ello, se midió *in vitro* la producción de ON y de urea (como medida de la actividad de la enzima arginasa-1), en cada una de las poblaciones celulares (CD, CD⁺ y CD⁻), antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec.

Después de la separación inmuno-magnética, la fracción CD⁻ enriquecida en macrófagos y neutrófilos, produjo una mayor cantidad de ON respecto a la fracción CD⁺ y a las CD sin seleccionar: CD⁻ vs. CD $p < 0,05$; CD⁻ vs. CD⁺ $p < 0,01$ (**Figura 15 A**). Sin embargo, también produjo una mayor cantidad de urea: CD⁻ vs. CD, $p < 0,01$; CD⁻ vs. CD⁺ $p < 0,001$ (**Figura 15 B**). Después del co-cultivo con Apo-Nec, disminuyó la producción de ON y de urea en la fracción CD⁻, mientras permaneció estadísticamente igual en CD y CD⁺: CD⁻ vs. CD/Apo-Nec (ON) $p < 0,05$; CD⁻ vs. CD⁻/Apo-Nec (urea) $p < 0,05$ (**Figura 15 A y B**).

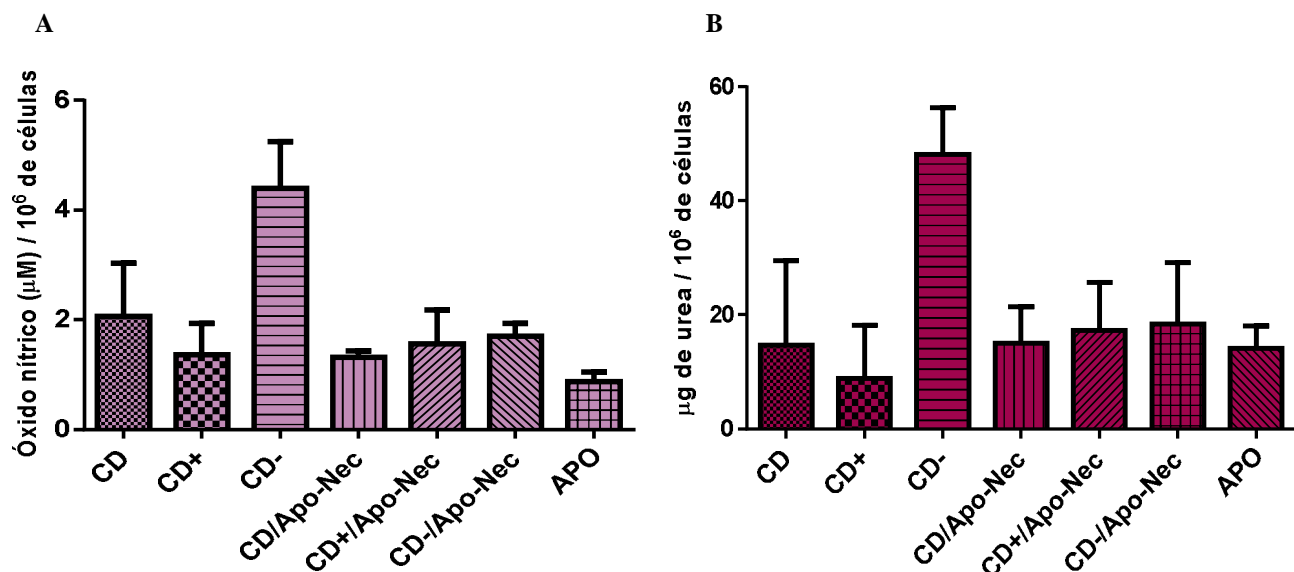


Figura 15: Medición de ON y actividad arginasa-1 *in vitro*. Se determinó la concentración de ON y los μg de urea producidos por CD, CD⁺ y CD⁻, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec. A) Producción de ON respecto a la cantidad de células lisadas; CD vs. CD⁻, $p < 0,05$; CD⁺ vs. CD⁻, $p < 0,01$; CD⁻ vs. CD/Apo-Nec, $p < 0,05$. El gráfico muestra un promedio 2 experimentos. B) μg de urea respecto a la cantidad de células lisadas; CD vs. CD⁻, $p < 0,01$; CD⁺ vs. CD⁻, $p < 0,001$; CD⁻ vs. CD/Apo-Nec, $p < 0,05$. El gráfico muestra un promedio 5 experimentos.

De acuerdo a estos resultados, no hemos detectado una polarización de los macrófagos y neutrófilos derivados del cultivo de precursores de MO hacia un subtipo determinado M1 / N1 u M2 / N2, ni antes ni después del co-cultivo con células Apo-Nec.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO II

Luego de la separación magnética en función de la expresión de CD11c, las fracciones CD⁺ y CD⁻ mostraron una capacidad similar para fagocitar y endocitar antígenos; y a partir de los resultados presentados en el capítulo anterior se pudo observar que estas fracciones también expresaron niveles similares de moléculas de MHC II, CD80, CD83 y CD86. Varias evidencias tienden a resaltar a las CD CD11c⁺ como APCs profesionales para generar una respuesta inmune mediada por LTs, y a los macrófagos como APCs que participan amplificando esa respuesta iniciada por las CD. Asimismo, existen evidencias de que los neutrófilos pueden interactuar con LTs e incluso, inducir la maduración de CD (Ellis and Beaman, 2004; Van Gisbergen et al., 2005; Culshaw et al., 2008; Kumar and Sharma, 2010; Beauvillain et al., 2010; Abi Abdallah et al., 2011). Considerando que todos los subtipos celulares mencionados anteriormente están presentes en el cultivo de CD, con capacidades similares para captar antígenos y habilidad potencial para cooperar unas con otras, posiblemente todas las células presentes en la vacuna CD/Apo-Nec sean necesarias para inducir protección.

A partir de los ensayos de actividad aloestimuladora hemos podido determinar que las células presentes en la fracción CD⁺ serían las más potentes para estimular LTs. Sin embargo, llamativamente encontramos que luego del co-cultivo, las fracciones CD⁺ y CD⁻ disminuyeron su capacidad estimuladora. Ciertos autores han informado que las células apoptóticas pueden secretar citoquinas inmunosupresoras mientras mueren, tales como IL-10, y de esta forma afectar la actividad aloestimuladora (Steinman, 2000; Sauter et al., 2000). Sin embargo, a partir de los resultados obtenidos en los experimentos de producción de IL-10 e IL-12, hemos podido confirmar que nuestra mezcla de células apoptóticas y necróticas (Apo-Nec) no secreta IL-10 luego de un lapso de 24 hs de cultivo; por lo cual la disminución en la capacidad estimuladora de las fracciones CD⁺ y CD⁻ luego del co-cultivo, observada en los experimentos de proliferación con LTs alogeneicos no se debería a la posibilidad mencionada anteriormente. Además, como no se detectó IL-12 ni en los sobrenadantes ni intracelularmente, consideramos que la protección obtenida con la vacuna CD/Apo-Nec es independiente de la habilidad de la vacuna para secretar esta citoquina al momento de ser administrada en los animales.

Los resultados de los experimentos de actividad estimuladora antígeno-específica, con LTs provenientes de ratones OT-2, indicarían que las CD sin seleccionar y las fracciones celulares CD⁺ y CD⁻, aún siendo capaces de expresar

MHC II (Capítulo I), no estarían presentando Ags de células Apo-Nec-Ova, *in vitro*, en dicho contexto, lo cual también podría estar de acuerdo con la falta de producción de IL-12 y expresión de IFN- γ durante el co-cultivo.

En base a estos resultados, y a estudios previos realizados por el grupo de trabajo, a partir de los cuales se ha podido determinar que tanto los LTs CD4⁺ como CD8⁺ fueron requeridos para generar la respuesta anti-tumoral alcanzada, consideramos que el desplazamiento del balance Th1 / Th2 hacia una respuesta inflamatoria Th1 estaría ocurriendo luego de completar el esquema de vacunación, en el sitio de administración de dicha vacuna.

Debido a que los macrófagos y neutrófilos son células clave en la respuesta inmune, su activación responde y a su vez influencia otros componentes del sistema inmune. En los tejidos, los fagocitos mononucleares responden al ambiente con la adquisición de distintos fenotipos funcionales. Los macrófagos pueden adquirir una activación clásica o M1, en respuesta al estímulo con IFN- γ , o una activación alternativa o M2, en respuesta al estímulo con IL-4 / IL-13 (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012). El fenotipo M1 está caracterizado por la expresión de elevados niveles de citoquinas pro-inflamatorias y moléculas efectoras, tales como IL-12, IL-23, TNF- α , iNOS y MHC I / II, la elevada producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno, la inducción de una respuesta Th1, y una potente actividad microbicida y tumoricida. En contraste, los macrófagos M2 están caracterizados por la expresión de una variedad de moléculas anti-inflamatorias, tales como IL-10, TGF- β , y arginasa-1. Están involucrados en la inmunidad contra parásitos, inducción de la remodelación del tejido, progresión tumoral y funciones inmunoregulatorias (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012). Los macrófagos M1 y M2 representan extremos de un continuo, en un universo de estados de activación, y la polarización del fenotipo M1/M2 puede ser revertida, tanto *in vitro* como *in vivo* (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012). Se ha informado que los neutrófilos también pueden adquirir un fenotipo pro-tumoral o N2 en respuesta a TGF- β , caracterizado por una elevada expresión de arginasa-1; y que en contraste, la inhibición de TGF- β promueve la reprogramación de los neutrófilos hacia un fenotipo N1, caracterizado por una gran actividad citotóxica, elevada capacidad para producir peróxido de hidrógeno, elevada expresión de TNF e ICAM1; y una menor expresión de arginasa-1 (Fridlender et al., 2009; Dumitru et al., 2013).

A partir de los resultados obtenidos, no hemos detectado *in vitro* una polarización de los macrófagos y neutrófilos derivados del cultivo de precursores de médula ósea con GM-CSF, hacia un fenotipo determinado M1 / N1 o M2 / N2, ni antes

ni después del co-cultivo con células Apo-Nec, lo cual implica que tampoco se estaría inyectando con la vacuna CD/Apo-Nec una proporción diferencial de un subtipo de macrófagos y neutrófilos. Esto es comprensible si consideramos que además de no haberse detectado expresión de IFN- γ mediante RT-PCR (uno de los tres principales estímulos reconocidos hasta hoy, asociados a la activación M1) (Martinez and Gordon, 2014), tampoco hemos detectado secreción ni reservorios intracelulares de IL-10 e IL-12, en las CD y en las CD/Apo-Nec luego de 24 horas de incubación.

Aunque las CD son conocidas principalmente por su función como células presentadoras de antígenos profesionales (Banchereau and Steinman, 1998), también son una fuente de citoquinas homeostáticas e inflamatorias que pueden atraer LTs y LBs, y por lo tanto contribuir en la homeostasis de los órganos linfoides terciarios (Beatty et al., 2007; GeurtsvanKessel and Lambrecht, 2008). GeurtsvanKessel y colaboradores, demostraron que las CD aisladas del pulmón de ratones con iBALT (una forma específica de órgano linfóide terciario asociado al pulmón luego de la infección con el virus *influenza*) (Moyron-Quiroz et al., 2004; Kocks et al., 2007), dejaban de presentar antígenos a los LTs y se transformaban en una fuente de LT- β y quimioquinas homeostáticas (CXCL-12 y -13 y CCL-19 y -21), conocidas por su contribución en la organización de los órganos linfoides terciarios (GeurtsvanKessel et al., 2009). Debido a que previamente identificamos la neoformación de tejido linfóide terciario en el sitio de inyección de la vacuna CD/Apo-Nec (Mac Keon et al., 2010), nos propusimos evaluar la expresión de diferentes citoquinas asociadas a la respuesta inflamatoria y a la formación y manutención de estructuras linfoides terciarias, con el fin de determinar si las células que componen dicha vacuna, son capaces de expresarlas al momento de ser administrada en los animales. De acuerdo a los resultados obtenidos, concluimos que al momento de inmunizar los ratones la vacuna CD/Apo-Nec no estaría expresando las citoquinas ensayadas. Aunque no se descarta que dicha expresión, al menos de alguna de ellas, esté ocurriendo directamente en el sitio de vacunación. Asimismo, luego de la separación inmuno-magnética, las fracciones CD⁺ y CD⁻, fueron capaces de expresar LT- β , antes y después del co-cultivo con Apo-Nec. Las células presentes en dichas fracciones, al estar separadas de la totalidad cambiarían la regulación de la expresión de LT- β , luego de 24 hs de incubación en el medio condicionado proveniente del cultivo de CD.

LT- β es una proteína de transmembrana de tipo II que proviene de la familia del TNF y forma un complejo heterotrimérico unido a la membrana junto con LT- α (LT $\alpha_1\beta_2$) (Pokholok et al., 1995; Afanasyeva et al., 2014). LT- β está asociada a la respuesta inflamatoria y al desarrollo del tejido linfóide. La señalización mediada por el receptor de LT- β juega un rol crucial en el desarrollo de los órganos linfoides secundarios

(Pokholok et al., 1995; Afanasyeva et al., 2014). LT- β es expresada por varios tipos celulares pero principalmente por linfocitos, células *natural killer* y células inductoras de tejido linfoide (Drutskaya et al., 2010). Sin embargo, existen evidencias que indican que tanto las CD como los neutrófilos son capaces de expresar dicha citoquina (Tecchio et al., 2013; Trez and Ware, 2008; GeurtsvanKessel et al., 2009; Mantovani et al., 2011; Dumitru et al., 2013). Un estudio exhaustivo que empleó un chip de DNA reveló que CD murinas provenientes del bazo producían mRNA de LT- β , y que éste era el que más se expresaba entre todos los mRNA estudiados, en los diferentes subtipos de CD analizadas. Este estudio también reveló que las CD CD8 α^{-} que están reguladas mediante la señalización vía el receptor de LT- β , expresaban niveles de mRNA de LT- β de forma superior (5 a 6 veces), comparado con el subtipo de CD CD8 α^{+} (Trez and Ware, 2008). Considerando que en nuestro cultivo heterogéneo de CD derivado de precursores de médula ósea, cultivados con GM-CSF, no hay linfocitos puesto que no se evidenciaron células CD3 $^{+}$, la expresión de LT- β podría estar ocurriendo por parte de las CD CD11c $^{+}$ presentes en la fracción CD $^{+}$ y por los neutrófilos Ly6-G $^{+}$ presentes en la fracción CD $^{-}$.

CAPÍTULO III

Caracterización del mecanismo de protección anti-tumoral de la vacuna CD/Apo-Nec

Una vez identificadas las principales poblaciones celulares presentes en el cultivo heterogéneo de CD, y evaluadas *in vitro* las propiedades funcionales más relevantes de las CD CD11c⁺ y de las demás células presentes en el cultivo, antes y después del co-cultivo con células Apo-Nec, se procedió a evaluar mediante experimentos *in vivo*, el mecanismo de protección anti-tumoral de la vacuna CD/Apo-Nec. Para ello, se inmunizaron ratones con CD/ApoNec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, y luego se evaluó su capacidad para conferir protección. Además, en aquellos animales no protegidos se evaluó el tamaño y la velocidad de crecimiento de los tumores desarrollados. Asimismo, se evaluaron las poblaciones reclutadas en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, en términos de producción de ON y urea; y las citoquinas y quimioquinas expresadas en respuesta a cada tipo de vacuna, incluyendo IL-10 e IL-12, empleando la técnica de RT-PCR. Por último, se evaluó un posible mecanismo involucrado en la protección alcanzada con CD/Apo-Nec basado en la migración de las células de la vacuna hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, empleando experimentos de proliferación linfocitaria con ratones OT-1.

3.1. Inmunización de ratones C57BL/6. Las fracciones CD⁺ y CD⁻ cooperan para conferir protección *in vivo*

Debido a que las CD representan un cultivo primario constituido por una población heterogénea de células derivadas de precursores de MO, pensamos que la protección lograda con la vacuna CD/Apo-Nec podría deberse exclusivamente a la subpoblación de CD CD11c⁺. Con la intención de determinar si dicha subpoblación era la única responsable de la protección alcanzada *in vivo*, se vacunaron ratones de forma s.c., semanalmente con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec o CD⁻/Apo-Nec, y luego de una semana recibieron un desafío tumoral constituido por células viables de melanoma B16F1 (**Figura 16**).

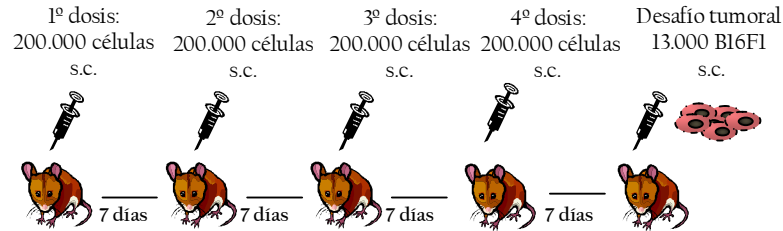


Figura 16: Esquema de vacunación con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec. Los animales recibieron 200.000 células totales de la correspondiente vacuna en 0,1 ml de PBS, vía subcutánea en el flanco inguinal izquierdo. El esquema de vacunación se completó con 4 dosis (1 dosis por semana). Transcurridos 7 días de la última dosis, se administró el desafío tumoral constituido por 13.000 células viables de melanoma murino B16F1, vía subcutánea en el flanco inguinal derecho.

Tal como se muestra en la **Figura 17**, sólo la vacuna CD/Apo-Nec generada con las CD no seleccionadas fue capaz de proteger significativamente los animales del desafío tumoral ($p < 0,01$).

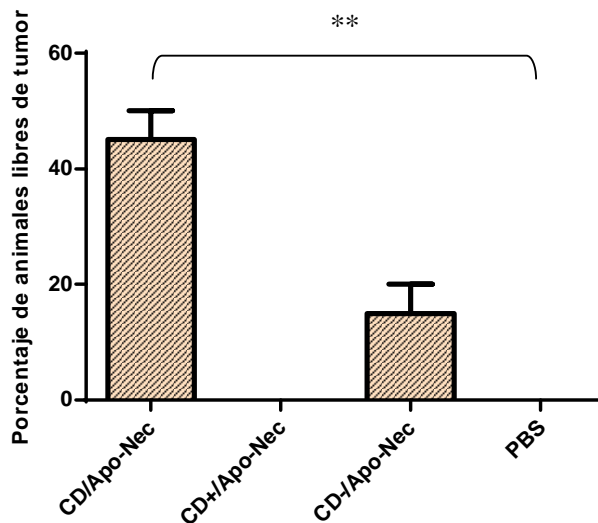


Figura 17: Ensayo de protección *in vivo*. Luego de completar el esquema de vacunación y el desafío tumoral con células viables de melanoma B16F1, los ratones fueron monitoreados día por medio para evaluar el desarrollo de tumores durante 14 semanas. La figura muestra un promedio de 2 experimentos (20 animales por cada grupo vacunado). Se usó PBS como vehículo. El porcentaje promedio de animales libres de tumor vacunados con CD/Apo-Nec luego de 14 semanas fue 45%, CD⁺/Apo-Nec: 0%, CD⁻/Apo-Nec: 15% y PBS: 0%. CD/Apo-Nec vs. PBS, $p < 0,01$, CD/Apo-Nec vs. CD⁺/Apo-Nec, $p < 0,01$; CD/Apo-Nec vs. CD⁻/Apo-Nec, $p < 0,05$.

3.2. Progresión tumoral en ratones no protegidos, inmunizados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec

Con el objetivo de analizar la velocidad de crecimiento y el tamaño de los tumores desarrollados en ratones no protegidos, vacunados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec, CD⁻/Apo-Nec y PBS, los animales fueron examinados periódicamente luego del desafío tumoral. Cuando un tumor fue palpable se midió con un calibre y luego se calculó su volumen (**Figura 18**).

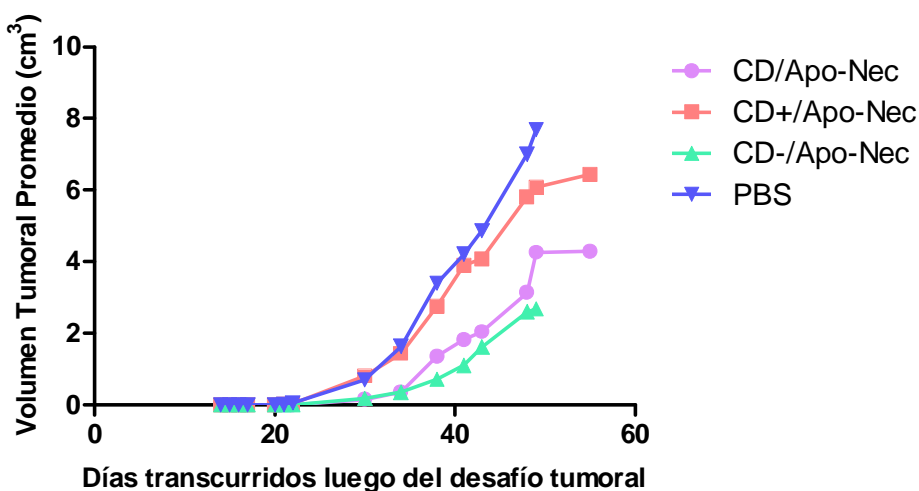


Figura 18: Curva de progresión tumoral en ratones no protegidos, vacunados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec, CD⁻/Apo-Nec o PBS. Los animales fueron examinados periódicamente luego del desafío con células de melanoma B16F1 viables. Los tumores se midieron con un calibre y luego se calculó su volumen empleando la fórmula $d^2 \times D/2$. Cada punto en la curva representa el volumen tumoral promedio.

Se observa una clara tendencia en aquellos animales inmunizados con CD/Apo-Nec, a desarrollar tumores más pequeños y más lentamente en el tiempo respecto de aquellos inyectados con PBS. Transcurridos 49 días del desafío con células de melanoma B16F1, el volumen tumoral promedio desarrollado en aquellos ratones inmunizados con CD⁻/Apo-Nec, fue significativamente menor que el correspondiente a los animales vacunados con PBS ($p < 0,05$). Estos resultados refuerzan la premisa de que las CD CD11c⁺ no serían las únicas responsables de la protección alcanzada *in vivo* con las vacuna CD/Apo-Nec; y que por el contrario, la capacidad de las células que se encuentran en la fracción CD⁻ para cooperar en dicha protección, no sería despreciable.

3.3. Proporción de macrófagos y neutrófilos M1/N1 vs. M2/N2 reclutados en los sitios de vacunación

Considerando que el cultivo heterogéneo de CD contiene macrófagos y neutrófilos, y que resultados previos indican que la estructura de tejido pseudo-linfoide terciario que se forma en el sitio de vacunación en respuesta a la inmunización con CD/Apo-Nec, recluta gran variedad de poblaciones celulares tales como macrófagos y neutrófilos en asociación con LTs CD8⁺ y CD4⁺ (Mac Keon et al., 2010), nos propusimos identificar la proporción de células M1/N1 vs. M2/N2 reclutados en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec. Para ello, se llevó a cabo la determinación de los niveles de ON y de urea cinco días luego de completar el esquema de vacunación. Tal como se observa en la **Figura 19**, las células presentes en los sitios de ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec produjeron mayor cantidad de ON respecto a los animales control vacunados con CD (CD⁺/Apo-Nec vs. CD p< 0,05; CD⁻/Apo-Nec vs. CD p< 0,01); mientras que aquellas presentes en los sitios de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec produjeron ON de forma comparable al control. Respecto a la producción de urea, se observó una tendencia en aquellos ratones inmunizados con CD/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec a mostrar una menor actividad de arginasa-1 en sus sitios de vacunación, respecto al control, aunque esta disminución no alcanzó a ser estadísticamente significativa.

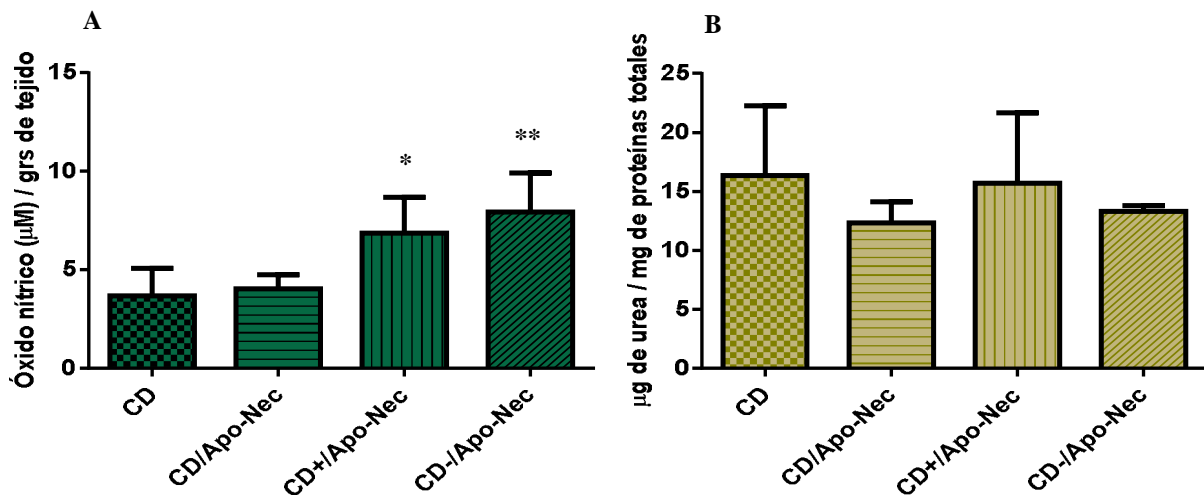


Figura 19: Medición de ON y actividad arginasa-1 *in vivo*. Se determinó la concentración de ON / grs de tejido y los µg de urea / mg de proteínas totales producidos en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec, 5 días luego de completar el esquema de 4 dosis de vacuna. CD: sitio control proveniente de ratones vacunados con CD sin previo estímulo. A)

Producción de ON respecto a los gramos de tejido lisado. B) g de urea producidos respecto a los miligramos de proteínas totales presentes en los sitios. (*) p <0,05, (**) p <0,01. Los gráficos muestran un promedio de 2 experimentos en cada caso.

3.4. Expresión de citoquinas y quimioquinas en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec

Se evaluó la expresión de citoquinas y quimioquinas implicadas en la formación y manutención de estructuras linfoides, y también de aquellas características del perfil Th1 y Th2, en los sitios de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec, 5 días luego de completar el esquema de vacunación. Se emplearon 3 animales por grupo. Aquellos vacunados con CD sin previo estímulo o con PBS fueron empleados como control. Mediante la técnica de RT-PCR se determinó la expresión de: IFN- γ , CXCL12, CXCL-13, CCL-19, CCL21, LT- β , IL-10, IL-12 a e IL-12 b. Se empleó β -actina como control de integridad del ADN. Aquellas muestras que resultaron negativas para la expresión de β -actina no se emplearon para la determinación de las demás citoquinas (un ratón vacunado con CD/Apo-Nec y un ratón vacunado con CD⁺/Apo-Nec).

En el sitio de vacunación de uno de los dos ratones inmunizados con CD/Apo-Nec se evidenció la expresión de LT- β (**Figura 20 A**); mientras que los sitios de ambos ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec expresaron tanto LT- β como IL-10 (**Figura 20 B**). En los sitios de vacunación de los tres ratones inmunizados con CD⁻/Apo-Nec se evidenció la expresión de LT- β ; mientras que dos de ellos expresaron además IL-10 y sólo uno expresó IFN- γ (**Figura 20 C**). Respecto a los animales control, el sitio de inyección de sólo uno de tres ratones que recibió PBS expresó LT- β , como así también el de uno de tres ratones vacunados con CD. Otro de los sitios de animales vacunados con CD expresó CXCL-13 (**Figura 20 D**). Sólo ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec fueron capaces de expresar IL-10.

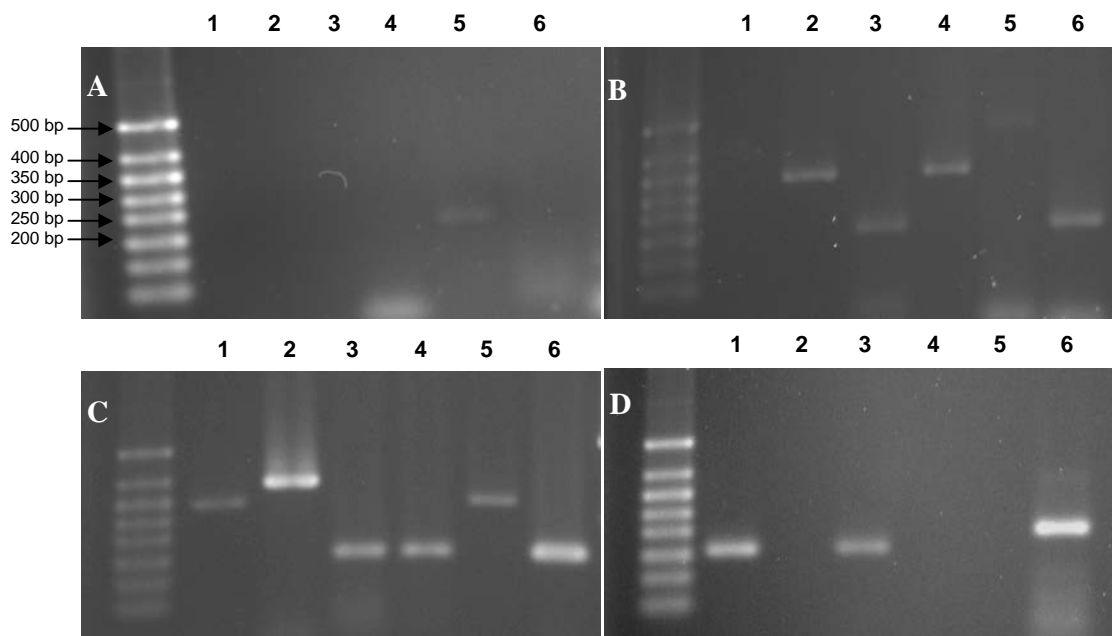


Figura 20: Expresión de citoquinas y quimioquinas en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec. La figura muestra geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, en los cuales se evidencian bandas de ADN obtenido por RT-PCR. A) Ratones inmunizados con CD/Apo-Nec; calle 5: LT- β (sitio 1). B) Ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec; calle 2: IL-10 (sitio 1), calle 3: LT- β (sitio 1), calle 4: IL-10 (sitio 2), calle 6: LT- β (sitio 2). C) Ratones inmunizados con CD⁻/Apo-Nec; calle 1: IL-10 (sitio 1), calle 2: IFN- γ (sitio 1), calle 3: LT- β (sitio 1), calle 4: LT- β (sitio 2), calle 5: IL-10 (sitio 3), calle 6: LT- β (sitio 3). D) Ratones inyectados con PBS; calle 1: LT- β (sitio 1); Ratones inmunizados con CD; calle 3: LT- β (sitio 1), calle 6: CXCL-13 (sitio 2). La expresión de β -actina se empleó como control de integridad del ADN.

3.5. Transporte de antígenos de proteína OVA hacia MO en ratones inmunizados con CD-OVA

Con el objetivo de determinar si parte del mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec podría deberse al transporte de antígenos hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, inicialmente evaluamos la capacidad de células de MO extraídas de ratones previamente inmunizados con una dosis de CD-OVA (CD incubadas *overnight* con proteína OVA), para inducir la proliferación *in vitro* de LTs provenientes de un ratón OT-1. Transcurridas 4 horas luego de la inmunización, las células provenientes de MO de 3 ratones vacunados de forma i.p. fueron capaces de presentar antígenos e inducir una proliferación significativa de LTs (MO 1 vs. CD p <0,001; MO 2 vs. CD p <0,001, MO 3 vs. CD p <0,01) (**Figura 21**). Estos resultados estarían indicando, que las CD que componen la vacuna CD/OVA fueron capaces de

fagocitar proteína OVA *in vitro* y migrar hacia MO *in vivo*, luego de la administración i.p. de la vacuna.

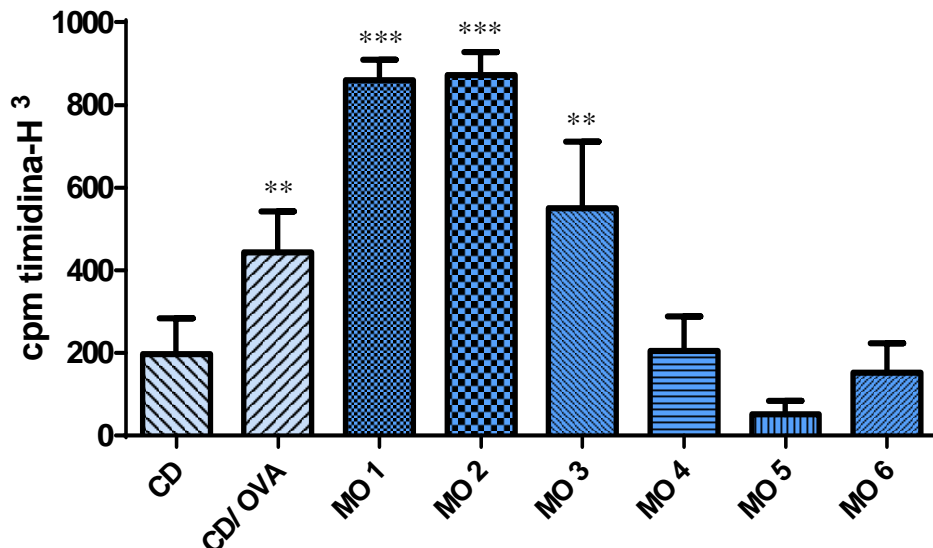


Figura 21: Proliferación de LTs OT-1 en respuesta a células de MO provenientes de ratones vacunados de forma i.p. con CD/OVA, 4 hs post-inyección. Los ratones fueron inyectados con 1 dosis de 200.000 células de vacuna CD/OVA. Luego de 4 hs se extrajo la MO de cada ratón y después de tratarla con mitomicina C, se incubó con LTs. Control negativo: CD sin previo estímulo. Control positivo: CD incubadas con proteína OVA *overnight* (CD/OVA). (**) $p < 0,01$; (***) $p < 0,001$. Se muestran los datos de 2 experimentos.

3.6. Transporte de antígenos de proteína OVA hacia MO en ratones inmunizados con CD/Apo-Nec-Ova

En base a los resultados anteriores y continuando con el objetivo de determinar si parte del mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec podría deberse al transporte de antígenos hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, evaluamos la capacidad de células de MO extraídas de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec-Ova, para inducir la proliferación *in vitro* de LTs provenientes de un ratón OT-1. Las células provenientes del cultivo heterogéneo de CD fueron capaces de fagocitar, procesar y presentar antígenos provenientes de las células Apo-Nec-Ova *in vitro* a LTs de un ratón OT-1 (CD/Apo-Nec-Ova vs. CD $p < 0,01$) (**Figura 22**). Sin embargo, transcurridas 4 horas luego de la inmunización, las células provenientes de las MOs evaluadas fueron incapaces de estimular la proliferación de LTs OT-1 *in vitro*. Por lo

tanto, no se evidenció un transporte de antígenos hacia MO por parte de la vacuna CD/Apo-Nec-OVA. Datos preliminares indican que tampoco estaría ocurriendo dicho transporte de antígenos hacia MO, 24 hs luego de la inmunización.

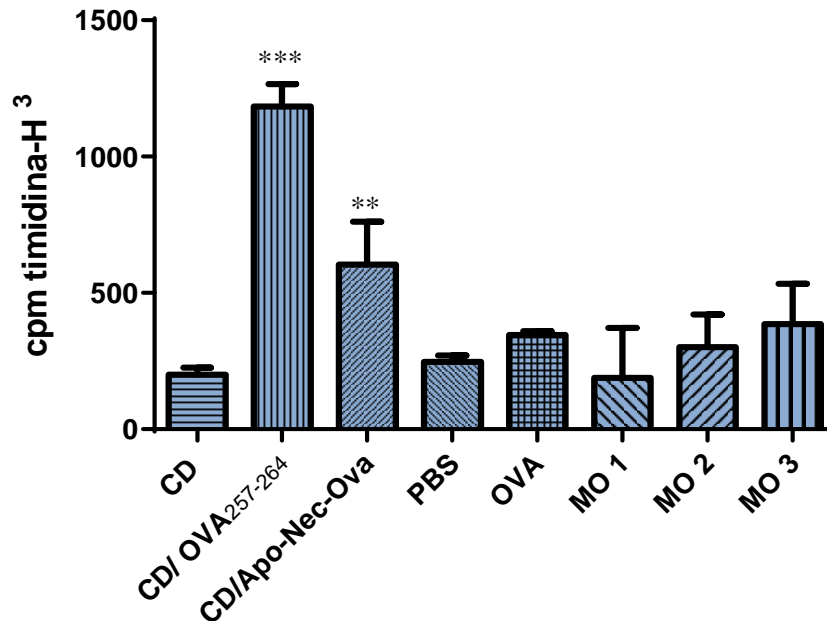


Figura 22: Proliferación de LTs OT-1 en respuesta a células de MO provenientes de ratones vacunados de forma s.c. con CD/Apo-Nec-Ova, 4 hs post-inyección. Los ratones fueron inyectados con 1 dosis de 200.000 células de vacuna CD/Apo-Nec-Ova. Luego de 4 hs se extrajo la MO de cada ratón y después de tratarla con mitomicina C, se incubó con LTs. Controles negativos: CD sin previo estímulo y MO proveniente de ratones inyectados con PBS (vehículo) o proteína OVA (1 µg en 0,1 ml de PBS). Controles positivos: CD incubadas con péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (CD/OVA₂₅₇₋₂₆₄) o co-cultivadas con Apo-Nec-Ova (CD/Apo-Nec-Ova). CD/OVA₂₅₇₋₂₆₄ vs. CD p <0,001; CD/OVA₂₅₇₋₂₆₄ vs. PBS p <0,001; CD/OVA₂₅₇₋₂₆₄ vs. OVA p <0,001; CD/Apo-Nec-Ova vs. CD p <0,01; CD/Apo-Nec-Ova vs. PBS p <0,05. El gráfico muestra un experimento representativo de 2.

DISCUSIÓN DEL CAPÍTULO III

Estudios previos demostraron que luego de la inmunización con CD/Apo-Nec, la mayoría de las células de la vacuna permanecen en el sitio de inyección (Mac Keon et al., 2013). Se detectó allí la formación de una estructura pseudolinfoide terciaria, organizada como una estructura definida, con bordes irregulares y presencia de trabéculas fibroblásticas, en donde se reclutan CD cutáneas (CD207⁺) y no cutáneas CD11c⁺ ^{high}, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células gigantes, en un contexto inflamatorio que podría explicar la protección conferida por CD/Apo-Nec (Mac Keon et al., 2013; Ruiz et al., 2014). Con la intención de poder relacionar la formación de esta estructura con el mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec, se estudió la respuesta inmune generada en los sitios de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec, CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, caracterizando las células allí reclutadas en términos de producción de ON y de urea, y en términos de expresión de citoquinas pro- y/o anti-inflamatorias y quimioquinas asociadas a la manutención de estructuras linfoides, 5 días luego de completar el esquema de vacunación. Se observó que las células reclutadas en los sitios de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec produjeron ON de forma comparable a los sitios control de ratones inmunizados con CD. Asimismo, la producción de urea tendió a ser menor que la registrada en los sitios control, aunque esta disminución no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Tampoco se detectó en los sitios de ratones vacunados con CD/Apo-Nec la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-12 o IFN- γ que sustenten una respuesta inflamatoria local de tipo Th1, responsable de la protección alcanzada. Previamente se había detectado en el sitio de inyección un reclutamiento de células pro-inflamatorias, 24 hs luego de completar el esquema de vacunación, caracterizado por la presencia de CD, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y células gigantes (Mac Keon et al., 2010). Cinco días post-vacunación se podían observar CD en asociación con LTs CD4⁺ y CD8⁺ (Mac Keon et al., 2010). Asimismo, se observó que el reclutamiento de CD CD207⁺ al sitio disminuye en función del tiempo transcurrido luego de la vacunación, siendo marcadamente menor a partir de los 5 días de concluido el esquema; momento en el cual se evidenció un reclutamiento de células migratorias CD207⁺ al ganglio drenante (Ruiz et al., 2014). Tomando en cuenta estos datos previos y los resultados obtenidos en esta tesis, consideramos que 5 días luego de completar el esquema de vacunación ocurre la resolución del cuadro inflamatorio, tendiente a alcanzar un estado de homeostasis interno, y que la respuesta Th1 se produce con anterioridad.

Las CD que se hallan reclutadas en el sitio, formando parte de la estructura pseudolinfoide (Mac Keon et al., 2010), podrían ya no estar presentando antígenos provenientes de células Apo-Nec a LTs, pero sí estar produciendo citoquinas involucradas en la manutención de dicha estructura. Si bien sería necesario estudiar un número mayor de sitios, la expresión de LT- β hallada en uno de los ratones vacunados CD/Apo-Nec podría apoyar esta hipótesis. GeurtsvanKessel y colaboradores, demostraron que las CD aisladas del pulmón de ratones con iBALT, cumplían un rol crucial en el mantenimiento de dicha estructura mucho tiempo después de que el virus fuera erradicado de los pulmones. No encontraron evidencias de presentación antigénica de proteínas virales a LTs por parte de CD CD11b⁺, luego de 4 días de la inyección del virus. Sin embargo, a la vez que dejaron de presentar antígenos a los LTs, se transformaron en una fuente de LT- β y quimioquinas (CXCL-12 y -13 y CCL-19 y -21), conocidas por su contribución en la organización de los órganos linfoides terciarios (GeurtsvanKessel et al., 2009).

Cinco días luego de completar el esquema de vacunación, las células reclutadas en los sitios de ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec produjeron mayores niveles de ON respecto a los animales vacunados con CD y CD/Apo-Nec. La producción de urea fue similar a la registrada en los controles. Asimismo, las células reclutadas en estos sitios, además de expresar LT- β , expresaron la citoquina anti-inflamatoria IL-10. A partir de estos resultados consideramos que una elevada producción ON, que se mantiene así 5 días luego de haber completado el esquema de vacunación, sería perjudicial en el contexto de la protección de la vacuna. El ON es una importante molécula efectora involucrada en numerosos aspectos de la respuesta inmune (Bogdan, 2001). Las CD, incluso las de Langerhans, son capaces de expresar iNOS lo cual reduce su capacidad presentadora de antígenos (Holt et al., 1993; Qureshi et al., 1996; Lu et al., 1996). El ON es un importante mediador soluble de la interacción entre las CD y los LTs activados. Además de inhibir su proliferación puede inducir muerte celular programada en las CD (Bonham et al., 1996). Ciertos autores han demostrado que ratones *knockout* para la enzima iNOS, además de ser más susceptibles a ciertos patógenos, desarrollan respuestas Th1 más fuertes que los ratones *wild type* (Wei et al., 1995; Diefenbach et al., 1998). Ciertos agonistas de TLR pueden inducir la producción de ON en las CD (Nishioka et al., 2003; Wong et al., 2004). Xiong y colaboradores, han demostrado que el ON puede inhibir la secreción de IL-12p40/p70 en modelos murinos (Xiong et al., 2004). Asimismo, en contraste con los macrófagos que carecen de iNOS, las CD derivadas de MO que no producen esta enzima, aumentan la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, tales como TNF- α , IL-6, IL-12p70, e IL-23 (Giordano et al., 2011). Es importante destacar que las MDSCs

CD11b⁺Gr1⁺ suprimen la respuesta inmune mediada por LTs mediante un mecanismo dependiente de ON (Mazzoni et al., 2002; Rössner et al., 2005), y pueden promover el desarrollo de LTs regulatorios (Feng et al., 2008; Verinaud et al., 2014).

Este contexto inmunológico podría estar ocurriendo en los sitios de ratones vacunados con CD⁺/Apo-Nec, a lo cual se sumaría, de acuerdo a los resultados obtenidos, el efecto de la expresión de IL-10 por parte de ciertas células allí reclutadas. Esta citoquina es capaz de convertir CD inmunoestimuladoras en tolerogénicas, e inducir anergia en LTs citotóxicos CD8⁺ (Steinbrink et al., 1999).

De forma similar a lo que ocurrió con posterioridad a la inmunización de ratones con CD⁺/Apo-Nec, 5 días luego de completar el esquema de vacunación con CD⁻/Apo-Nec, las células reclutadas en los sitios produjeron mayores niveles de ON respecto a los animales vacunados con CD y CD/Apo-Nec. La producción de urea tendió a ser menor respecto a los sitios control, aunque esta disminución no alcanzó a ser estadísticamente significativa. Asimismo, las células reclutadas en estos sitios, además de expresar LT-β e IFN-γ, expresaron la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Si las células inyectadas (mayoritariamente macrófagos y neutrófilos), respondieron al microambiente con la adquisición de una activación clásica o M1/N1, a tiempos cortos esta respuesta inflamatoria podría haber sido beneficiosa y explicar la existencia de algunos animales libres de tumor luego de la vacunación con CD/Apo-Nec, y el menor tamaño de los tumores desarrollados en aquellos animales no protegidos. Sin embargo, la elevada producción de ON luego de 5 días de completar el esquema de inmunización no sería beneficioso, pues podría generar un efecto similar al descrito anteriormente luego de la vacunación con CD⁺/Apo-Nec. Además, en este caso también la expresión de IL-10 por parte de ciertas células allí reclutadas, actuaría de forma perjudicial en el contexto de la protección de la vacuna. Ostrand-Rosenberg y colaboradores han reportado que en presencia de IL-10, el contacto directo entre las MDSCs y los macrófagos M1, provoca una disminución en la expresión de MHC II e IL-12, lo cual afecta directamente la capacidad presentadora de antígenos de los macrófagos y las CD (Ostrand-Rosenberg et al., 2012). La expresión conjunta de iNOS y arginasa-1 en los sitios de ratones vacunados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, podría indicar la presencia de MDSCs allí reclutadas. Se sabe que las MDSCs pueden inhibir las funciones citotóxicas de las células NK, LBs y LTs, mediante la expresión de arginasa-1 e iNOS. La enzima arginasa-1 metaboliza el aminoácido L-arginina, el cual es crítico en la activación de los LTs; además de ser el precursor de la producción de ON. Cuando la actividad de iNOS es elevada, y los niveles de L-arginina son bajos, en lugar de producir ON, comienzan a producir ROS y RNOS. Esto resulta en inflamación, anergia de LTs y daño carcinogénico en el ADN (Talmadge, 2007; Gabrilovich and

Nagaraj, 2009; Bronte, 2009; Gallois and Bhardwaj, 2013). La coexpresión de ambas enzimas se considera un marcador molecular de MDSCs inmunosupresoras (Talmadge, 2007).

Todo lo anteriormente expuesto en conjunto, podría explicar la falta de protección alcanzada luego de la vacunación con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec.

Si bien sería necesario estudiar un número mayor de ratones, hemos detectado que todos los sitios de ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec expresaron LT- β . Asimismo, ambas vacunas fueron capaces de expresar dicha citoquina *in vitro*. En base a estos resultados, consideramos que la vacunación con CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec podría inducir la formación de una estructura de tejido pseudolinfoide terciaria en el sitio, al igual que la vacunación con CD/Apo-Nec, pero por el contrario las poblaciones celulares allí reclutadas no actuarían en contra del desarrollo tumoral.

Por otro lado, intentamos determinar si el transporte temprano de antígenos hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, podría ser parte del mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec. La MO representa el principal sitio de *clearance* de neutrófilos en ratones. Cuando se vuelven senescentes, estas células se dirigen hacia MO de una manera dependiente de la quimioquina CXCR-4, y una vez allí son fagocitadas por los macrófagos (Furze and Rankin ^a, 2008; Furze and Rankin ^b, 2008; Rankin, 2010). Duffy y colaboradores, demostraron que los neutrófilos son capaces de transportar antígenos desde la dermis hacia la MO y ganglios linfáticos drenantes, luego de la inyección intradérmica de la vacuna del virus Ankara. Una vez allí, son capaces de estimular la proliferación de clones de LTs CD8⁺, con la ayuda de las APCs mieloides, generando una fuente de LTs CD8⁺ de memoria, específicos contra virus (Duffy et al., 2012). Considerando que nuestro cultivo heterogéneo de CD está enriquecido en CD CD11c⁺, pero contiene además macrófagos y neutrófilos; decidimos poner a prueba el mecanismo descrito por los autores, en el contexto de la vacuna CD/Apo-Nec. Si bien transcurridas 4 horas luego de la inmunización con CD/OVA, las células provenientes de MO de algunos de los ratones fueron capaces de presentar antígenos e inducir una proliferación significativa de LTs OT-1 *in vitro*, no se evidenció migración a MO de las CD co-cultivadas con células Apo-Nec-OVA, ni 4 ni 24 hs luego de la inyección s.c. de 1 dosis de vacuna. Por lo tanto, descartamos que el transporte temprano de antígenos hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, pueda ser parte del mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis y a los datos aportados por experimentos previos realizados en el laboratorio, hemos hipotetizado un mecanismo de acción por medio del cual la vacuna CD/Apo-Nec induciría protección, y uno por

medio del cual la vacunación con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec no protegería a los animales después de administrar el desafío tumoral (**Figuras 23 y 24**). Luego de la inmunización con 4 dosis de vacuna CD/Apo-Nec, se generaría en el sitio de inyección una respuesta inflamatoria de tipo Th1, responsable de la protección alcanzada por la vacuna, cuya resolución ocurriría previo a los 5 días de haber completado el esquema de inmunización, momento en el cual se alcanzaría un estado de homeostasis interno, caracterizado por la ausencia de mediadores pro-inflamatorios, tales como IFN- γ , IL-12 y ON. En el sitio de vacunación (**Figura 23**), los neutrófilos activados provenientes de la vacuna podrían estar liberando factores (Scapini et al., 2000; Bennouna et al., 2003; Ellis and Beaman, 2004; Megiovanni et al., 2006; Kumar and Sharma, 2010; Abi Abdallah et al., 2011), que atraerían y activarían macrófagos, CD, células de Langerhans, y LTs del sistema inmune del hospedador. En presencia de células Apo-Nec, los neutrófilos podrían estar induciendo la maduración de las CD mediante interacciones dependientes de glicosilación entre el antígeno 1 de macrófagos (Mac-1) y DC-SIGN (Van Gisbergen ^a et al., 2005; Van Gisbergen ^b et al., 2005; Ludwig et al., 2006; Park et al., 2012). Las CD CD11c⁺ y los macrófagos inmaduros podrían estar fagocitando células Apo-Nec *in vivo*, luego de lo cual secretarían IL-12 y atraerían más LTs. De esta forma, las APCs que han madurado tanto *in vitro* como *in vivo*, interactuarían con los LTs que alcanzan el sitio de vacunación. Sin embargo, algunas APCs viajarían a los órganos linfoides secundarios para iniciar la activación de LTs naïve. Hemos hipotetizado (**Figura 24**) que transcurridos 5 días luego de completar el esquema de vacunación con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, prevalecería en el sitio de inyección una respuesta inflamatoria crónica que induciría la producción elevada de ON por parte de las CD y células de Langerhans presentes en el sitio (Bonham et al., 1996; Qureshi et al., 1996; Giordano et al., 2010). Esta molécula inhibiría la proliferación de los LTs (Kania et al., 2013) y podría causar muerte celular programada en las CD (Bonham et al., 1996). Asimismo, este contexto pro-inflamatorio podría inducir la expansión de células mieloides inmaduras, y su activación y polarización a MDSCs (Gabrilovich and Nagaraj, 2009), que contribuirían en el sitio con la supresión de la respuesta mediada por LTs, a través de la producción de ON, ROS y la expresión de arginasa-1 conjuntamente (Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Ostrand-Rosenberg and Sinha; 2009; Condamine and Gabrilovich, 2011; Wesolowski et al., 2013). Además, la producción de IL-10 por parte de estas células (Huang et al., 2014), sumada a la que podrían estar generando los macrófagos M2 y N2 reclutados en el sitio (Martinez et al., 2008; Kigerl et al., 2009; Hao et al., 2012; Sica and Mantovani, 2012; Martinez and Gordon, 2014; Mantovani et al., 2011; Dumitru et al., 2013; Tecchio et al., 2013), contribuiría en la conversión de CD inmunoestimuladoras en

tolerogénicas, induciendo anergia de LTs (Steinbrink et al., 1999). Por último, la expresión de arginasa-1 junto a la producción de IL-10, podría inducir el reclutamiento de LTs Regs (Wesolowski et al., 2013) contribuyendo a un microambiente permisivo, que favorecería el desarrollo tumoral luego de la administración de células viables de melanoma murino B16F1.

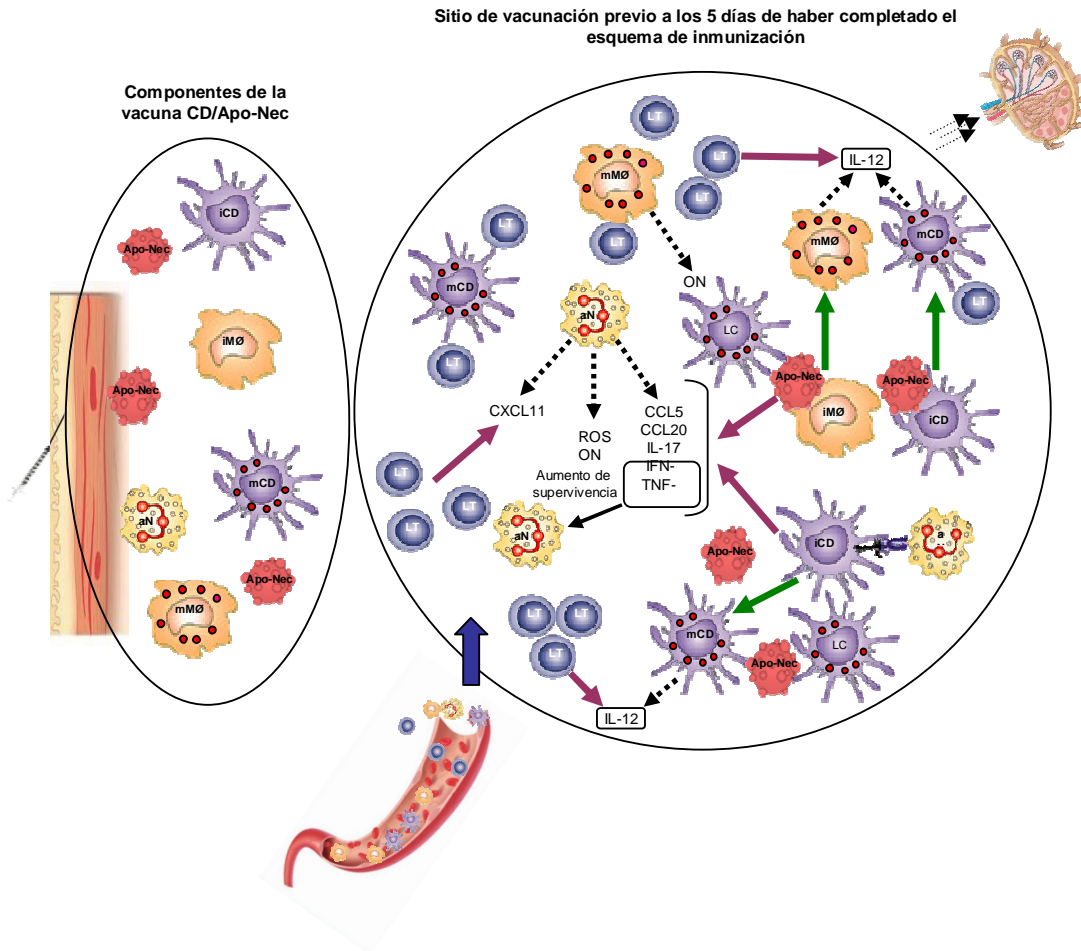


Figura 23: Mecanismo de interacción *in vivo* entre los componentes de la vacuna CD/Apo-Nec y el sistema inmune del hospedador. Sitio de vacunación previo a los 5 días de haber completado el esquema de inmunización: los neutrófilos activados (aN) liberan factores que atraen y activan macrófagos, CD CD11c+, LC y LTs del sistema inmune del hospedador. Esos factores incrementan la supervivencia de los neutrófilos, que inducen la maduración de las CD a través de interacciones dependientes de glicosilación. Las CD CD11c+ inmaduras (iCD), LC y los macrófagos inmaduros iMØ fagocitan células ApoNec, maduran y secretan IL-12. Las APCs que han sido maduras *in vitro* e *in vivo* interactúan con los LTs. Algunas APCs se dirigen hacia los órganos linfoides secundarios. mCD: CD madura; mMØ: macrófago maduro; LC: célula de Langerhans; ROS: especies reactivas de oxígeno; ON: óxido nítrico; flechas punteadas: secreción; flechas verdes: diferenciación; flechas púrpura: reclutamiento; flechas negras no punteadas: inducción.

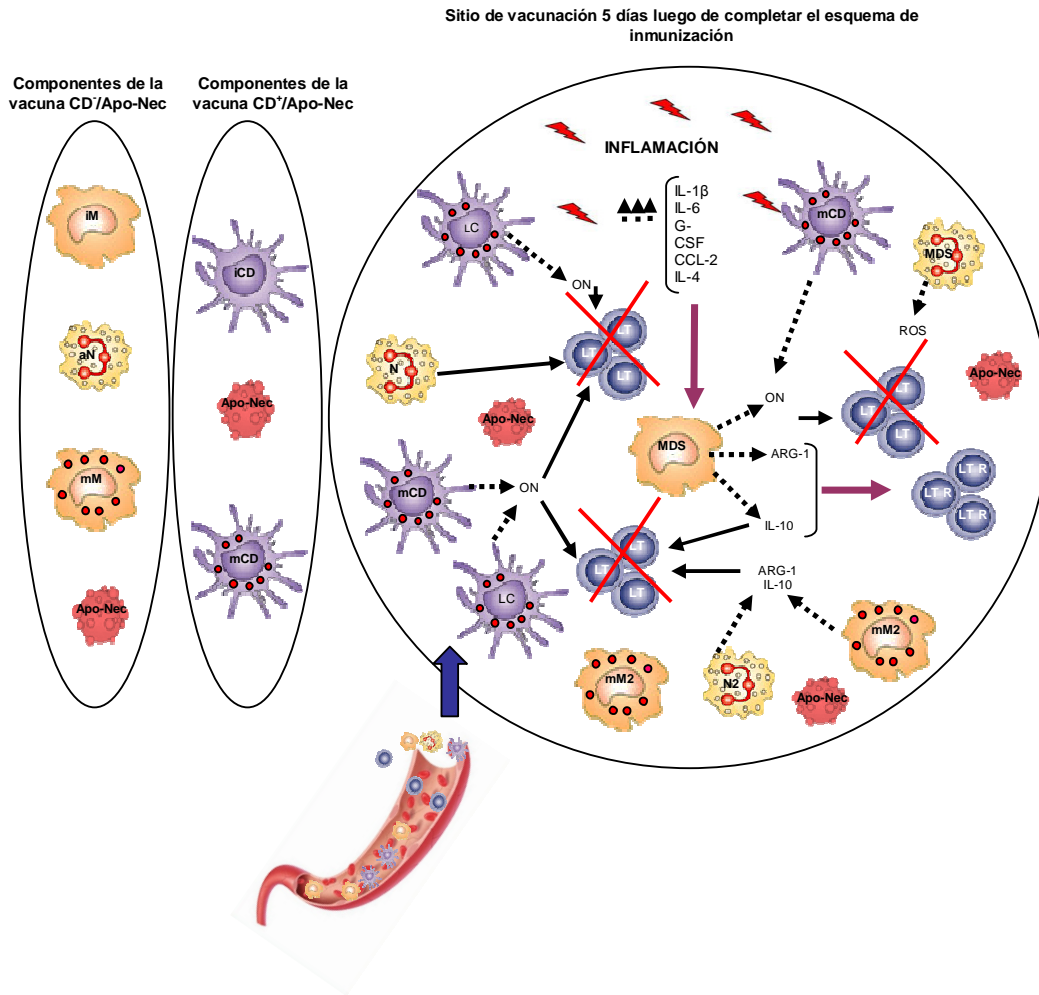


Figura 24: Mecanismo de interacción *in vivo* entre los componentes de la vacuna CD/Apo-Nec o CD+/Apo-Nec y el sistema inmune del hospedador. Sitio de vacunación 5 días luego de completar el esquema de inmunización: en respuesta a estas vacunas se induce una respuesta inflamatoria crónica. Las CD CD11c+ y LC reclutadas en el sitio, producen elevados niveles de ON inhibiendo la proliferación de LTs y causando la apoptosis de las CD. Este contexto pro-inflamatorio induce la expansión de células mieloides inmaduras, y su activación y polarización a MDSCs monocíticas y granulocíticas, que contribuyen en el sitio con la supresión de la respuesta mediada por LTs, a través de la producción de ON, ROS y la expresión de arginasa-1 (ARG-1). La producción de IL-10 por las MDSCs y por los macrófagos M2 (mM2) y neutrófilos N2, contribuye en la conversión de CD inmunostimulatorias en tolerogénicas, induciendo anergia de LTs. La expresión de arginasa-1 junto a la producción de IL-10, induce el reclutamiento de LTs Regs. mCD: CD madura; mM2: macrófago M2; LC: célula de Langerhans; ROS: especies reactivas de oxígeno; ON: óxido nítrico; flechas punteadas: secreción; flechas púrpura: reclutamiento; flechas negras no punteadas: inducción.

En conclusión, presentamos un modelo en el cual cada célula presente en la vacuna es importante para inducir protección *in vivo* a los ratones.

CONCLUSIONES

A partir de los experimentos realizados durante esta Tesis, hemos podido llegar a las siguientes conclusiones:

- El cultivo de precursores de MO durante 7 días con GM-CSF dio lugar al desarrollo de una población heterogénea de células, enriquecida en CD11c⁺ (un 60 % aprox.), y con una proporción significativa de neutrófilos Ly6-G⁺ y macrófagos F4/80⁺.
- Luego de la separación magnética con microesferas magnéticas acopladas a mAb anti-CD11c, aproximadamente el 26,6 % de las células presentes en la fracción CD⁺ co-expresaron los antígenos de superficie CD11c y F4/80, y el 75,4 % resultaron ser doble positivas para CD11c y CD11b. La fracción CD⁺ también expresó Ly6-G. La fracción CD⁻ quedó enriquecida en macrófagos CD11c⁻/F4/80⁺ (44,7 %), algunos de los cuales co-expresaron Ly6G (41,8 %); y en neutrófilos F4/80⁻/Ly6-G⁺ (34,6 %).
- Ambas fracciones CD⁺ y CD⁻ mostraron una capacidad similar para fagocitar y endocitar antígenos, e incluso expresaron niveles de MHC II y moléculas co-estimuladoras CD80, CD83 y CD86, de forma similar al cultivo de CD.
- Las células presentes en la fracción CD⁺ serían las más potentes para estimular LTs. Sin embargo, luego del co-cultivo, las fracciones CD⁺ y CD⁻ disminuyeron su capacidad estimuladora, lo cual no se debería en nuestro sistema, a la secreción de IL-10 por parte de las células Apo-Nec.
- Luego de 24 hs de co-cultivo de las CD con las células Apo-Nec, no se detectó IL-12, ni intracelularmente ni en el sobrenadante; lo cual indicaría que la protección obtenida es independiente de la habilidad de la vacuna para secretar esta citoquina inflamatoria al momento de ser administrada en los ratones.
- El cultivo heterogéneo de CD no fue capaz de expresar las citoquinas y quimioquinas: IFN- γ , LT- α , CXCL-12, CXCL-13, CCL-19 y CCL-21, ni antes ni después del co-cultivo con células Apo-Nec, por lo cual consideramos que la

neoformación de tejido linfoide terciario reportada en el sitio de inyección, sería independiente de la capacidad de las células presentes en vacuna CD/Apo-Nec para expresar dichas moléculas en el momento de inmunizar los animales.

- No detectamos *in vitro* una polarización de los macrófagos y neutrófilos derivados del cultivo de precursores de médula ósea con GM-CSF, hacia un fenotipo determinado M1 / N1 o M2 / N2, ni antes ni después del co-cultivo con células Apo-Nec. Esto podría estar relacionado con la falta de expresión de INF- y de secreción de IL-10 e IL-12 por parte de las células.
- Sólo la vacuna CD/Apo-Nec fue capaz de inducir protección antitumoral en ratones desafiados con células viables de melanoma B16F1 ($p < 0,01$). La vacuna CD/Apo-Nec mantuvo algunos animales libres de tumor pero no de forma significativa.
- Luego de 49 días del desafío con células viables de melanoma B16F1, el volumen tumoral promedio desarrollado en aquellos ratones inmunizados con CD/Apo-Nec, fue significativamente menor que el correspondiente a los animales vacunados con PBS ($p < 0,05$). Estos resultados reforzaron la premisa de que las CD CD11c⁺ no serían las únicas responsables de la protección alcanzada *in vivo* con las vacuna CD/Apo-Nec.
- Las células reclutadas en los sitios de ratones inmunizados con CD/Apo-Nec produjeron ON de forma comparable a los sitios control, 5 días luego de completar el esquema de vacunación. La producción de urea tendió a ser menor que la registrada en los controles. Asimismo, no se evidenció en estos sitios la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, tales como IL-12 o IFN- γ que sustenten una respuesta inflamatoria local de tipo Th1, responsable de la protección alcanzada. Por lo tanto, concluimos que 5 días luego de completar el esquema de vacunación ya habría ocurrido la resolución del cuadro inflamatorio tendiente a alcanzar un estado de homeostasis interno, y que la respuesta inflamatoria Th1 se produciría con anterioridad.
- Una elevada producción de ON, que se mantiene así 5 días luego de haber completado el esquema de vacunación, en los sitios de ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec, sumado a la expresión de IL-10, sería perjudicial en el contexto de la protección de la vacuna.

- Si bien sería necesario estudiar un número mayor de ratones, hemos detectado que todos los sitios de ratones inmunizados con CD⁺/Apo-Nec y CD⁻/Apo-Nec expresaron LT-β. Asimismo, ambas vacunas fueron capaces de expresar dicha citoquina *in vitro*. En base a estos resultados, consideramos que la vacunación con CD⁺/ApoNec y CD⁻/ApoNec podría inducir la formación de una estructura de tejido pseudolinfoide terciaria en el sitio, al igual que la vacunación con CD/Apo-Nec, pero por el contrario las poblaciones celulares allí reclutadas no actuarían en contra del desarrollo tumoral.

- Si bien transcurridas 4 horas luego de la inmunización con CD/OVA, las células provenientes de MO de algunos ratones fueron capaces de presentar antígenos e inducir una proliferación significativa de LTs OT-1 *in vitro*, no se evidenció migración a MO de las CD co-cultivadas con células Apo-Nec-OVA, ni 4 ni 24 hs luego de la inyección s.c. de 1 dosis de vacuna. Por lo tanto, descartamos que el transporte temprano de antígenos hacia MO y posterior *priming* con LTs residentes, pueda ser parte del mecanismo de protección de la vacuna CD/Apo-Nec.

- Los resultados obtenidos indicarían que existe una interacción entre las diferentes poblaciones celulares que conforman el cultivo heterogéneo de CD. Variaciones en el número de dichas poblaciones resultarían en la falta de protección, por lo cual todas las células presentes en la vacuna CD/Apo-Nec serían necesarias para inducir protección contra el melanoma murino B16-F1.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abi Abdallah D.S., Egan C.E., Butcher B.A., Denkers E.Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int Immunol.* 2011; 23(5):317-26.
2. Acharya U.H., Jeter J.M. Clinical Pharmacology: Use of ipilimumab in the treatment of melanoma. *Advances and Applications* 2013; 5(1):21-27.
3. Adotevi O., Vingert B., Freyburger L., Shrikant P., Lone Y.C., Quintin-Colonna F., Haicheur N., Amessou M., Herbelin A., Langlade-Demoyen P., Fridman W.H., Lemonnier F., Johannes L., Tartour E. B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *J. Immunol.* 2007; 179(5):3371-9.
4. Afanasyeva M.A., Britanova L.V., Korneev K.V., Mitkin N.A., Kuchmiy A.A., Kuprash D.V. Clusterin Is a Potential Lymphotoxin Beta Receptor Target That Is Upregulated and Accumulates in Germinal Centers of Mouse Spleen during Immune Response. *PLoS ONE* 2014; 9(5): e98349.
5. Amaria R.N., Lewis K.D., Gonzalez R. Therapeutic options in melanoma: latest developments. *Therapeutics Advances in Medical Oncology* 2011; 3(5):245-251.
6. Anthony P.A., Restito N.P. CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells, immunotherapy of cancer, and interleukin-2. *J Immunother.* 2005; 28:120-128.
7. Aspod C., Leccia M.T., Salameire D., Laurin D., Chaperot L., Charles J., Plumas J. HLA-A(*)0201(+) plasmacytoid dendritic cells provide a cell-based immunotherapy for melanoma patients. *J Invest Dermatol.* 2012; 132:2395-406.
8. Bachem A., Guttler S., Hartung E., Ebstein F., Schaefer M., Tannert A., Salama A., Movassaghi K., Opitz C., Mages H.W., Henn V., Kloetzel P.M., Gurka S., Kroczeck R.A. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *J Exp Med.* 2010; 207:1273-1281.
9. Badiie A., Davies N., McDonald K., Radford K., Michiue H., Hart D., Kato M. Enhanced delivery of immunoliposomes to human dendritic cells by targeting the multilectin receptor DEC-205. *Vaccine* 2007; 25:4757-66.
10. Baitsch L., Legat A., Barba L., Fuertes Marraco S.A., Rivals J.P., Baumgaertner P., Christiansen-Jucht C., Bouzourene H., Rimoldi D., Pircher H., Rufer N., Matter M., Michielin O., Speiser D.E. Extended co-expression of inhibitory receptors by human CD8 T cells depending on differentiation, antigen-specificity and anatomical localization. *PLoS One* 2012; 7:e30852.
11. Balch C.M., Gershenwald J.E., Soong S.J., Thompson J.F., Atkins M.B., Byrd D.R., Buzaid A.C., Cochran A.J., Coit D.G., Ding S., Eggemont A.M., Flaherty K.T., Gimotty P.A., Kirkwood J.M., McMasters K.M., Mihm M.C. Jr, Morton D.L., Ross M.I., Sober A.J., Sondak V.K. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009; 27(36):6199-206.
12. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392:245-252.
13. Barret J.C. Mechanisms of Multistep Carcinogenesis and Carcinogen Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives* 1993; 100:9-20.
14. Bates G.J., Fox S.B., Han C., Leek R.D., Garcia J.F., Harris A.L., Banham A.H. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol.* 2006; 24:5373-5380.

15. Beaty, S.R., Rose C.E. Jr., Sung S.S. Diverse and potent chemokine production by lung CD11b^{high} dendritic cells in homeostasis and in allergic lung inflammation. *J. Immunol.* 2007; 178:1882-1895.
16. Beauvillain C., Delneste Y., Scotet M., Peres A., Gascan H., Guernonprez P., Barnaba V., Jeannin P. Neutrophils efficiently cross-prime naive T cells *in vivo*. *Blood* 2007; 110:2965-2973.
17. Beauvillain C., Cunin P., Doni A., Scotet M., Jaillon S., Loiry M.L., Magistrelli G., Masternak K., Chevailler A., Delneste Y., Jeannin P. CCR7 is involved in the migration of neutrophils to lymph nodes. *Gen Virol.* 2010; 91:2158-66.
18. Bennouna S., Bliss S.K., Curiel T.J., Denkers E.Y. Cross-Talk in the Innate Immune System: Neutrophils Instruct Recruitment and Activation of Dendritic Cells during Microbial Infection. *The Journal of Immunology* 2003; 171:6052-6058.
19. Bercovici N., Haicheur N., Massicard S., Vernel-Pauillac F., Adotevi O., Landais D., Gorin I, Robert C, Prince HM, Grob JJ, Leccia MT, Lesimple T, Wijdenes J, Bartholeyns J, Fridman WH, Salcedo M, Ferries E, Tartour E. Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *J Immunother.* 2008; 31:101-12.
20. Berraondo P., Nouze C., Preville X., Ladant D., Leclerc C. Eradication of large tumors in mice by a tritherapy targeting the innate, adaptive, and regulatory components of the immune system. *Cancer Res.* 2007; 67:8847-55.
21. Biragyn A., Longo D.L. Neoplastic "Black Ops": cancer's subversive tactics in overcoming host defenses. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(1):50-59.
22. Blalock L.T., Landsberg J., Messmer M., Shi J., Pardee A.D., Haskell R., Vujanovic L., Kirkwood J.M., Butterfield L.H. Human dendritic cells adenovirally-engineered to express three defined tumor antigens promote broad adaptive and innate immunity. *Oncoimmunology* 2012; 1:287-357.
23. Blanpain C. Tracing the cellular origin of cancer. *Nature Cell Biology* 2013; 15:126-134.
24. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* 2001; 2:907-916.
25. Bonham C.A., Lu L., Li Y., Hoffman R.A., Simmons R.L., Thomson A.W. Nitric oxide production by mouse bone marrow-derived dendritic cells: implications for the regulation of allogeneic T cell responses. *Transplantation* 1996; 62(12):1871-7.
26. Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002; 196:1627-38.
27. Bonifaz L.C., Bonnyay D.P., Charalambous A., Darguste D.I., Fujii S., Soares H., Brimnes M.K., Moltedo B., Moran T.M., Steinman R.M. *In vivo* targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med.* 2004; 199:815-24.
28. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 2010; 33:657-670.
29. Boxio R., Bossenmeyer C., Steinckwich N., Dournon C., Nube O. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2004; 75:604-11.
30. Brahmer J.R., Tykodi S.S., Chow L.Q., Hwu W.J., Topalian S.L., Hwu P., Drake C.G., Camacho L.H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H.C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K., Chen S., Salay T.M., Alaparthi S., Grosso J.F., Korman A.J., Parker S.M., Agrawal S., Goldberg S.M., Pardoll D.M., Gupta A., Wigginton J.M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med.* 2012; 366:2455-65.
31. Bronte V., Wang M., Overwijk W.W., Surman D.R., Pericle F., Rosenberg S.A., Restifo N.P. Apoptotic death of CD8⁺ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1⁺/Gr-1⁺ cells. *J Immunol.* 1998; 161:5313-5320.

32. Bronte V., Apolloni E., Cabrelle A., Ronca R., Serafini P., Zamboni P., Restifo N.P., Zanovello P. Identification of a CD11b(+)/Gr-1(+)/CD31(+) myeloid progenitor capable of activating or suppressing CD8(+) T cells. *Blood*. 2000; 96:3838-3846.
33. Bronte V. Myeloid-derived supresor cells in inflammation: uncovering cell subsets with enhanced immunosuppressive functions. *Eur J Immunol*. 2009; 39:2670-2672.
34. Burrell R.A., McGranahan N., Bartek J., Swanton C. The causes and consequences of genetic heterogeneity in cancer evolution. *Nature* 2013; 501:338-345.
35. Burkholder B., Huangb R., Burgess R., Luo S., Jones V.S., Zhang W., Lv Z., Gao C., Wang B., Zhang Y., Huang R. Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell network. *Biochimica et Biophysica Acta* 2014; 1845:182-201.
36. Cai X.Y., Gao Q., Qiu S.J., Ye S.L., Wu Z.Q., Fan J., Tang ZY. Dendritic cell infiltration and prognosis of human hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132:293-301.
37. Campisano S., Mac Keon S., Gazzaniga S., Ruiz M.S., Traian M.D., Mordoh J., Wainstok R. Anti-melanoma vaccinal capacity of CD11c-positive and -negative cell populations present in GM-CSF cultures derived from murine bone marrow precursors. *Vaccine* 2013; 31(2):354-61.
38. Cassatella M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol*. 1999; 73:369-509.
39. Cathelin D., Nicolas A., Bouchot A., Fraszczak J., Labbe J., Bonnotte B. Dendritic cell-tumor cell hybrids and immunotherapy: what's next?. *Cytotherapy*. 2011; 13:774-85.
40. Cella M., Facchetti F., Lanzavecchia A., Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol*. 2000; 1:305-310.
41. Chang K.C., Huang G.C., Jones D., Lin Y.H. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell lymphomas correlate with prognoses. *Clin Cancer Res*. 2007; 13:6666-6672.
42. Chang C., Murzaku E.C., Penn L., Abbasi N.R., Davis P.D., Berwick M. Polsky D. More Skin, More Sun, More Tan, More Melanoma. *Am J Public Health*. 2014; 104(11):e92-e99.
43. Chaput N., Conforti R., Viaud S., Spatz A., Zitvogel L. The Janus face of dendritic cells in cancer. *Oncogene* 2008; 27:5920-5931.
44. Cheever M.A., Higanò C.S. PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res*. 2011; 17:3520-6.
45. Chen TR. In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp Cell Res*. 1977; 104(2):255-62.
46. Chen Z., Moyana T., Saxena A., Warrington R., Jia Z., Xiang J. Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 2001; 93:539-48.
47. Chen J, Yao Y., Gong C., Yu F., Su S., Chen J., Liu B., Deng H., Wang F., Lin L., Yao H., Su F., Anderson K.S., Liu Q., Ewen M.E., Yao X., Song E. CCL18 from tumor-associated macrophages promotes breast cancer metastasis via PITPNM3. *Cancer Cell* 2011; 19(4):541-555.
48. Chen X., Liu Z., Huang Y., Li R., Zhang H., Dong S., Ge C., Zhang Z., Wang Y., Wang Y., Xue Y., Li Z., Song X. Superior anti-tumor protection and therapeutic efficacy of vaccination with dendritic cell/tumor cell fusion hybrids for murine Lewis lung carcinoma. *Autoimmunity* 2014; 47(1):46-56.
49. Chiang C.L., Kandalaf L.E., Tanyi J., Hagemann A.R., Motz G.T., Svoronos N., Montone K., Mantia-Smaldone G.M., Smith L., Nisenbaum H.L., Levine B.L., Kalos M., Czerniecki B.J., Torigian D.A., Powell D.J. Jr, Mick R., Coukos G. A Dendritic Cell Vaccine Pulsed with Autologous Hypochlorous Acid-Oxidized Ovarian Cancer Lysate Primes Effective Broad Antitumor Immunity: From Bench to Bedside. *Clin Cancer Res*. 2013; 19:4801-4815.

50. Chomarat P., Banchereau J., Davoust J., Palucha A.K. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000; 1:510-14.
51. Chow, A.Y. Cell Cycle Control by Oncogenes and Tumor Suppressors: Driving the Transformation of Normal Cells into Cancerous Cells. *Nature Education* 2010; 3(9):7.
52. Chung A.S., Wu X., Zhuang G., Ngu H., Kasman I., Zhang J., Vernes J.M., Jiang Z., Meng Y.G., Peale F.V., Ouyang W., Ferrara N. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat. Med.* 2013; 19(9):1114-1123.
53. Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992; 80:2012-2020.
54. Condamine T., Gabrilovich D. Molecular mechanisms regulating myeloid-derived suppressor cell differentiation and function. *Trends Immunol.* 2011; 32(1):19-25.
55. Conrad C., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cells and regulatory T cells in the tumor microenvironment: A dangerous liaison. *Oncoimmunology* 2013; 2:e23887.
56. Constant S.L., Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ T Cell Responses: The Alternative Approaches. *Annual Review of Immunology* 1997; 15:297-322.
57. Copland M.J., Baird M.A., Rades T., McKenzie J.L., Becker B., Reck F., Tyler P.C., Davies N.M. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. *Vaccine* 2003; 21:883-90.
58. Corona R., Mele A., Amini M., De Rosa G., Coppola G., Piccardi P., Fucci M., Pasquini P., Faraggiana T. Interobserver variability on the histopathologic diagnosis of cutaneous melanoma and other pigmented skin lesions. *J Clin Oncol.* 1996; 14(4):1218-1223.
59. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G., Modollell M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods.* 1994; 174(1-2):231-5.
60. Costantini C., Micheletti A., Calzetti F., Perbellini O., Pizzolo G., Cassatella M.A. Neutrophil activation and survival are modulated by interaction with NK cells. *Int Immunol.* 2010; 22(10):827-38.
61. Coventry B.J., Morton J. CD1a-positive infiltrating-dendritic cell density and 5-year survival from human breast cancer, *Br. J. Cancer* 2003; 89(3):533-538.
62. Crozat K., Guiton R., Contreras V., Feuillet V., Dutertre C.A., Ventre E., Vu Manh T.P., Baranek T., Storset A.K., Marvel J., Boudinot P., Hosmalin A., Schwartz-Cornil I., Dalod M. The XC chemokine receptor 1 is a conserved selective marker of mammalian cells homologous to mouse CD8alpha+ dendritic cells. *J Exp Med.* 2010; 207:1283-1292.
63. Cruz L.J., Tacke P.J., Pots J.M., Torensma R., Buschow S.I., Figdor C.G. Comparison of antibodies and carbohydrates to target vaccines to human dendritic cells via DC-SIGN. *Biomaterials* 2012; 33:4229-39.
64. Cua D. J., Tato C. M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Rev. Immunol.* 2010; 10:479-489.
65. Culshaw S., Millington O.R., Brewer J.M., McInnes I.B. Murine neutrophils present class II restricted antigen. *Immunol Lett.* 2008; 118:49-54.
66. Curiel T.J., Coukos G., Zou L., Alvarez X., Cheng P., Mottram P., Evdemon-Hogan M., Conejo-Garcia J.R., Zhang L., Burow M., Zhu Y., Wei S., Kryczek I., Daniel B., Gordon A., Myers L., Lackner A., Disis M.L., Knutson K.L., Chen L., Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 2004; 10(9):942-949.
67. Daud A.I., Mirza N., Lenox B., Andrews S., Urbas P., Gao G.X., Lee J.H., Sondak V.K., Riker A.I., Deconti R.C., Gabrilovich D. Phenotypic and functional analysis of dendritic cells and clinical outcome in patients with high-risk melanoma treated with adjuvant granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Clin Oncol.* 2008; 26:3235-3241.
68. De Matos P., Abdel-Wahab Z., Vervaert C., Hester D., Seigler H. Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice. *J Surg Oncol.* 1998; 68:79-91.

69. De Monte L., Reni M., Tassi E., Clavenna D., Papa I., Recalde H., Braga M., Di Carlo V., Doglioni C., Protti M.P. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *JEM* 2011; 208(3):469-478.
70. DeNardo D.G., Coussens L.M. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progresión. *Breast Cancer Res.* 2007; 9:212-222.
71. DeNardo D.G., Andreu P., Coussens L.M. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev.* 2010; 29(2):309-316.
72. Diefenbach A., Schindler H., Donhauser N., Lorenz E., Laskay T., MacMicking J., Rollinghoff M., Gresser I., Bogdan C. Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* 1998; 8:77-87.
73. Dieu-Nosjean M.C., Antoine M., Danel C., Heudes D., Wislez M., Poulot V., Rabbe N., Laurans L., Tartour E., de Chaisemartin L., Lebecque S., Fridman W.H., Cadranel J. Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *J Clin Oncol.* 2008; 26:4410-4417.
74. Di Paola R.S., Plante M., Kaufman H., Petrylak D.P., Israelí R., Lattime E., Manson K., Schuetz T. A phase I trial of pox PSA vaccines (PROSTVAC-VF) with B7-1, ICAM-1, and LFA-3 costimulatory molecules (TRICOM) in patients with prostate cancer. *J Transl Med.* 2006; 4:1.
75. Di Trolío R., Simeone E., Di Lorenzo G., Grimaldi A.M., Romano A., Ayala F., Caracò C., Mozzillo N., Ascierto P.A. Update on PEG-interferon α -2b as adjuvant therapy in melanoma. *Anticancer Res.* 2012; 32(9):3901-9.
76. Drutskaya M.S., Efimov G.A., Kruglov A.A. Kuprash D.V., Nedospasov S.A. Tumor Necrosis Factor, Lymphotoxin and Cancer. *IUBMB Life* 2010; 62(4): 283-289.
77. Duffy D., Perrin H., Abadie V., Benhabiles N., Boissonnas A., Liard C., Descours B., Reboulleau D., Bonduelle O., Verrier B., Van Rooijen N., Combadière C., Combadière B. Neutrophils transport antigen from the dermis to the bone marrow, initiating a source of memory CD8⁺ T cells. *Immunity* 2012; 37(5):917-29.
78. Dumitru C.A., Lang S., Brandau S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progresión. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23(3):141-148.
79. Dunn G.P., Sheehan K.C., Old L.J., Schreiber R.D. IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expresión. *Cancer Res.* 2005; 65:3447-3453.
80. DuPage M., Mazumdar C., Schmidt L.M., Cheung A.F., Jacks T. Expression of tumour-specific antigens underlies cancer immunoediting. *Nature* 2012; 482(7385):405-409.
81. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front Immunol.* 2013; 4:111.
82. Egeblad M., Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:161-174.
83. Ellis T.N., Beaman B.L. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology.* 2004; 112(1): 2-12.
84. Erickson C., Miller S.J. Treatment options in melanoma in situ: topical and radiation therapy, excision and Mohs surgery. *International Journal of Dermatology* 2010; 49:482-491.
85. Errington F., Jones J., Merrick A., Bateman A., Harrington K., Gough M., O'Donnell D., Selby P., Vile R., Melcher A. Fusogenic membrane glycoprotein-mediated tumour cell fusion activates human dendritic cells for enhanced IL-12 production and T-cell priming. *Gene Ther.* 2006; 13:138-49.
86. Ethuin F., Gérard B., Benna J.E., Boutten A., Gougereot-Pocidaló M.A., Jacob L., Chollet-Martin S. Human neutrophils produce interferon γ upon stimulation by interleukin-12. *Lab. Invest.* 2004; 84:1363-1371.

87. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C., Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death and Differentiation*. 2002; 9:1069-1077.
88. Fang H., Ang B., Xu X., Huang X., Wu Y., Sun Y., Wang W., Li N., Cao X., Wan T. TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cell Mol Immunol*. 2013; 11(2):150-9.
89. Feng G., Gao W., Strom T. B., Oukka M., Francis R. S., Wood K. J., Bushell A. Exogenous IFN- γ ex vivo shapes the alloreactive T-cell repertoire by inhibition of Th17 responses and generation of functional Foxp3⁺ regulatory T cells. *Eur. J. Immunol*. 2008; 38:2512-2527.
90. Fernandez N.C., Lozier A., Flament C., Ricciardi-Castagnoli P., Bellet D., Suter M., Perricaudet M., Tursz T., Maraskovsky E., Zitvogel L. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*. 1999; 5:405-11.
91. Fidler I.J., Nicolson G.L. Tumor cell and host properties affecting the implantation and survival of blood-borne metastatic variants of B16 melanoma. *Isr J Med Sci*. 1978; 14(1):38-50.
92. Flaherty K.T., Infante J.R., Daud A., Gonzalez R., Kefford R.F., Sosman J., Hamid O., Schuchter L., Cebon J., Ibrahim N., Kudchadkar R., Burris H.A. 3rd, Falchook G., Algazi A., Lewis K., Long G.V., Puzanov I., Lebowitz P., Singh A., Little S., Sun P., Allred A., Ouellet D., Kim K.B., Patel K., Weber J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med*. 2012; 367(18):1694-703.
93. Flemming A. Cancer: PD1 makes waves in anticancer immunotherapy. *Nature*. 2014; 11:601.
94. Fourcade J., Sun Z., Benallaoua M., Guillaume P., Luescher I.F., Sander C., Kirkwood J.M., Kuchroo V., Zarour HM. Up regulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8⁺ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* 2010; 207:2175-86.
95. Fridlender Z.G., Sun J., Kim S., Kapoor V., Cheng G., Ling L., Worthen G.S., Albelda S.M. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- β : "N1" versus "N2" TAN. *Cancer Cell* 2009; 16:183-194.
96. Fucikova J., Kralikova P., Fialova A., Brtnicky T., Rob L., Bartunkova J., Spisek R. Human tumor cells killed by anthracyclines induce a tumor-specific immune response. *Cancer Res*. 2011; 71:4821-33.
97. Furihata M., Ohtsuki Y., Sonobe H., Araki K., Ogata T., Toki T., Ogoshi S., Tamiya T. Prognostic significance of simultaneous infiltration of HLA-DR-positive dendritic cells and tumor infiltrating lymphocytes into human esophageal carcinoma. *Tohoku J Exp Med*. 1993; 169:187-195.
98. Furze R.C., ^a Rankin S.M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 2008; 125(3):281-8.
99. Furze R.C., ^b Rankin S.M. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J*. 2008; 22(9):3111-9.
100. Gabrilovich D., Ishida T., Oyama T., Ran S., Kravtsov V., Nadaf S., Carbone DP. Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood* 1998; 92:4150-4166.
101. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived supresor cells as reguladors of the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2009; 9:162-74.
102. Gallois A., Bhardwaj N. Dendritic cell-targeted approaches to modulate immune dysfunction in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology*. 2013; 4(436):1-8.

103. Galluzzi L., Senovilla L., Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C. Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. Trial watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology* 2012; 1:1111-1134.
104. Gao Q., Qiu S.J., Fan J. Zhou J., Wang X.Y., Xiao Y.S., Xu Y., Li Y.W., Tang Z.Y. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol.* 2007; 25:2586-2593.
105. Garcia-Vallejo J.J., Unger W.W., Kalay H., van Kooyk Y. Glycan-based DC-SIGN targeting to enhance antigen cross-presentation in anticancer vaccines. *Oncoimmunology* 2013; 2:e23040.
106. Gazzaniga S., Bravo A.I., Guglielmotti A., van Rooijen N., Maschi F., Vecchi A., Mantovani A., Mordoh J. and Wainstok R. Targeting Tumor-Associated Macrophages and Inhibition of MCP-1 Reduce Angiogenesis and Tumor Growth in a Human Melanoma Xenograft. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127:2031-2041.
107. Geng S., Matsushima H., Okamoto T., Yao Y., Lu R., Page K., Blumenthal R.M., Ward N.L., Miyazaki T., Takashima A. Emergence, origin, and function of neutrophil–dendritic cell hybrids in experimentally induced inflammatory lesions in mice. *Blood* 2013; 121(10):1690-1700.
108. Gerl R., Vaux D.L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis.* 2005; 26(2):263-270.
109. GeurtsvanKessel, C.H., Lambrecht B.N. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol.* 2008; 1:442-450.
110. GeurtsvanKessel C.H., Willart M.A., Bergen I.M., van Rijt L.S., Muskens F., Elewaut D., Osterhaus A.D., Hendriks R., Rimmelzwaan G.F., Lambrecht B.N. Dendritic cells are crucial for maintenance of tertiary lymphoid structures in the lung of influenza virus-infected mice. *J Exp Med.* 2009; 206(11):2339-49.
111. Ghiringhelli F., Puig P.E., Roux S., Parcellier A., Schmitt E., Solary E., Kroemer G., Martin F., Chauffert B., Zitvogel L. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cell proliferation. *J. Exp. Med.* 2005; 202(7):919-929.
112. Gilliet M, Boonstra A, Paturel C, Antonenko S, Xu X, Trinchieri G, O'Garra A., Liu Y.J. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 2002; 195:953-8.
113. Giordano D., Li C, Suthar M.S., Draves K.E., Ma D.Y., Gale M., Jr., Clark E.A. Nitric oxide controls an inflammatory-like Ly6C^{hi}PDCA1⁺ DC subset that regulates Th1 immune responses. *Journal of Leukocyte Biology* 2011; 89:443-455.
114. Gnerlich J.L., Mitchem J.B., Weir J.S., Sankpal N.V., Kashiwagi H., Belt B.A., Porembka M.R., Herndon J.M., Eberlein T.J., Goedegebuure P., Linehan D.C. Induction of Th17 cells in the tumor microenvironment improves survival in a murine model of pancreatic cancer. *J. Immunol.* 2010; 185(7):4063-4071.
115. Godefroy E., Gallois A., Manches O., Jotereau F., Bhardwaj N. Effect of matrix metalloproteinase-2 on antitumor immunity. *Journal of Clinical Oncology* 2012; 30(15):2570.
116. Goldszmid R.S., Idoyaga J., Bravo A.I., Steinman R., Mordoh J., Wainstok R. Dendritic cells charged with apoptotic tumor cells induce long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T cell immunity against B16 melanoma. *J Immunol.* 2003; 171(11):5940-7.
117. Goyne H.E., Cannon M.J. Dendritic cell vaccination, immune regulation, and clinical outcomes in ovarian cancer. *Frontiers in Immunology.* 2013; 4(382):1-6.
118. Griffiths R.W., Elkord E., Gilham D.E. Ramani V., Clarke N., Stern P.L., Hawkins R.E. Frequency of regulatory T cells in renal cell carcinoma patients and investigation of correlation with survival. *Cancer Immunol. Immunother.* 2007; 56:1743-1753.

119. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5):646-74.
120. Hao N-B., Lü M-H., Fan Y-H., Cao Y-L., Zhang Z-R., Yang S-M. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012(948098):1-11.
121. Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J.V., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J Exp Med.* 2001; 194:769-79.
122. Hawryluk E.B., Tsao H. Melanoma: clinical features and genomic insights. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2014; 4(9):a015388.
123. Heath W.R., Carbone F.R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature.* 2013; 14(10):978-985.
124. Higano C.S., Schellhammer P.F., Small E.J., Burch P.A., Nemunaitis J., Yuh L., Provost N., Frohlich M.W. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 2009; 115:3670-9.
125. Higano C.S., Small E.J., Schellhammer P., Yasothan U., Gubernick S., Kirkpatrick P., Kantoff P.W. Sipuleucel-T. *Nat Rev Drug Discov.* 2010; 9:513-4.
126. Hiraoka N., Onozato K., Kosuge T., Hirohashi S. Prevalence of FOXP3(+) regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:5423-5434.
127. Hodi F.S., O' Day S.J., Mc Dermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urban W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med.* 2010; 363:711-23.
128. Holt, P. G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P. G., Kraal, G., Thepen, T. Downregulation of the antigen presenting cell functions of pulmonary dendritic cells *in vivo* by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 1993; 177:397-407.
129. Honig A., Schaller N., Dietl J., Backe J., Kammerer U. S100 as an immunohistochemically-detected marker with prognostic significance in endometrial carcinoma. *Anticancer Res.* 2005; 25(3A):1747-53.
130. Houghton A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. *Cell Cycle* 2010; 9(9):1732-1737.
131. Huang A., Zhang B., Yan W., Wang B., Wei H., Zhang F., Wu L., Fan K., Guo Y. Myeloid-derived suppressor cells regulate immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection through PD-1-induced IL-10. *J Immunol.* 2014; 193(11):5461-9.
132. Huang B., Pan P.Y., Li Q., Sato A.I., Levy D.E., Bromberg J., Divino C.M., Chen S.H. Gr-1⁺ CD115⁺ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res.* 2006; 66:1123-1131.
133. Hume DA. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* 2008; 181:5829-35.
134. Idoyaga J., Fiorese C., Zbytnik L., Lubkin A., Miller J., Malissen B., Mucida D., Merad M., Steinman R.M. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J Clin Invest.* 2013; 123:844-854.
135. Ikeguchi M., Ikeda M., Tatebe S., Maeta M., Kaibara N. Clinical significance of dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 1998; 5:1185-1189.

136. Ishigami S., Aikou T., Natsugoe S., Hokita S., Iwashige H., Tokushige M., Sonoda S. Prognostic value of HLA-DR expression and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55:65-69.
137. Ishigami S., Natsugoe S., Tokuda K., Nakajo A., Xiangming C., Iwashige H., Aridome K., Hokita S., Aikou T. Clinical impact of intratumoral natural killer cell and dendritic cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Lett.* 2000; 159:103-108.
138. Ishigami S., Natsugoe S., Matsumoto M., Okumura H., Sakita H., Nakashima S., Takao S., Aikou T. Clinical implications of intratumoral dendritic cell infiltration in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2003; 10:1237-1240.
139. Ishigami S., Ueno S., Matsumoto M., Okumura H., Arigami T., Uchikado Y., Setoyama T., Arima H., Sasaki K., Kitazono M., Shinchi H., Kijima Y., Natsugoe S. Prognostic value of CD208-positive cell infiltration in gastric cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59:389-395.
140. Iwamoto M., Shinohara H., Miyamoto A., Okuzawa M., Mabuchi H., Nohara T., Gon G., Toyoda M., Tanigawa N. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 2003; 104:92-97.
141. Jamieson T., Clarke M., Steele C.W., Samuel M.S., Neumann J., Jung A., Huels D., Olson M.F., Das S., Nibbs R.J., Sansom O.J. Inhibition of CXCR2 profoundly suppresses inflammation-driven and spontaneous tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 2012; 122(9):3127-3144.
142. Jensen H.K., Donskov F., Nordmark M., Marcussen N., von der Maase H. Increased Intratumoral FOXP3-positive regulatory immune cells during interleukin-2 treatment in metastatic renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:1052-1058.
143. Jensen T.O., Schmidt H., Moller H.J., Donskov F., Hoyer M., Sjoegren P., Christensen I.J., Steiniche T. Intratumoral neutrophils and plasmacytoid dendritic cells indicate poor prognosis and are associated with pSTAT3 expression in AJCC stage I/II melanoma. *Cancer* 2012; 118:2476-2485.
144. Joffre O.P., Segura E., Savina A., Amigorena S. Crosspresentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12:557-569.
145. Jongbloed S.L., Kassianos A.J., McDonald K.J., Clark G.J., Ju X., Angel C.E., Chen C.J., Dunbar P.R., Wadley R.B., Jeet V., Vulink A.J., Hart D.N., Radford K.J. Human CD141+ (BDCA-3)+ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *J Exp Med.* 2010; 207:1247-1260.
146. Jongmans W., Tiemessen. D.M., van Vlodrop I.J., Mulders P.F., Oosterwijk E. Th1- polarizing capacity of clinical-grade dendritic cells is triggered by Ribomunyl but is compromised by PGE2: the importance of maturation cocktails. *J Immunother.* 2005; 28:480-7.
147. Jordanova E.S., Gorter A., Ayachi O. Prins F., Durrant L.G., Kenter G.G., van der Burg S.H., Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8(+)/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients?. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:2028-2035.
148. Jung C.W., Kwon J.H., Seol J.G., Park W.H., Hyun J.M., Kim E.S., Kim S.T., Lee S.J., Kim B.K., Lee Y.Y. Induction of cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells pulsed with murine leukemic cell RNA. *Am J Hematol.* 2004; 75:121-7.
149. Kakeji Y., Maehara Y., Korenaga D., Tsujitani S., Haraguchi M., Watanabe A., Orita H., Sugimachi K. Prognostic significance of tumor-host interaction in clinical gastric cancer: relationship between DNA ploidy and dendritic cell infiltration. *J Surg Oncol.* 1993; 52:207-212.
150. Kandalaf L.E., Powell D.J. Jr., Chiang C.L., Tanyi J., Kim S., Bosch M., Montone K., Mick R., Levine B.L., Torigian D.A., June C.H., Coukos G. Autologous lysate-pulsed dendritic cell vaccination followed by adoptive transfer of vaccine-primed ex vivo co-stimulated T cells in recurrent ovarian cancer. *Oncoimmunology* 2013; 2:e22664.

151. Kania G., Siegert S., Behnke S., Prados-Rosales R., Casadevall A., Lüscher T.F., Luther S.A., Kopf M., Eriksson U., Blyszczuk P. Innate Signaling Promotes Formation of Regulatory Nitric Oxide–Producing Dendritic Cells Limiting T-Cell Expansion in Experimental Autoimmune Myocarditis. *Circulation* 2013; 127:2285-2294.
152. Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., Redfern C.H., Ferrari A.C., Dreicer R., Sims R.B., Xu Y., Frohlich M.W., Schellhammer P.F.; IMPACT Study Investigators. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363:411-22.
153. Katz L.H., Li Y., Chen J-S., Muñoz N.M., Majumdar A., Chen J., Mishra L. Targeting TGF- β signaling in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2013; 17(7):743-760.
154. Kawakami Y., Yaguchi T., Sumimoto H., Kudo-Saito C., Iwata-Kajihara T., Nakamura S., Tsujikawa T., Park J.H., Popivanova B.K., Miyazaki J., Kawamura N. Improvement of cancer immunotherapy by combining molecular targeted therapy. *Front Oncol.* 2013. 3:136.
155. Kessenbrock K., Plaks V., Werb Z. Matriz metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell* 2010; 141:52-67.
156. Kiessling R., Mao Y., Pico de Coaña Y. Myeloid Suppressors Decrease Melanoma Survival by Abating Tumor-Fighting T Cells. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:1401-1403.
157. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J Neurosci.* 2009; 29(43):13435-44.
158. Kim R., Emi M., Tanabe K. Cancer cell immune escape and tumor progression by exploitation of anti-inflammatory and pro-inflammatory responses. *Cancer Biol Ther.* 2005; 4(9):924-33.
159. Kjaergaard J., Shimizu K., Shu S. Electrofusion of syngeneic dendritic cells and tumor generates potent therapeutic vaccine. *Cell Immunol.* 2003; 225:65-74.
160. Klechevsky E., Flamar A.L., Cao Y., Blanck J.P., Liu M., O'Bar A., Agouna-Deciat O., Klucar P., Thompson-Snipes L., Zurawski S., Reiter Y., Palucka A.K., Zurawski G., Banchereau J. Cross-priming CD8+ T cells by targeting antigens to human dendritic cells through DCIR. *Blood* 2010; 116:1685-97.
161. Klechevsky E., Banchereau J. Human dendritic cells subsets as targets and vectors for therapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2013. 1284:24-30.
162. Kobayashi M., Suzuki K., Yashi M., Yuzawa M., Takayashiki N., Morita T. Tumor infiltrating dendritic cells predict treatment response to immunotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2007; 27:1137-1141.
163. Kocks, J.R., Davalos-Misslitz A.C., Hintzen G., Ohl L., Förster R. Regulatory T cells interfere with the development of bronchus associated lymphoid tissue. *J. Exp. Med.* 2007; 204:723-734.
164. Kohrt H.E., Nouri N., Nowels K., Johnson D., Holmes S., Lee P.P. Profile of immune cells in axillary lymph nodes predicts disease-free survival in breast cancer. *PLoS Med.* 2005; 2(9):e284.
165. Koido S., Homma S., Okamoto M., Namiki Y., Takakura K., Uchiyama K., Kajihara M., Arihiro S., Imazu H., Arakawa H., Kan S., Komita H., Ito M., Ohkusa T., Gong J., Tajiri H. Fusions between dendritic cells and whole tumor cells as anticancer vaccines. *Oncoimmunology* 2013; 2:e24437.
166. Kokhaei P., Rezvany M.R., Virving L., Choudhury A., Rabbani H., Osterborg A., Mellstedt H. Dendritic cells loaded with apoptotic tumour cells induce a stronger T-cell response than dendritic cell-tumour hybrids in B-CLL. *Leukemia* 2003; 17:894-9.
167. Kokhaei P., Choudhury A., Mahdian R., Lundin J., Moshfegh A., Osterborg A., Mellstedt H. Apoptotic tumor cells are superior to tumor cell lysate, and tumor cell RNA in induction of autologous T cell response in B-CLL. *Leukemia* 2004; 18:1810-5.

168. Kozo Y., Yukio S., Motoki I., Haruo N., Takashi Y., Atsushi K., Harumi S. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor delays neutrophil apoptosis and primes its function through Ia-type phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Leukocyte Biology* 2002; 72:1020-1026.
169. Krause P., Singer E., Darley P.I., Klebensberger J., Groettrup M., Legler D.F. Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J Leukoc Biol.* 2007; 82:1106-14.
170. Kroemer G., Galluzzi L., Kepp O., Zitvogel L. Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:51-72.
171. Kumar V., Sharma A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *International Immunopharmacology* 2010; 10:1325-1334.
172. Labidi-Galy S.I., Treilleux I., Goddard-Leon S., Combes J.D., Blay J.Y., Ray-Coquard I., Caux C., Bendriss-Vermare N. Plasmacytoid dendritic cells infiltrating ovarian cancer are associated with poor prognosis. *Oncoimmunology.* 2012; 1:380-382.
173. Ladanyi A., Kiss J., Somlai B., Gilde K., Fejos Z., Mohos A., Gaudi I., Tímár J. Density of DC-LAMP(+) mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56:1459-1469.
174. Lee A.W., Truong T., Bickham K., Fonteneau J.F., Larsson M., Da Silva I. Somersan S., Thomas E.K., Bhardwaj N. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 2002; 20(4):A8-A22.
175. Lee J.J., Foon K.A., Mailliard R.B., Muthuswamy R., Kalinski P. Type1-polarized dendritic cells loaded with autologous tumor are a potent immunogen against chronic lymphocytic leukemia. *J Leukoc Biol.* 2008; 84:319-25.
176. Lee J., Boczkowski D., Nair S. Programming human dendritic cells with mRNA. *Methods Mol Biol.* 2013; 969:111-25.
177. Le Mercier I., Poujol D., Sanlaville A., Sisirak V., Gubert M., Durand I., Dubois B., Treilleux I., Marvel J., Vlach J., Blay J.Y., Bendriss-Vermare N., Caux C., Puisieux I., Goutagny N. Tumor promotion by intratumoral plasmacytoid dendritic cells is reversed by TLR7 ligand treatment. *Cancer Res.* 2013; 73:4629-4640.
178. Li M., You S., Ge W., Ma S., Ma N., Zhao C. Induction of T-cell immunity against leukemia by dendritic cells pulsed with total RNA isolated from leucemia cells. *Chin Med J (Engl).* 2003; 116:1655-61.
179. Lipkin M. Dietary, Environmental and Hereditary Factors in the Development of Colorectal Cancer. *Cancer Journal for Clinicians* 1979; 29(5):291-299.
180. Liu B.Y., Chen X.H., Gu Q.L., Li J.F., Yin H.R., Zhu Z.G., Lin Y.Z. Antitumor effects of vaccine consisting of dendritic cells pulsed with tumor RNA from gastric cancer. *World J Gastroenterol.* 2004; 10:630-3.
181. Liying G., Chaudhuri A., Talmon G., Wisecarver J.L., Wang J. TGF-Beta Suppresses VEGFA-Mediated Angiogenesis in Colon Cancer Metastasis. *Plos One* 2013; 8(3):1-8.
182. Lu L., Bonham C.A., Chambers F.G., Watkins S.C., Hoffman R.A., Simmons R.L., Thomson A.W. Induction of nitric oxide synthase in mouse dendritic cells by IFN- γ , endotoxin, and interaction with allogeneic T cells: nitric oxide production is associated with dendritic cell apoptosis. *J. Immunol.* 1996; 157:3577-3586.
183. Ludwig IS, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Two-way communication between neutrophils and dendritic cells. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6:408-13.
184. Lutz M.B., Kukutsch N., Ogilvie A.L., Rössner S., Koch F., Romani N., Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods.* 1999; 223(1):77-92.
185. Ma Y., Adjemian S., Mattarollo S.R., Yamazaki T., Aymeric L., Yang H., Portela Catani J.P., Hannani D., Duret H., Steegh K., Martins I., Schlemmer F., Michaud M.,

- Kepp O., Sukkurwala A.Q., Menger L., Vacchelli E., Droin N., Galluzzi L., Krzysiek R., Gordon S., Taylor P.R., Van Endert P., Solary E., Smyth M.J., Zitvogel L., Kroemer G. Anticancer chemotherapy induced intratumoral recruitment and differentiation of antigen-presenting cells. *Immunity*. 2013; 38:729-41.
186. 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; 28:8162-8.
187. Mackey M.F., Gunn J.R., Maliszewsky C., Kikutani H., Noelle R.J., Barth R.J. Jr. Dendritic cells require maturation via CD40 to generate protective antitumor immunity. *J Immunol*. 1998; 161:2094-8.
188. Mahidhara R.S. Queiroz De Oliveira P.E. Kohout J. Beer D.G. Lin J. Watkins S.C. Robbins P.D., Hughes SJ. Altered trafficking of Fas and subsequent resistance to Fas-mediated apoptosis occurs by a wild-type p53 independent mechanism in esophageal adenocarcinoma. *J Surg Res*. 2005; 123(2):302-311.
189. Mailliard R.B., Wankowicz-Kalinska A., Cai Q., Wesa A., Hilkens C.M., Kapsenberg M.L., Kirkwood J.M., Storkus W.J., Kalinski P. Alpha-type-1 polarized dendritic cells: a novel immunization tool with optimized CTL-inducing activity. *Cancer Res*. 2004; 64:5934-7.
190. Manches O., Munn D., Fallahi A., Lifson J., Chaperot L., Plumas J., Bhardwaj N. HIV- activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2008; 118:3431-3439.
191. Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature* 2011; 11:519-531.
192. Markowitz J., Wesolowski R., Papenfuss T., Brooks T.R., Carson W.E. Myeloid-derived suppressor cells in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013; 140(1):13-21.
193. Martinez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*. 2008; 1(13):453-461.
194. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 2014; 6:13.
195. Maruyama K, li M, Cursiefen C, Jackson DG, Keino H, Tomita M, Van Rooijen N., Takenaka H., D'Amore P.A., Stein-Streilein J., Losordo D.W., Streilein J.W. Inflammation-induced lymphangiogenesis in the cornea arises from CD11b positive macrophages. *J Clin Invest*. 2005; 115(9):2363-72.
196. Massague J. TGFbeta in cancer. *Cell* 2008; 134:215-30.
197. Matsushima H., Geng S., Lu R., Okamoto T., Yao Y., Mayuzumi N., Kotol P.F., Chojnacki B.J., Miyazaki T., Gallo R.L., Takashima A. Neutrophil differentiation into a unique hybrid population exhibiting dual phenotype and functionality of neutrophils and dendritic cells. *Blood* 2013; 121(10):1677-1689.
198. Mayordomo J.I., Zorina T., Storkus W.J., Zitvogel L., Celluzzi C., Falo L.D., Melief C.J., Ildstad S.T., Kast W.M., Deleo A.B., et al. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med*. 1995; 1:1297-302.
199. Mayordomo J.I., Loftus D.J., Sakamoto H., De Cesare C.M., Appasamy P.M., Lotze M.T., Storkus W.J., Appella E., DeLeo A.B. Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines. *J Exp Med*. 1996; 183:1357-65.
200. Mayordomo J.I., Zorina T., Storkus W.J., Zitvogel L., Garcia-Prats M.D., De Leo A.B., Lotze M.T. Bone marrow derived dendritic cells serve as potent adjuvants for peptide-based antitumor vaccines. *Stem Cells* 1997; 15:94-103.
201. Mazzoni A., Bronte V., Visintin A., Spitzer J. H., Apolloni E., Serafin P., Zanovello P., Segal D. M. Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol*. 2002; 168:689-695.

202. Megiovanni AM, Sanchez F, Robledo-Sarmiento M, Morel C, Gluckman JC, Boudaly S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2006; 79:977-88.
203. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:563-604.
204. Michaud M., Martins I., Sukkurwala A.Q., Adjemian S., Ma Y., Pellegatti P., Shen S., Kepp O., Scoazec M., Mignot G., Rello-Varona S., Tailler M., Menger L., Vacchelli E., Galluzzi L., Ghiringhelli F., di Virgilio F., Zitvogel L., Kroemer G. Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 2011; 334:1573-1577.
205. Miloud T, Hammerling GJ, Garbio N. Review of murine dendritic cells: types, location, and development. *Methods Mol Biol* 2010; 595:21-42.
206. Minami T., Nakanishi Y., Izumi M., Harada T., Hara N. Enhancement of antigen-presenting capacity and antitumor immunity of dendritic cells pulsed with autologous tumor-derived RNA in mice. *J Immunother.* 2003; 26:420-31.
207. Miyagawa S., Soeda J., Takagi S., Miwa S., Ichikawa E., Noike T. Prognostic significance of mature dendritic cells and factors associated with their accumulation in metastatic liver tumors from colorectal cancer. *Hum. Pathol.* 2004; 35(11):1392-1396.
208. Mkrtychyan M., Chong N., Abu Eid R., Wallecha A., Singh R., Rothman J., Khleif S. Anti-PD-1 antibody significantly increases therapeutic efficacy of *Listeria monocytogenes* (Lm)-LLO immunotherapy. *Journal for Immuno Therapy of Cancer* 2013; 1:15-23.
209. Morelli A.E., Thomson A.W. Dendritic cells Under the spell of prostaglandins. *Trends Immunol.* 2003; 24:108-11.
210. Mosmann T.R., Coffman R.L. TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology* 1989; 7:145-173.
211. Moyron-Quiroz, J.E., Rangel-Moreno J., Kusser K., Hartson L. Sprague, F., Goodrich S., Woodland D.L., Lund F.E., Randall T.D. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat. Med.* 2004; 10:927-934.
212. Mullera A.J., Sharmab M.D., Chandlerc P.R., DuHadawaya J.B., Everhardt M.E., Johnson B.A., Kahlerd D.J., Pihkalae J., Peralta Solera A., Munnb D.H., Prendergasta G.C., Mellorc A.L. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune supresión by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Immunology* 2008; 105(44):17073-17078.
213. Munn D.H., Sharma M.D., Lee J.R., Jhaver K.G., Jonson T.S., Keskin D.B., Marshall B., Chandler P., Antonia S.J., Burgess R., Slingluff C.L. Jr, Mellor A.L. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297:1867-1870.
214. Nakakubo Y., Miyamoto M., Cho Y., Hida Y., Oshikiri T., Suzuoki M., Hiraoka K., Itoh T., Kondo S., Katoh H. Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. *Br J Cancer* 2003; 89:1736-1742.
215. Narayanan D.L., Saladi R.N., Fox J.L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology* 2010; 49:978-986.
216. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Rev. Immunol.* 2006; 6:173-182.
217. Ngiow S.F., von Scheidt B., Akiba H., Yagita H., Teng M.W., Smyth M.J. Anti-TIM3 antibody promotes T cell IFN-gamma-mediated antitumor immunity and suppresses established tumors. *CancerRes* 2011; 71:3540-51.

218. Nishioka Y., Wen H., Mitani K., Robbins P. D., Lotze M. T., Sone S., Tahara H. Differential effects of IL-12 on the generation of alloreactive CTL mediated by murine and human dendritic cells: a critical role for nitric oxide. *J. Leukoc. Biol.* 2003; 73:621-629.
219. Noessner E., Brech D., Mendler A.N., Masouris I., Schlenker R., Prinz P.U. Intratumoral alterations of dendritic-cell differentiation and CD8(+) T-cell anergy are immune escape mechanisms of clear cell renal cell carcinoma. *Oncoimmunology* 2012; 1:1451-1453.
220. Oderup C., Cederbom L., Makowska A., Cilio C.M., Ivars F. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology* 2006; 118:240-249.
221. Okada H., Mak T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat. Rev. Cancer.* 2004; 4:592-603.
222. Okuyama T., Maehara Y., Kakeji Y., Tsujitani S., Korenaga D., Sugimachi K. Interrelation between tumor-associated cell surface glycoprotein and host immune response in gastric carcinoma patients. *Cancer* 1998; 82:1468-1475.
223. Oleinika K., Nibbs R.J., Graham G.J., Fraser A.R. Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progresión. *Clinical and Experimental Immunology* 2012; 171:36–45.
224. Ossevoort M.A., Feltkamp M.C., van Veen K.J., Melief C.J., Kast W.M. Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1995; 18:86-94.
225. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009; 182(8):4499-506.
226. Ostrand-Rosenberg S., Sinha P., Beury D.W., Clements V.K. Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells (MDSC), macrophages, and dendritic cells enhances tumor-induced immune supresión. *Semin. Cancer Biol.* 2012; 22(4):275-281.
227. Ott P.A., Henry T., Baranda S.J., Frlita D., Manches O., Bogunovic D., Bhardwaj N. Inhibition of both BRAF and MEK in BRAF (V600E) mutant melanoma restores compromised dendritic cell (DC) function while having differential direct effects on DC properties. *Cancer ImmunolImmunother.* 2013; 62:811-822.
228. Ozören N. El-Deiry W.S. Cell surface Death Receptor signaling in normal and cancer cells. *Semin Cancer Biol.* 2003; 13(2):135-147.
229. Paczesny S., Beranger S., Salzmann J.L., Klatzmann D., Colombo B.M. Protection of mice against leucemia after vaccination with bone marrow-derived dendritic cells loaded with apoptotic leukemia cells. *Cancer Res.* 2001; 61:2386-9.
230. Paglia P., Chiodoni C., Rodolfo M., Colombo M.P. Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J Exp Med.* 1996; 183:317-22.
231. Palucka K., Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12:265-277.
232. Palucka K.,^a Banchereau. Human dendritic cell subsets in vaccination. *J Curr Opin Immunol.* 2013; 25:396-402.
233. Palucka K.,^b Banchereau J. Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity* 2013; 39:38-48.
234. Pan P.Y., Ma G., Weber K.J., Ozao-Choy J., Wang G., Yin B., Divino C.M., Chen S.H. Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer. *Cancer Res.* 2010; 70(1):99-108.
235. Paraiso K.H.T. Fedorenko I.V., Cantini L.P., Munko A.C., Hall M., Sondak V.K., Messina J.L., Flaherty K.T., Smalley K.S.M., et al. Recovery of phospho-ERK activity

- allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy. *British Journal of Cancer* 2010; 102:1724-1730.
236. Park SJ, Burdick MD, Mehrad B. Neutrophils mediate maturation and efflux of lung dendritic cells in response to *Aspergillus fumigatus* germ tubes. *Infect Immunol* 2012; 80(5):1759-65.
237. Pelletier M.,^a Micheletti A., Cassatella M.A. Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 2010; 88:1163-1170.
238. Pelletier M.,^b Maggi L., Micheletti A., Lazzeri E., Tamassia N., Costantini C., Cosmi L., Lunardi C., Annunziato F., Romagnani S., Cassatella M.A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010; 115:335-343.
239. Perrone G., Ruffini P.A., Catalano V. Spino C., Santini D., Muretto P., Spoto C., Zingaretti C., Sisti V., Alessandrini P., Giordani P., Cicetti A., D'Emidio S., Morini S., Ruzzo A., Magnani M., Tonini G., Rabitti C., Graziano F. Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2008; 44:1875-82.
240. Petersen R.P., Carnpa M.J., Sperlazza J. Conlon D., Joshi M.B., Harpole D.H. Jr., Patz E.F. Jr. Tumor infiltrating FOXP3(+) regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage INNSCLC patients. *Cancer* 2006; 107:2866-2872.
241. Pitot H.C., Dragan Y.P. Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *The FASEB Journal* 1991; 5:2280-2286.
242. Platten M., Wick W., Van den Eynde B. Tryptophan Catabolism in Cancer: Beyond IDO and Tryptophan Depletion. *Cancer Res.* 2012; 72(21):5435-5440.
243. Pokholok D.K., Maroulakou I.G., Kuprash D.V., Alimzhanov M.B., Kozlov S.V., Novobrantseva T.I., Turetzkaya R.L., Green J.E., Nedospasov S.A. Cloning and expression analysis of the murine lymphotoxin β gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 674-678.
244. Porgador A., Snyder D., Gilboa E. Induction of antitumour immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol.* 1996; 156:2918-2926.
245. Poulin L.F., Salio M., Griessinger E., Anjos-Afonso F., Craciun L., Chen J.L., Keller A.M., Joffre O., Zelenay S., Nye E., Le Moine A., Faure F., Donckier V., Sancho D., Cerundolo V., Bonnet D., Reis e Sousa C. Characterization of human DNNGR-1+ BDCA3+ leukocytes as putative equivalents of mouse CD8 α + dendritic cells. *J Exp Med.* 2010; 207:1261-1271.
246. Protti M.P., De Monte L. Cross-talk within the tumor microenvironment mediates Th2-type inflammation in pancreatic cancer. *Oncolmmunology* 2012; 1(1):89-91.
247. Qian B.Z., Li J., Zhang H., Kitamura T., Zhang J., Campion L.R., Kaiser E.A., Snyder L.A., Pollard J.W. CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 2011; 475:222-225.
248. Qureshi A.A., Hosoi J., Xu S., Takashima A., Granstein R.D., Lerner E.A. Langerhans Cells Express Inducible Nitric Oxide Synthase and produce Nitric Oxide. *J. Invest. Dermatol* 1996; 107:815-821.
249. Rankin S.M. The bone marrow: a site of neutrophil clearance. *J Leukoc Biol.* 2010; 88(2):241-51.
250. Reichert T.E., Scheuer C., Day R., Wagner W., Whiteside T.L. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer* 2001; 91:2136-2147.
251. Reyes D., Salazar L., Espinoza E., Pereda C., Castellón E., Valdevenito R., Huidobro C., Becker M.I., Lladser A., López M.N. and Salazar-Onfray F. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *British Journal of Cancer* 2013; 109:1488-1497.

252. Rigel D.S., Carucci J.A. Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin.* 2000; 50(4):215-36.
253. Robert C., Ribas A., Wolchok J.D., Hodi F.S., Hamid O., Kefford R., Weber J.S., Joshua A.M., Hwu W.J., Gangadhar T.C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R.W., Boasberg P., Chmielowski B., Mateus C., Postow M.A., Gergich K., Ellassaiss-Schaap J., Li X.N., Iannone R., Ebbinghaus S.W., Kang S.P., Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet.* 2014; 384(9948):1109-17.
254. Robert C., Long G.V., Brady B., Dutriaux C., Maio M., Mortier L., Hassel J.C., Rutkowski P., McNeil C., Kalinka-Warzocho E., Savage K.J., Hernberg M.M., Lebbé C., Charles J., Mihalciou C., Chiarion-Sileni V., Mauch C., Cognetti F., Arance A., Schmidt H., Schadendorf D., Gogas H., Lundgren-Eriksson L., Horak C., Sharkey B., Waxman I.M., Atkinson V., Ascierto P.A. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *N Engl J Med.* 2015; 372(4):320-330.
255. Romero CD, Varma TK, Hobbs JB, Reyes A, Driver B, Sherwood ER. The toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid A augments innate host resistance to systemic bacterial infection. *Infect Immun* 2011; 79(9):3576-87.
256. Rosenblatt J., Avivi I., Vasir B., Uhl L., Munshi N.C., Katz T., Dey B.R., Somaiya P., Mills H., Campigotto F., Weller E., Joyce R., Levine J.D., Tzachanis D., Richardson P., Laubach J., Raje N., Boussiotis V., Yuan Y.E., Bisharat L., Held V., Rowe J., Anderson K., Kufe D., Avigan D. Vaccination with dendritic cell/tumor fusions following autologous stem cell transplant induces immunologic and clinical responses in multiple myeloma patients. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(13):3640-8.
257. Rössner S., Voigtlander C., Wiethe C., Hanig J., Seifarth C., Lutz M. B. Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur. J. Immunol.* 2005; 35:3533-3544.
258. Rubinstein N., Alvarez M., Zwirner N.W., Toscano M.A., Ilarregui J.M., Bravo A., Mordoh J., Fainboim L., Podhajcer O.L., Rabinovich G.A. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell* 2004; 5(3):241-251.
259. Ruiz M.S., Mac Keon S., Campisano S., Bravo A.I., Gazzaniga S., Wainstok R. CD207+ cells recruitment to the vaccination site and draining lymph nodes after the administration of DC-Apo/Nec vaccine in mice. *Vaccine* 2014; 32(11):1229-32.
260. Ryungsa K., Manabu E., Kazuaki T. Cancer immunosuppression and autoimmune disease: beyond immunosuppressive networks for tumour immunity. *Immunology* 2006; 119(2): 254-264.
261. Sabbatini P., Tsuji T., Ferran L., Ritter E., Sedrak C., Tuballes K., Jungbluth A.A., Ritter G., Aghajanian C., Bell-McGuinn K., Hensley M.L., Konner J., Tew W., Spriggs D.R., Hoffman E.W., Venhaus R., Pan L., Salazar A.M., Diefenbach C.M., Old L.J., Gnjjatic S. Phase I trial of overlapping long peptides from a tumor self-antigen and poly-ICLC shows rapid induction of integrated immune response in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:6497-508.
262. Saito H., Osaki T., Murakami D., Sakamoto T., Kanaji S., Ohro S., Tatebe S., Tsujitani S., Ikeguchi M. Prediction of sites of recurrence in gastric carcinoma using immunohistochemical parameters. *J Surg Oncol.* 2007; 95:123-128.
263. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 2004; 22:531-562.
264. Sakuishi K., Apetoh L., Sullivan J.M., Blazar B.R., Kuchroo V.K., Anderson A.C. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* 2010; 207:2187-94.

265. Sandel M.H., Dadabayev A.R., Menon A.G., Morreau H., Melief C.J., Offringa R., van der Burg S.H., Janssen-van Rhijn C.M., Ensink N.G., Tollenaar R.A., van de Velde C.J., Kuppen P.J. Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:2576-2582.
266. Satpathy A.T., Wu X., Albring J.C., Murphy K.M. Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol.* 2012; 13:1145-1154.
267. Sauter B., Albert M.L., Francisco L., Larsson M., Somersan S., Bhardwaj N. Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 2000; 191(3):7423-33.
268. Sautes-Fridman C., Cherfils-Vicini J., Damotte D., Fisson S., Fridman W.H., Cremer I., Dieu-Nosjean M.C. Tumor microenvironment is multifaceted. *Cancer Metastasis Rev.* 2011; 30:13-25.
269. Scapini P., Lapinet-Vera J.A., Gasperini S., Calzetti F., Bazzoni F., Cassatella M.A. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2000; 177:195-203.
270. Scarlett U.K., Rutkowski M.R., Rauwerdink A.M., Fields J., Escovar-Fadul X., Baird J., Cubillos-Ruiz J.R., Jacobs A.C., Gonzalez J.L., Weaver J., Fiering S., Conejo-Garcia J.R. Ovarian cancer progression is controlled by phenotypic changes in dendritic cells. *J Exp Med.* 2012; 209:495-506.
271. Schadendorf D., Ugurel S., Schuler-Thurner B., Nestle F.O., Enk A., Bröcker E.B., Grabbe S., Rittgen W., Edler L., Sucker A., Zimpfer-Rechner C., Berger T., Kamarashev J., Burg G., Jonuleit H., Tüttenberg A., Becker J.C., Keikavoussi P., Kämpgen E., Schuler G.; DC study group of the DeCOG. Dacarbazine (DTIC) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized phase III trial of the DC study group of the DeCOG. *Ann Oncol.* 2006; 17(4):563-70.
272. Schmidt T., Ziske C., Marten A., Endres S., Tiemann K., Schmitz V., *et al.* Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer Res.* 2003; 63:8962-7.
273. Schreibelt G., Klinkenberg L.J., Cruz L.J., Tacke P.J., T el J., Kreutz M., Adema G.J., Brown G.D., Figdor C.G., de Vries I.J. The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-) presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells. *Blood* 2012; 119:2284-92.
274. Schuler G., Steinman R.M. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med.* 1997; 186:1183-1187.
275. Senovilla L., Vitale I., Martins I., Tailler M., Pailleret C., Michaud M., Galluzzi L., Adjemian S., Kepp O., Niso-Santano M., Shen S., Mariño G., Criollo A., Boilève A., Job B., Ladoire S., Ghiringhelli F., Sistigu A., Yamazaki T., Rello-Varona S., Locher C., Poirier-Colame V., Talbot M., Valent A., Berardinelli F., Antoccia A., Ciccocanti F., Fimia G.M., Piacentini M., Fueyo A., Messina N.L., Li M., Chan C.J., Sigl V., Pourcher G., Ruckenstein C., Carmona-Gutierrez D., Lazar V., Penninger J.M., Madeo F., López-Otín C., Smyth M.J., Zitvogel L., Castedo M., Kroemer G. An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science.* 2012; 337:1678-84.
276. Seung L.P., Rowley D.A., Dubey P., Schreiber H. Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad.* 1995; 92:6254-8.
277. Shenenberger D.W. Cutaneous malignant melanoma: a primary care perspective. *Am Fam Physician.* 2012; 85(2):161-8.
278. Shortman K., Heath W.R. The CD8⁺ dendritic cell subset. *Immunol Rev.* 2010; 234:18-31.

279. Sica A., Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; 122(3):787-795.
280. Siegal F.P., Kadowaki N., Shodell M., Fitzgerald-Bocarsly P.A., Shah K., Ho S., Antonenko S., Liu Y.J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284:1835-1837.
281. Siegel R., Naishadham D., Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(1):10-29.
282. Siegel R., Ma J., Zou Z., Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64(1):9-29.
283. Sisirak V., Faget J., Vey N., Blay J.Y., Menetrier-Caux C., Caux C. Bendriss-Vermare N. Plasmacytoid dendritic cells deficient in IFN α production promote the amplification of FOXP3(+) regulatory T cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncoimmunology.* 2013; 2(1):e22338.
284. Srivastava M.K., Andersson A., Zhu L., Harris-White M., Lee J.M., Dubinett S., Sharma S. Myeloid suppressor cells and immune modulation in lung cancer. *Immunotherapy* 2012; 4(3):291-304.
285. Steidl C, Lee T., Shah S.P., Farinha P., Han G., Nayar T., Delaney A., Jones S.J., Iqbal J., Weisenburger D.D., Bast M.A., Rosenwald A., Muller-Hermelink H.K., Rimsza L.M., Campo E., Delabie J., Braziel R.M., Cook J.R., Tubbs R.R., Jaffe E.S., Lenz G., Connors J.M., Staudt L.M., Chan W.C., Gascoyne RD. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med.* 2010; 362(10):875-885.
286. Steinbrink K., Jonuleit H., Müller G., Schuler G., Know J., Enk A.H. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93:1634-1642.
287. Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973; 137:1142-1162.
288. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med.* 2000; 191(3):411-6.
289. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2003; 21:685-711.
290. Steinman R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol.* 2012; 30:1-22.
291. Sucher R., Kurz K., Weiss G., Margreiter R., Fuchs D., Brandacher G. IDO-Mediated Tryptophan Degradation in the pathogenesis of Malignant Tumor Disease. *International Journal of Tryptophan Research* 2010; 3:113-120.
292. Sukhorukov V.L., Reuss R., Endter J.M., Fehrmann S., Katsen-Globa A., Gessner P., Steinbach A., Müller K.J., Karpas A., Zimmermann U., Zimmermann H.A. biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 346:829-39.
293. Sumimoto H., Imabayashi F., Iwata T., Kawakami Y. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J Exp Med.* 2006; 203:1651-1656.
294. Tacken P.J., de Vries I.J., Gijzen K., Joosten B., Wu D., Rother R.P., Faas S.J., Punt C.J., Torensma R., Adema G.J., Figdor C.G. Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 2005; 106:1278-85.
295. Tacken P.J., de Vries I.J., Torensma R., Figdor C.G. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7:790-802.
296. Tacken P.J.,^a Ginter W., Berod L., Cruz L.J., Joosten B., Sparwasser T., Figdor C.G., Cambi A. Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen

- residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation. *Blood* 2011; 118:4111-9.
297. Tacken P.J.,^b Zeelenberg I.S., Cruz L.J., van Hout-Kuijper M.A., van de Glind G., Fokkink R.G., Lambeck A.J., Figdor C.G. Targeted delivery of TLR ligands to human and mouse dendritic cells strongly enhances adjuvanticity. *Blood* 2011; 118:6836-44.
298. Tacken P.J., Ter Huurne M., Torensma R., Figdor C.G. Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC-SIGN differentially modulate receptor trafficking. *Eur J Immunol.* 2012; 42:1989-98.
299. Tai X., Van Laethem F., Pobezinsky L., Ginter T., Sharrow S.O., Adams A., Granger L., Kruhlak M., Lindsten T., Thompson C.B., Feigenbaum L., Singer A. Basis of CTLA-4 function in regulatory and conventional CD4 (+) T cells. *Blood* 2012; 119:5155-5163.
300. Taieb J., Chaput N., Menard C., Apetoh L., Ullrich E., Bonmort M., Péquignot M., Casares N., Terme M., Flament C., Opolon P., Lecluse Y., Métivier D., Tomasello E., Vivier E., Ghiringhelli F., Martin F., Klatzmann D., Poynard T., Tursz T., Raposo G., Yagita H., Ryffel B., Kroemer G., Zitvogel L. A novel dendritic cell subset involved in tumor immunosurveillance. *Nat Med.* 2006; 12:214-219.
301. Talmadge J.E. Pathways Mediating the Expansion and Immunosuppressive Activity of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Their Relevance to Cancer Therapy. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:5243-5248.
302. Tan C., Dannull J., Nair S.K., Ding E., Tyler D.S., Pruitt S.K., Lee W.T. Local secretion of IL-12 augments the therapeutic impact of dendritic cell-tumor cell fusion vaccination. *J Surg Res.* 2013; 185(2):904-11.
303. Tecchio C., Scapini P., Pizzolo G., Cassatella M.A. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. *Semin. Cancer Biol.* 2013; 23(3):159-170.
304. Tel J.,^a Smits E.L., Anguille S., Joshi R.N., FigdorCG, de Vries I.J. Human plasmacytoid dendritic cells are equipped with antigen-presenting and tumoricidal capacities. *Blood* 2012; 120:3936-44.
305. Tel J.,^b van der Leun A.M., Figdor C.G., Torensma R., de Vries I.J. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunol Immunother.* 2012; 61:1279-88.
306. Tel J., Aarntzen E.H., Baba T., Schreiber G., Schulte B.M., Benitez-Ribas D., Boerman O.C., Croockewit S., Oyen W.J., van Rossum M., Winkels G., Coulie P.G., Punt C.J., Figdor C.G., de Vries I.J. Natural human plasmacytoid dendritic cells induce antigen-specific T-cell responses in melanoma patients. *Cancer Res.* 2013; 73:1063-75.
307. Terhune J., Berk E., Czerniecki B.J. Dendritic Cell-Induced Th1 and Th17 Cell Differentiation for Cancer Therapy. *Vaccines* 2013; 1, 527-549.
308. Tomihara K., Guo M., Shin T., Sun X., Ludwig S.M., Brumlik M.J., Zhang B., Curiel T.J., Shin T. Antigen-specific immunity and cross-priming by epithelial ovarian carcinoma-induced CD11b(+)Gr-1(+) cells. *J Immunol.* 2010; 184:6151-6160.
309. Treilleux I., Blay J.Y., Bendriss-Vermare N., Ray-Coquard I., Bachelot T., Guastalla J.P., Bremond A., Goddard S., Pin J.J., Barthelemy-Dubois C., Lebecque S. Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:7466-7474.
310. Trez C.D., Ware C.F. The TNF receptor and Ig superfamily members form an integrated signaling circuit controlling dendritic cell homeostasis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2008; 19:277-284.
311. Ueno H., Klechevsky E., Morita R., Aspord C., Cao T., Matsui T., Di Pucchio T., Connolly J., Fay J.W., Pascual V., Palucka A.K., Banchereau J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev.* 2007; 219:118-142.
312. Ueno H.,^a Palucka A.K., Banchereau J. The expanding family of dendritic cell subsets. *Nat Biotechnol.* 2010; 28:813-815.

313. Ueno H.,^b Schmitt N., Klechevsky E., Pedroza-Gonzalez A., Matsui T., Zurawski G., Oh S., Fay J., Pascual V., Banchereau J., Palucka K. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol Rev.* 2010; 234:199-212.
314. van Broekhoven C.L., Parish C.R., Demangel C., Britton W.J., Altin J.G. Targeting dendritic cells with antigen containing liposomes: a highly effective procedure for induction of antitumor immunity and for tumor immunotherapy. *Cancer Res.* 2004; 64:4357-65.
315. Van Gisbergen KP,^b Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Close encounters of neutrophils and DCs. *Trends Immunol* 2005; 26(12):626-31.
316. Van Gisbergen KP,^a Sanchez-Hernandez M, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* 2005; 201(8):1281-92.
317. Verdijk P., Aarntzen E.H., Lesterhuis W.J., Boullart A.C., Kok E., van Rossum M.M., Strijk S., Eijckeler F., Bonenkamp J.J., Jacobs J.F., Blokk W., Vankrieken J.H., Joosten I., Boerman O.C., Oyen W.J., Adema G., Punt C.J., Figdor C.G., de Vries I.J. Limited amounts of dendritic cells migrate in to the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:2531-40.
318. Verinaud L., Issayam L.K, Zanucoli F., de Carvalho A.C., Alves da Costa T., Di Gangi R., Bonfanti A.P., Tassinari Ferreira I., Rodrigues de Oliveira A.L. Stach Machado, D.R., Thomé R. Nitric oxide plays a key role in the suppressive activity of tolerogenic dendritic cells. *Cellular & Molecular Immunology* 2014.
319. Vesely M.D., Schreiber R.D. Cancer Immunoediting: antigens, mechanisms and implications to cancer immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1284(1):1-5).
320. Visvader J.E. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011; 469:314-322.
321. von Euw E.M., Barrio M.M., Furman D., Levy E.M., Bianchini M., Peguillet I., Lantz O., Vellice A., Kohan A., Chacón M., Yee C, Wainstok R., Mordoh J. 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. *Journal of Translational Medicine* 2008, 6:6.
322. Wang B. Targeting dendritic cells in situ for breast cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012; 1:1398-400.
323. Watkins S.K., Hurwitz A.A. FOXO3: A master switch for regulating tolerance and immunity in dendritic cells. *Oncoimmunology* 2012; 1:252-254.
324. Wei X. Q., Charles I. G., Smith A., Ure J., Feng G. J., Huang F. P., Xu D., Muller, W., Moncada S., Liew F. Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375:408-411.
325. Weiss J. M., Subleski J.J., Back T., Chen X., Watkins S.K. Yagita H., Sayers T.J., Murphy W. J., Wiltrot R.H. Regulatory T Cells and Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment Undergo Fas-Dependent Cell Death during IL-2/ α CD40 Therapy. *The Journal of Immunology* 2014; 192:1-9.
326. Welters M.J., Kenter G.G., Piersma S.J., Vloon A.P., Löwik M.J., Berends-vander Meer D.M., Drijfhout J.W., Valentijn A.R., Wafelman A.R., Oostendorp J., Fleuren G.J., Offringa R., Melief C.J., van der Burg S.H. Induction of tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papilloma virus type16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:178-87.
327. Wesolowski R., Markowitz J., Carson W.E. Myeloid derived suppressor cells – a new therapeutic target in the treatment of cancer. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 2013, 1:10.

328. Wong S. H., Santambrogio L., Strominger J. L. Caspases and nitric oxide broadly regulate dendritic cell maturation and surface expression of class II MHC proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101:17783-17788.
329. Wu C.Y., Wang K., McDyer J.F., Seder R.A. Prostaglandin E2 and dexamethasone inhibit IL-12 receptor expression and IL-12 responsiveness. *J. Immunol.* 1998; 161(3):2723-2730.
330. Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007; 26:741-50.
331. Xiong H., Zhu, C., Li F., Hegazi R., He K., Babyatsky M., Bauer A. J., Plevy S. E. Inhibition of interleukin-12 p40 transcription and NF- κ B activation by nitric oxide in murine macrophages and dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:10776-10783.
332. Xu K., Pedroza-Gonzalez A., Wu T-C., Asford C., Shafer S., Marches F., Gallegos M., Burton E., Hori T., Tanaka Y., Zurawski S., Zurawski G., Bover L., Liu Y-J., Banchereau J. and A. Palucka K. Promotion of breast cancer development via Th2 polarization by TSLP. *The Journal of Immunology* 2011; 186(165):2.
333. Yang C.W., Strong B.S., Miller M.J. and Unanue E.R. Neutrophils influence the level of antigen presentation during the immune response to protein antigens in adjuvants. *J. Immunol.* 2010; 185:2927-2934.
334. Yin X.Y., Lu M.D., Lai Y.R., Liang L.J., Huang J.F. Prognostic significances of tumor-infiltrating S-100 positive dendritic cells and lymphocytes in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003; 50:1281-1284.
335. Yuan J., Gnjatic S., Li H., Powel S., Gallardo H.F., Ritter E., Ku G.Y., Jungbluth A.A., Segal N.H., Rasalan T.S., Manukian G., Xu Y., Roman R.A., Terzulli S.L., Heywood M., Pogoriler E., Ritter G., Old L.J., Allison J.P., Wolchok J.D. CTLA-4 blockade enhances polyfunctional NY-ESO-1 specific T cell responses in metastatic melanoma patients with clinical benefit. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:20410-5.
336. Zeis M., Siegel S., Wagner A., Schmitz M., Margen M., Kuhl-Burmeister R., *et al.* Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 170:5391-7.
337. Zitvogel L., Mayordomo J.I., Tjandrawan T., De Leo A.B., Clarke M.R., Lotze M.T., Storkus W.J. Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J Exp Med.* 1996; 183:87-97.
338. Zou W., Restifo N.P. T(H) 17 cells in tumour immunity and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 2010; 10(4):248-256.
339. <http://www.fda.gov>.
340. <http://clinicaltrials.gov>.

ABREVIATURAS

FDA: administración de medicamentos y alimentos
IFN: interferón
mAb: anticuerpo monoclonal
LTs: linfocitos T
CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocitos T citotóxicos
PD-1: receptor-1 de muerte programada
TME: microambiente tumoral
TAA: antígenos asociados al tumor
MHC I: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I
TRAIL: ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF
IDO: indolamina 2,3-dioxigenasa
CD: células dendríticas
Gal-1: galectina-1
HLA: antígeno leucocitario humano
M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos
PD-L: ligando del receptor-1 de muerte programada
Lm: *Listeria monocytogenes*
LLO: listeriolisina O
Lm-LLO: vacuna basada en *Listeria monocytogenes* (*Lm*), secretora de antígenos fusionados a un fragmento de listeriolisina O (LLO)
HPV: virus del papiloma humano
TGF: factor de crecimiento transformante
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
CAFs: fibroblastos asociados al cáncer
M2: macrófagos de tipo 2
N2: neutrófilos de tipo 2
LTs Regs: LTs regulatorios
LBs: linfocitos B
MDSCs: células supresoras derivadas mieloides
Th1: T helper 1
Th2: T helper 2
IL: interleuquina
TNF: factor de necrosis tumoral
CTLs: linfocitos T citotóxicos
NK: célula asesina natural
NK-T: célula T asesina natural
TAMs: macrófagos asociados al tumor
iNOS: sintasa de óxido nítrico inducible
RNS: especies reactivas de nitrógeno
ROS: especies reactivas de oxígeno
EGF: factor de crecimiento epidérmico
COX2: ciclooxigenasa-2
SDF-1: factor 1 derivado de células estromales
MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos 1

CXCL: ligando de quimioquinas motivo C-X-C
CCL: ligando de quimioquinas motivo C-C
MIF: factor inhibidor de la migración de macrófagos
G-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos
GM-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos
SCF: factor de células madre
HB-EGF: factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina
HGF: factor de crecimiento de hepatocitos
FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico 2
APRIL: ligando inductor de apoptosis
BAFF: factor activador de linfocitos B
LT: linfotoxina
RANKL: ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B
CCR: receptor de quimioquinas motivo C-C
TANs: neutrófilos asociados al tumor
ICAM1: moléculas de adhesión intercelular 1
Lin⁻: linaje negativo
MHC II: complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II
ON: óxido nítrico
RNOS: especies reactivas de óxido nítrico
Tim-3: inmunoglobulina de células T y de mucina 3
LBs Regs: LBs regulatorios
CSF: factor estimulador de colonias
APCs: células presentadoras de antígenos
iCD: células dendríticas inmaduras
OX40L: ligando OX40
mCD: células dendríticas maduras
TDO: triptofano 2,3-dioxigenasa
Stat-3: transductor de señal y activador de la transcripción 3
MMP-2: metaloproteínasa 2
TLR: receptor de tipo *tol*
PGE2: prostaglandina E2
COX2: ciclooxigenasa-2
Poly I:C: ácido poliinosínico-policitidílico
Fit3L: *FMS-like* tirosina quinasa 3
PAP: fosfatasa ácida prostática
PAP/GM-CSF: proteína de fusión constituida por GM-CSF y fosfatasa ácida prostática
TRP: proteína relacionada con la tirosinasa
gp100: glicoproteína 100
MART1: antígeno de melanoma reconocido por células T 1
Her2/neu: receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
DC-SIGN: molécula de adhesión intercelular no asociada a integrina, específica de CD
MO: médula ósea
CICUAL: comité institucional de cuidado y uso de animales de experimentación
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
FBS: suero fetal bovino
EDTA: ácido etildiaminotetraacético
PBS: buffer fosfato

s.c.: subcutáneo
i.p.: intraperitoneal
B16F1: línea de melanoma murino (H-2^b)
B16F1-OVA: línea B16F1 transformada que expresa OVA
N₂: nitrógeno
EtOH: etanol
BSA: albúmina sérica bovina
CD⁺: fracción compuesta por células CD11c⁺
CD⁻: fracción compuesta por células CD11c⁻
Apo-Nec: células apoptóticas - necróticas
CD/Apo-Nec: cultivo heterogéneo de CD co-cultivado con células Apo-Nec
CD⁺/Apo-Nec: fracción CD⁺ co-cultivada con células Apo-Nec
CD⁻/Apo-Nec: fracción CD⁻ co-cultivada con células Apo-Nec
CFSE: carboxi-fluorescein diacetato succinimidil éster
ACK: buffer amonio-cloro-potasio
OVA: ovoalbúmina
ELISA: *enzyme-linked immunosorbent assay*
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PMCF: *phenylmethyldulfonyl fluoride*
FITC-Dextran: *fluorescein isothiocyanate-dextran*
LPS: lipopolisacárido
RT-PCR: retrotranscripción-PCR
Mac-1: antígeno 1 de macrófagos

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Primers empleados en las PCRs	39
Table 2 Secreción de IL-10 e IL- 12	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Las características de Cáncer	3
Fig. 2 Etapas en el desarrollo de un melanoma cutáneo	5
Fig. 3 Descripción temporal del cultivo primario de CD	42
Fig. 4 Morfología de las células teñidas con May-Grünwald Giemsa	43
Fig. 5 Porcentaje de células CD11c ⁺ en CD, CD ⁺ y CD ⁻	44
Fig. 6 Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD y en las fracciones celulares CD ⁺ y CD ⁻	45
Fig. 7 Expresión de antígenos de superficie en el cultivo de CD y en las fracciones celulares CD ⁺ y CD ⁻	46
Fig. 8 Expresión de antígenos de superficie en el cultivo heterogéneo de CD	46
Fig. 9 Eficiencia de captación de antígenos de las CD sin seleccionar y de las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ . Fagocitosis de células Apo-Nec	51
Fig. 10 Eficiencia de captación de antígenos de las CD sin seleccionar y de las fracciones CD ⁺ y CD ⁻ . Endocitosis de FITC-Dextran	52
Fig. 11 Capacidad estimuladora alogeneica. Cultivo mixto linfocitario	53
Fig. 12 Capacidad estimuladora antígeno-específica. Cultivo con LTs CD4 ⁺	54
Fig. 13 Reservorio intracelular de IL-10 e IL-12	56
Fig. 14 Expresión de LT-	57
Fig. 15 Medición de ON y actividad arginasa-1 <i>in vitro</i>	58
Fig. 16 Esquema de vacunación con CD/Apo-Nec, CD ⁺ /Apo-Nec y CD ⁻ /Apo-Nec	65
Fig. 17 Ensayo de protección <i>in vivo</i>	65
Fig. 18 Curva de progresión tumoral en ratones no protegidos, vacunados con CD/Apo-Nec, CD ⁺ /Apo-Nec, CD ⁻ /Apo-Nec o PBS	66
Fig. 19 Medición de ON y actividad arginasa-1 <i>in vivo</i>	67
Fig. 20 Expresión de citoquinas y quimioquinas en los sitios de vacunación de ratones inmunizados con CD/ApoNec, CD ⁺ /ApoNec y CD ⁻ /ApoNec	69
Fig 21 Proliferación de LTs OT-1 en respuesta a células de MO provenientes de ratones vacunados de forma i.p. con CD/OVA, 4 hs post-inyección	70
Fig. 22 Proliferación de LTs OT-1 en respuesta a células de MO provenientes de ratones vacunados de forma s.c. con CD/Apo-Nec-Ova, 4 hs post-inyección	71
Fig. 23 Mecanismo de interacción <i>in vivo</i> entre los componentes de la vacuna CD/Apo-Nec y el sistema immune del hospedador	77
Fig. 24 Mecanismo de interacción <i>in vivo</i> entre los componentes de la vacuna CD ⁻ /Apo-Nec o CD ⁺ /Apo-Nec y el sistema immune del hospedador	78