

Tesis Doctoral

Modalidades terapéuticas para el tratamiento de adenocarcinomas mamarios

Moreno Ayala, Mariela Alejandra

2016-10-04

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:

Moreno Ayala, Mariela Alejandra. (2016-10-04). Modalidades terapéuticas para el tratamiento de adenocarcinomas mamarios. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Moreno Ayala, Mariela Alejandra. "Modalidades terapéuticas para el tratamiento de adenocarcinomas mamarios". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-10-04.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Modalidades terapéuticas para el tratamiento de adenocarcinomas mamarios

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

Mariela Alejandra Moreno Ayala

Director de tesis: Dra. Marianela Candolfi

Consejero de Estudios: Dr. Arturo Romano

Lugar de trabajo: Instituto de Investigaciones Biomédicas
(INBIOMED, UBA-CONICET)

Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Ciudad Autónoma de Buenos Aires

Fecha de defensa: 4 de Octubre 2016

INDICE	
AGRADECIMIENTOS	1
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
ABREVIATURAS	6
INTRODUCCION	8
Introducción General	8
I. Aspectos Generales de la respuesta inmune	9
II. Rol de las células dendríticas en el inicio de la respuesta inmune	12
III.A. Respuesta inmune en cáncer	13
III.B. Papel de las células regulatorias en la respuesta inmune antitumoral	15
IV. Inmunoterapias antitumorales	20
IV.A. Inmunoterapia Pasiva No Específica	20
IV.B. Inmunoterapia Pasiva Específica	21
IV.C. Inmunoterapia Activa No Específica	24
IV.D. Inmunoterapia Activa Específica	25
V. Inmunoterapia en cáncer de mama	27
HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS	29
MATERIALES Y METODOS	30
Líneas celulares murinas	
Líneas celulares humanas	
Animales	
Recuento de metástasis pulmonares	
Cortes histológicos en parafina	
Calculo de índice mitótico	
Cortes histológicos en criostato	
Inmunohistoquímica de cortes de criostato	
Purificación de células inmunes de tumor por gradiente de Percoll	
Obtención de esplenocitos	
Citometria de flujo para antígenos de superficie	
Citometria de flujo para el antígeno intracelular Foxp3	

Cultivos de CDs murinas	
Cultivos de CDs humanas	
Ensayo de ELISA	
Ensayo de fagocitosis en CDs murinas	
Reacción de leucocitos mezclados alogeneicos con CDs murinas	
Western blotting	
Preparación de vacunas de CDs	
Vacunación profiláctica con CDs en modelos murinos de cáncer de mama	
Cultivos de CDs humanas	
Evaluación de marcadores de coactivación en CDs humanas	
Ensayo de fagocitosis en CDs humanas	
Reacción de leucocitos mezclados alogeneico con CDs humanas	
Vacunación terapéutica con CDs en combinación con el bloqueo de Foxp3 en modelos murinos de cáncer de mama	
Detección de Foxp3 en líneas tumorales murinas y humanas	
Análisis de proliferación celular	
Análisis de viabilidad	
Desarrollo de vectores para el bloqueo terapéutico de Foxp3	
Análisis Estadístico	
RESULTADOS	41
CAPITULO I	41
I. Caracterización de los modelos murinos inmunocompetentes de carcinoma mamario metastásico	41
I.A. Características del modelo experimental LM3	41
Infiltración Intratumoral de Células Inmunes	
Expansión de células inmunosupresoras en bazo	
I.B. Características del modelo experimental 4T1	48
CAPITULO II	51
II. Optimización de vacunas de células dendríticas	51
II.A. Evaluación de combinaciones de citoquinas para la generación de CDs a partir células progenitoras de Medula Ósea (MO)	51

II.B. Evaluación de agonistas de TLR como adyuvantes de vacunas antitumorales en modelos murinos de carcinoma mamario metastático	52
II.C. Evaluación de la maduración de CDs inducida por agonistas de TLR <i>in vitro</i>	56
Papel de las óxido nítrico sintasas (NOS) en la activación de las CDs inducida por agonistas de TLR	
Papel de las indolamida 2,3 dioxigenasa (IDO) en la activación de las CDs inducida por agonistas de TLR	
Papel del NF- κ B en la activación de CDs mediada por TLR	
II.D. Evaluación de los agonistas de TLR7 y TLR9 en la activación de CDs humanas	66
CAPITULO III	69
III. Bloqueo terapéutico de Foxp3	69
III.A. Efecto de la vacunación con células dendríticas sobre las poblaciones linfocitarias de bazo y tumor	69
III.B. Eficacia de la terapia combinada de vacunas de CDs y péptido bloqueante de Foxp3 en ratones inmunocompetentes portadores de carcinomas mamarios metastásicos	71
III. C. Evaluación de la expresión de Foxp3 en líneas celulares murinas de carcinoma mamario	73
Regulación de la expresión de Foxp3 en líneas celulares murinas de carcinoma mamario	
Evaluación de la función de Foxp3 en líneas celulares tumorales murinas <i>in vitro</i>	
Efecto del bloqueo de Foxp3 en ratones inmunosuprimidos portadores de tumores LM3	
III.D. Evaluación de la expresión y función de Foxp3 en líneas celulares tumorales humanas	79
III.E. Desarrollo de vectores terapéuticos que bloquean Foxp3	80
DISCUSIÓN	83
CONCLUSIONES	96
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	97

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Antes que nada le pido mil disculpas a aquellos que contribuyeron a esta tesis y por cuestiones de memoria no están acá mencionados

Primero quiero agradecer a todos los docentes de la Facultad, que hacen un esfuerzo día a día para motivar a sus alumnos, incentivar la vocación científica y llevar a las aulas los conocimientos más actuales

A Patri Petray y Romi Cutrullis, que me ayudaron a dar esos primeros pasos en lo que es la vida laboratoril, pequeñas mañas indispensables que aplique en todo mi doctorado y que voy a seguir aplicando

A Paula Maloberti, Flavia Zanetti y Mariana Puntel, por ayudarme entender un poquito más el mundo del clonado, las técnicas de biología molecular y esos kits mágicos que nos permiten sacar bandas para todos lados!

A Gaby Salamone, Sole y Luciana, son un equipo excelente, que siempre han estado para darnos una mano en todo, gracias por su buena predisposición y su ayuda en todo momento

A María Castro y Pedro Lowenstein, por abrirme las puertas de su laboratorio, por brindarme su conocimiento no solo a nivel científico. Gracias María por ayudarnos tanto, por brindarnos tu apoyo incondicional, por tus consejos

A Noelia Casares y Juan José Lasarte, que sin conocernos en persona, nos brindaron su ayuda y conocimiento

A Elisa Bal y Lydia Puricelli, Mil gracias por toda su ayuda, siempre solidarias, apoyando nuestro laboratorio en todo momento

A toda la gente del Piso 10 de INBIOMED, que en su conjunto, le dan una calidez a nuestro lugar de trabajo, que hace que sea un placer ir a trabajar, siempre solidarios, dispuestos a ayudar en todo momento, sin recelo alguno, Gracias Livia, Cristian, Pato, Vane y Mercedes

Gracias Silvia, Mati, Edu y Ale, por siempre darnos una mano en todo momento

A Susanita y Andre De Laurentiis, gracias por su ayuda, por brindarnos su conocimiento siempre que las necesitamos, por ser tan divertidas aun cuando estamos trabajando

A Daniel Pisera, por darme siempre esa mirada diferente, casi filosófica de la ciencia, encontrar el por qué y el para que de nuestro trabajo. Por siempre brindar su tiempo y brillantez para dar esas críticas constructivas que enriquecen lo que hacemos

AGRADECIMIENTOS

A Jime, por sus críticas constructivas, por siempre estar prestándonos atención a todo, por tu predisposición a ayudarnos siempre

A Gise, Lu, Sole, Flor Merino, Juli, Nati, Dani Martin, Juan, por todas las salidas graciosas, por darle un aire divertido y jovial al piso, por todas esas risas en los pasillos

A Anto y Santi, por todos los momentos divertidos compartidos y enojos también!!, porque somos todos ambidiestros y bipolares!

A Mer, gracias por tantos momentos, entre ratón y ratón, tantas historias y risas, por siempre ayudarnos, y por enseñarnos de la vida con tu ejemplo

A Lau, San, Gaby y Mari, por todo su apoyo en todo momento, por compartir las alegrías y las tristezas, por aprender juntas que todas las cosas se superan, que podemos sacar fuerzas de los rincones más remotos. Gracias!

A Adriana, pilar clave en todo este doctorado, sin su apoyo y su colaboración a nuestro laboratorio es imposible que yo hoy presentara este trabajo. Por sus mil correcciones, por bancarnos tantas veces nuestras locuras

A Carlita, Lila, Dani y Delia, gracias por su compañerismo, por calidad y calidez humanas, por esas cervecitas rejuvenecedoras. Carlita mil gracias por tu ayuda en todo, tu espíritu tanesco que me encanta!. Dani, gracias por ser una persona tan atenta, tan humana, por transmitir tu cariño a todo lo que haces. Lila, por enseñarme el swing, por toda tu alegría, porque carita feliz más carita feliz, da como resultado muchas caritas felices! Delia, por tu comprensión, por siempre encontrarme en esos momentos malos (que no fueron pocos), donde necesitaba una oreja, por todos tus consejos y por darnos un punto de vista diferente de la vida!

A Maru, que puedo decir después de tantas cosas compartidas, TANTO tiempo, de hecho mientras escribo esto te tengo al lado mío (y me estas recordando todas las cosas que me faltan hacer jajajaja). Mil gracias por todo lo que aprendí en estos más de 5 años, sobre ciencia, política, vida, artes de manipulación.....Gracias por hacer tan ameno toda esta etapa que puede ser tan complicada, por reírnos tanto, por las maldades en colaboración jajaja. Me llevo mil momentos conmigo, miles de alegrías y encuentros, discusiones productivas y otras no tanto!! jajaja. A Iván, por ayudarnos, por su paciencia cuando le invadimos su casa! y Vito, por ser un enano hermoso que nos hace reír a lo loco. GRACIAS!!!

A Romi, Silvi y Rochi, por estar conmigo desde toda la vida, sin necesidad de vernos, sentir que están, las adoro, gracias por acompañarme en todas las etapas, por darme fuerza y garra, y por incorporar a mi vida esos dos peques hermosos, Pini y Bauti

AGRADECIMIENTOS

A Mari, Florchus S, Nanu y Guille, gracias por enseñarme tanto, por ser mi sostén en muchos momentos, por compartir tantas cosas mínimas cosas que aportan tanto a la vida, porque aprendimos a entendernos, a desencontrarnos para volvernos a encontrar LAS ADORO!

A Pau y A Flor, mis hermanas del alma.

Pau me conoces como nadie, gracias por entenderme y acompañarme en esta etapa, como en tantas otras que ya has estado, porque podemos estar distanciadas y volver al día a día con una mirada, por tus consejos, por tu amor y pasión hacia todo.

A Flor, porque ser esencial para mis días en el labo, por tantas risas y llantos, porque aprendimos a entendernos, con nuestros humores torcidos muchas veces, porque ya sabemos como comunicarnos con solo mirarnos, porque sin tantos mates en el medio con charlas, no hubiera disfrutado tanto de todo este doctorado. Porque cerca o lejos, vamos a afrontar muchos nuevos desafíos juntas. Por estar, por ser, GRACIAS

To Hakoom, thank you for being so comprehensive, patient, for being with me even when we are separated, for taking together is huge challenge, for all your love

A mi familia, Tito, Moni y Gise, por su apoyo incondicional, siempre tratando de ayudar, bancándome mis humores, compartiendo alegrías y tristezas. Porque yo sé que van a estar conmigo en cada paso que dé, estén de acuerdo o no GRACIAS

RESUMEN

Modalidades terapéuticas para el tratamiento de adenocarcinomas mamarios

El objetivo de este trabajo fue desarrollar estrategias terapéuticas para el tratamiento del carcinoma mamario. Primero evaluamos el efecto de la estimulación simultánea de receptores tipo toll (TLR) 7/8 y 9 sobre la activación y eficacia de vacunas antitumorales de células de dendríticas (CDs). La vacunación con CDs activadas con un agonista de TLR9 (CpG) tuvo efecto antitumoral y antimetastático, generando memoria inmunológica en ratones con carcinomas mamarios. Sin embargo, la adición concomitante de un agonista de TLR7/8 (R848) inhibió la eficacia antitumoral de las vacunas. Experimentos *in vitro* sugieren que la estimulación simultánea de estos receptores no permite la activación completa de NF- κ B, redundando en una maduración deficiente de las CDs. Por otra parte, las Tregs también han sido involucradas en el escaso efecto antitumoral de la inmunoterapia. Por ello, evaluamos el efecto de la inactivación funcional de las Tregs mediante el bloqueo del factor de transcripción Foxp3. La administración de P60, un péptido que inhibe Foxp3, bloqueó la expansión de Tregs inducida por la vacunación con CDs. Considerando que observamos expresión de Foxp3 en células de carcinoma mamario murino y humano, evaluamos el efecto directo de P60 sobre estas células y observamos que inhibió su proliferación y viabilidad *in vitro* e *in vivo*. Nuestros resultados sugieren que el bloqueo de Foxp3 podría tener un beneficio dual sobre la eficacia de las vacunas, tanto por la inhibición de Tregs como ejerciendo una acción directa sobre la célula tumoral.

Palabras Claves: Vacunas antitumorales, Células dendríticas, Receptores Toll-Like, Células T regulatorias

ABSTRACT

Therapeutics modalities for the treatment of breast cancer

The aim of this work was to develop therapeutic strategies for the treatment of mammary adenocarcinoma. First, we evaluated the effect of simultaneous stimulation of Toll-like receptors (TLR) 7/8 and 9 on the activation and efficacy of anti-tumor dendritic cell (DC) vaccines. Vaccination with TLR9 agonist-activated DCs (CpG) exerted an antitumor and antimetastatic effect and generated immunological memory in mice with breast cancer. However, the concomitant addition of a TLR7/8 agonist (R848) inhibited the anti-tumor efficacy of CpG-DC vaccines. *In vitro* experiments suggested that simultaneous stimulation of these receptors prevents the complete activation of NF- κ B, resulting in a deficient maturation of DCs. On the other hand, Tregs have been involved in the poor antitumour efficacy of immunotherapeutic strategies. Thus, we evaluated the effect of Treg functional inactivation by blocking the transcription factor Foxp3. The administration of P60, a peptide that inhibits Foxp3 function, blocked the expansion of Tregs induced by DC vaccination in tumor-bearing mice. Considering that we also observed Foxp3 expression in murine and human tumor cells, we evaluated the direct effect of P60 on these cells. We found that P60 inhibited proliferation and viability of tumor cells *in vitro* and in animal models. Our results suggest that Foxp3 blockade could have a dual benefit on the efficacy of antitumor vaccination strategies, both by inhibition of Treg expansion and function, and through a direct inhibitory effect on tumor cell survival.

Key words: Antitumoral vaccines, Dendritic cells, Toll-Like Receptors, T regulatory cells.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ALL: Leucemia linfática aguda

CARS: TCR específicos para antígenos tumorales o receptores antigénicos quiméricos

cCDs o CDs: Células dendríticas convencionales

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CPA: Células presentadoras de antígeno

CRS: Síndrome de liberación de citoquinas

CTLA-4: Antígeno 4 Asociado a linfocitos T citotóxicos

FDA: *Food and Drug Administration*

GM-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

HBsAg: Antígeno de superficie de la hepatitis B

IDO: Indoleamina 2,3-dioxigenasa

IFN: Interferón

IL: Interleuquina

LN: Nódulos Linfáticos

LPS: Lipopolisacárido bacteriano

LTC: Linfocitos T citotóxicos

mAc: Anticuerpo monoclonal

MAS: Síndrome de activación de macrófagos

MDSC: células mieloides supresoras

MLR: Reacción de leucocitos mezclados alogeneicos

MO: Medula Ósea

MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88

NFAT: Factor nuclear de células T activadas

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NK: Células *natural killer*

ABREVIATURAS

NO: Óxido nítrico

ODN: Oligodeoxinucleotidos

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

pCDs: Células dendríticas plasmocitoides

PD-1: Proteína de muerte celular programa

PPC: péptido penetrante de células

PPRs: Receptores de reconocimiento de patrones

ROS: Especies reactivas de oxígeno

R848: Resiquimod

TAMs: Macrófagos asociados a tumor

TCR: Receptor de linfocito T

TILs: Linfocitos infiltrantes a tumor

TLR: Receptores Tipo Toll

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRAF6: Falta de necrosis tumoral 6 asociado a receptor 6

Tregs: Células T regulatorias

INTRODUCCION



INTRODUCCION

INTRODUCCION GENERAL

El cáncer de mama ocupa el primer lugar entre las causas de muerte por cáncer en las mujeres adultas. Cada año mueren en nuestro país más de 5300 mujeres debido a esta enfermedad (www.msal.gov.ar/inc/index.php/acerca-del-cancer/estadisticas) y se registran 15.000-18.000 nuevos casos, lo que representa un tercio de los tumores diagnosticados en las mujeres. En los últimos tiempos, la lucha contra el cáncer de mama ha evolucionado debido, en gran parte, al mejoramiento de las técnicas de detección temprana de la enfermedad. El tratamiento tradicional consiste en la resección quirúrgica seguida de quimioterapia, radioterapia u hormonoterapia [1]. Aunque la respuesta al tratamiento es relativamente buena en los estadios iniciales de la enfermedad, no existen terapias efectivas para pacientes con enfermedad invasiva o metastática. Además, muchas de las pacientes que reciben un diagnóstico temprano igualmente desarrollan metástasis (www.lalcec.org.ar). Dependiendo del grado de diseminación al momento del diagnóstico, el tumor puede no responder al tratamiento o recurrir. La tasa de recurrencia a 5 años es alrededor del 15% y la supervivencia de estas pacientes se reduce al 60% al cabo de este tiempo [2].

Las terapias convencionales pueden traer aparejados efectos colaterales graves. La administración de tratamientos de quimioterapia requiere comúnmente la internación de las pacientes que con frecuencia presentan náuseas, vómitos, pérdida de cabello, pérdida de apetito, fatiga, neuropatía periférica, inmunosupresión y anemia. Las mujeres tratadas contra el cáncer de mama pueden sufrir menopausia prematura y disfunción sexual. Además, la quimioterapia también puede tener un impacto en el sistema nervioso central. Los cambios más comunes informados durante y luego del tratamiento con quimioterápicos son la pérdida de memoria, disminución de la velocidad de procesamiento de la información, reducción de la atención, depresión y fatiga. Se estima que un tercio de los pacientes bajo quimioterapia sistémica muestra una función cognitiva deteriorada que interfiere con su calidad de vida [3]. Considerando los severos efectos colaterales físicos y psicológicos que tienen las terapias convencionales y el impacto económico que estos generan al sistema sanitario, es importante desarrollar terapias antitumorales más específicas, que minimicen la toxicidad sistémica.

INTRODUCCION

En los últimos años ha tomado gran impulso el desarrollo de estrategias de inmunoterapia para los pacientes con cáncer [4]. El objetivo de estas terapias es estimular el sistema inmune para desarrollar inmunidad antitumoral. La especificidad de la respuesta del sistema inmune y la posibilidad de desarrollar memoria inmunológica hacen que estas terapias sean consideradas las más prometedoras de las últimas décadas.

I. Aspectos generales de la respuesta inmune

La función primaria del sistema inmune es proteger el hospedador de los patógenos que se encuentran en su entorno. Existen dos ramas principales de la inmunidad, que se denominan inmunidad innata y adaptativa. La inmunidad innata utiliza un número limitado de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) codificados en la línea germinal, que permiten reconocer patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).

Los PRRs pueden clasificarse en distintas clases funcionales que sirven a diversos propósitos. La primera clase, que consiste en PRRs secretados, como lectina de unión a manosa (MBL), participa en la activación de la opsonización y del sistema de complemento. La segunda clase se compone de receptores que inducen la fagocitosis en células dendríticas (CDs) y macrófagos, como el receptor *scavenger* o el receptor de unión a manosa (MR). Dichos PRRs facilitan la absorción de los microbios en el fagosoma y el procesamiento de las proteínas extrañas a péptidos antigénicos para la estimulación de células T. La tercera clase constituye un grupo de PRRs que inducen la producción de péptidos antimicrobianos, quimiocinas y citoquinas proinflamatorias. Estos PRR aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras y gatillan la secreción de citoquinas que son esenciales para la generación de la respuesta inmune adaptativa. Según su localización celular, la última clase de PRRs puede ser dividida en PRRs que vigilan el entorno extracelular, Receptores de Tipo Toll (TLRs) y algunas lectinas tipo C, y PRRs que detectan infecciones intracelulares, como los receptores tipo RIG-I, el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos (NOD) y sensores de ADN [5]. Los TLRs son glicoproteínas de transmembrana, cuya región extracelular presenta motivos repetidos ricos en leucina (LRR) [6]. A pesar del grado de conservación entre los dominios LRR, los distintos TLRs reconocen diversos ligandos no relacionados estructuralmente (**Figura 1**).

INTRODUCCION

En particular, los TLR 7 y 8 reconocen ARN de cadena simple. Las imidazoquinolinas (Imiquimod y Resiquimod o R848) son ligandos sintéticos que activan el TLR 7 y 8 en CDs humanas y TLR 7 en CDs murinas [7, 8]. Aunque la expresión y función de TLR8 en ratón ha generado amplia controversia, en los últimos años existe consenso que TLR8 está presente y es funcional en células de ratón [9-12]. Sin embargo, R848 sólo es capaz de activar TLR7 murino, sin afectar la función de TLR8 en células de estos animales [8]. Los oligodeoxinucleótidos (ODN) conteniendo motivos CpG son dinucleótidos flanqueados por dos purinas y dos pirimidinas. Estos motivos son 20 veces más comunes en ADN bacteriano que en ADN de mamíferos debido a la frecuencia de utilización y al patrón de metilación de procariontes versus eucariotes [13]. Los motivos CpG son potentes activadores de las CDs [14]. Luego de la unión a su ligando, los TLRs se dimerizan y sufren cambios conformacionales requeridos para el reclutamiento de moléculas de señalización. La molécula adaptadora MyD88 media la activación de las IRAKs (quinasas asociadas al receptor IL-1) y TRAF6 (Factor de Necrosis Tumoral 6 asociado a Receptor 6), conduciendo a la activación del complejo IKK, y la liberación del NF- κ B de su inhibidor, de modo que éste pueda translocarse al núcleo (**Figura 1**) [6]. La activación de esta vía es crucial para la expresión de marcadores de coactivación como CD86, complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) tipo II y CD40 y la secreción de citoquinas proinflamatorias durante el proceso de maduración [15]. La presentación de antígenos por parte de la CD, en conjunto con la interacción de sus correceptores con los receptores de los linfocitos T, en presencia de un entorno proinflamatorio, llevarán finalmente al desencadenamiento de una respuesta inmune específica mediada por linfocitos T efectores.

La inmunidad adaptativa es un complejo sistema por el cual el organismo puede reconocer los antígenos únicos de un patógeno. Este sistema depende de la generación de un repertorio diverso de receptores de antígeno en los linfocitos T y B y la subsiguiente activación y expansión clonal de las células con los receptores específicos de antígeno apropiados. El desarrollo efectivo de la respuesta inmune depende de la interacción y regulación entre la inmunidad innata y adaptativa [16]. La inducción de la inmunidad adaptativa no sólo depende del reconocimiento directo del antígeno, sino que también se basa en señales esenciales que son enviadas por el sistema inmune innato. Estas señales constituyen un paso crítico que controla la activación, el tipo y la duración

INTRODUCCION

de la respuesta inmune adaptativa. El sistema adaptativo recibe instrucciones del sistema innato principalmente durante la interacción entre células T y células presentadoras de antígeno (CPA) [5].

Dado que el sistema inmunológico utiliza múltiples y potentes mecanismos efectores para destruir a la amplia gama de células y partículas microbianas que

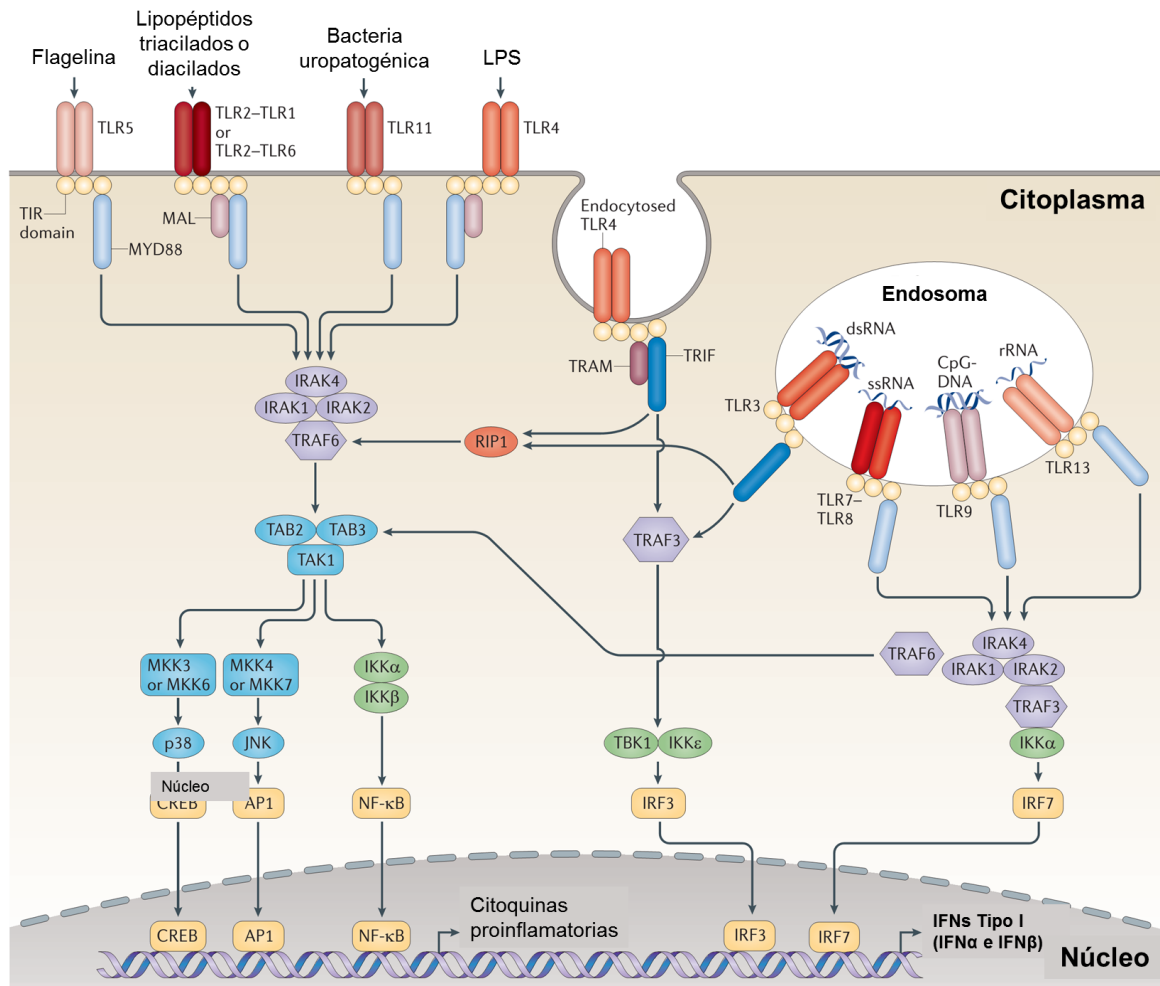


Figura 1. Vías de señalización de TLRs. TLR5, TLR11, TLR4, y los heterodímeros de TLR2-TLR1 o TLR2-TLR6 se unen a sus respectivos ligandos en la superficie celular. En cambio, TLR3, TLR7-TLR8, TLR9 y TLR13 se localizan en los endosomas, donde censan ácidos nucleicos propios o de microbios. TLR4 se localiza tanto en la membrana como en los endosomas. La señalización vía TLR induce la dimerización de los receptores. A continuación el dominio TIR del TLR contacta a la proteína adaptadora MYD88 (factor de diferenciación mieloide 88) y la proteína adaptadora tipo MYD88 (MAL), o el dominio TIR conteniendo la proteína inductora de IFN β (TRIF) y la molécula adaptadora relacionada TRIF (TRAM). La asociación de las moléculas adaptadoras estimula señales río abajo que involucran interacciones entre IL-1R-quinasas asociadas (IRAKs) y las moléculas adaptadoras asociadas al receptor TNF (TRAFs), lo cual conduce a la activación de proteínas quinasas mitogénicas activadas (MAPKs), la quinasa JUN N-terminal y la p38, y a la activación de factores de transcripción (FT). Dos familias importantes de FT son activadas: el factor nuclear κ B (NF- κ B) y el factor regulador de interferón (IRF) así como otros factores de transcripción como CREB y AP-1. La principal consecuencia de esta cascada es la inducción de la expresión de proteínas proinflamatorias, y en el caso de TLRs endosomales, la inducción de interferones tipo I. Figura modificada de O'Neill y col, 2013.

INTRODUCCION

encuentra, es fundamental que la respuesta inmune no desencadene mecanismos destructivos contra sus propios tejidos, un proceso denominado autotolerancia. Los mecanismos de autotolerancia intervienen en muchos pasos de las respuestas inmunes innata y adaptativa y han sido involucrados en la patogenia tanto de las enfermedades autoinmunes [17] como de las enfermedades neoplásicas [18].

II. Rol de las células dendríticas en el inicio de la respuesta inmune

Las células dendríticas (CDs) son CPA derivadas de precursores de la médula ósea (MO) que pueden ser encontradas en sangre, tejido linfoide, intersticial y epitelial. Estas células juegan un rol crítico en la inducción y la regulación de la respuesta inmune. Las CDs se diferencian en dos tipos según su función y marcadores de superficie. Las plasmocitoides (pCDs) y las CDs convencionales o clásicas. Las pDCs representan un pequeño subconjunto de CDs que comparten un origen similar pero un ciclo de vida diferente al de las CDs convencionales. Las pDCs se acumulan principalmente en la sangre y los tejidos linfoides y entran en los ganglios linfáticos (LNs) a través de la circulación sanguínea. Las pCDs expresan bajos niveles del CMH-II y moléculas coestimuladoras y niveles bajos de la integrina CD11c en el estado basal. A partir del reconocimiento de antígenos extraños, producen grandes cantidades de interferón (IFN) de tipo I y adquieren la capacidad de presentar antígenos.

Las CDs convencionales hacen referencia a todas aquellas CDs que no son pCDs. Las CDs forman un subconjunto pequeño de células hematopoyéticas en tejidos linfoides y no linfoides [19]. Las CDs inmaduras capturan antígenos en los tejidos periféricos, los procesan y comienzan su maduración. Durante este proceso, las células incrementan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7 y migran a los órganos linfáticos secundarios, donde disminuyen significativamente su actividad fagocítica e incrementan la expresión de CMH II y de moléculas coestimuladoras, como CD40, CD80 y CD86 [20]. La función principal de las CDs maduras es presentar antígenos a los linfocitos T vírgenes, los cuales se expanden clonalmente a células T efectoras para la respuesta inmune adaptativa primaria y a células T de memoria [21]. Las CDs brindan 4 señales a las células T [22, 23], la primera señal es provista luego de la interacción del receptor de la célula T CD8+ o CD4+ (TCR) con el péptido presentado en las moléculas del CMH de tipo

INTRODUCCION

I o II de las CD, respectivamente. La segunda señal está dada cuando las moléculas coestimuladoras, como CD28, presentes en la superficie de las células T interactúan con sus ligandos, como CD80 y CD86, en la superficie de las CD, lo cual conduce a la expansión clonal de las células T. La tercera señal consiste en la definición del perfil de la respuesta inmune (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 o Th foliculares) mediante la secreción de citoquinas por parte de las CD maduras. Las respuestas inmunes de tipo Th1, que promueven la generación de linfocitos T citotóxicos (LTCs) juegan un rol fundamental en la inmunidad adaptativa antitumoral. La última señal es indicar el correcto tráfico de las células T efectoras desde los órganos linfáticos secundarios hacia los sitios de lesión donde ejercen su acción [21, 23]. Las CD no sólo son críticas para la inducción de las respuestas adaptativas primarias, sino que también son importantes en la tolerancia inmunológica a antígenos propios. Las CD que proveen sólo la señal 1, en ausencia de CD80/CD86 (señal 2) inducen anergia en la célula T. Las CD capaces de inducir tolerancia a auto-antígenos están caracterizadas por baja o ausente expresión de CD40 de superficie y de NF- κ B (RelB/p50) nuclear [24]. En este caso, las CD tienen tanto la señal 1 como la 2, pero carecen de CD40, lo cual lleva a la inducción de células T regulatorias que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica. Aunque la maduración de las CD puede ser inducida por diferentes estímulos, una de las vías más importantes es el reconocimiento de PAMPs por los TLRs.

III.A. Respuesta inmune en cáncer

Para entender de qué manera se desarrolla un proceso tumoral Schreiber y colaboradores propusieron la teoría de inmunoección de los tumores [25]. Esta teoría se basa en que los tumores son heterogéneos, es decir que existen distintas subpoblaciones de células tumorales que presentan antígenos diferentes. La teoría de inmunoección define 3 procesos denominados eliminación, edición y escape. En la **eliminación** el sistema inmune detecta y erradica la mayor parte de las células tumorales. Cuando el proceso es exitoso, todo el tumor es eliminado. En caso contrario, las células tumorales remanentes crecen e invaden los tejidos circundantes, lo que lleva a la liberación de citoquinas que reclutan componentes del sistema inmune innato, el cual finalmente va a estimular la inducción de una respuesta inmune adaptativa. En este punto se inicia el

INTRODUCCION

segundo proceso denominado **edición**, que consta de un equilibrio dinámico en el cual, por un lado, las células tumorales se encuentran en constante división y, debido a su inestabilidad genómica, generan nuevas subpoblaciones con mutaciones nuevas, y por otro lado, el sistema inmune reconoce y elimina constantemente dichas subpoblaciones tumorales, ejerciendo de esta manera una presión de selección sobre el tumor. Como consecuencia son seleccionadas subpoblaciones de células tumorales en virtud de su poca inmunogenicidad o de características que le permitan sobrevivir al ataque mediado por el sistema inmune. La última etapa, consiste en el **escape tumoral**, en donde aquellas subpoblaciones que el sistema inmune no pudo reconocer o eliminar logran crecer de manera no controlada y dan lugar a la enfermedad clínica (**Figura 2**) [26]. Las evidencias

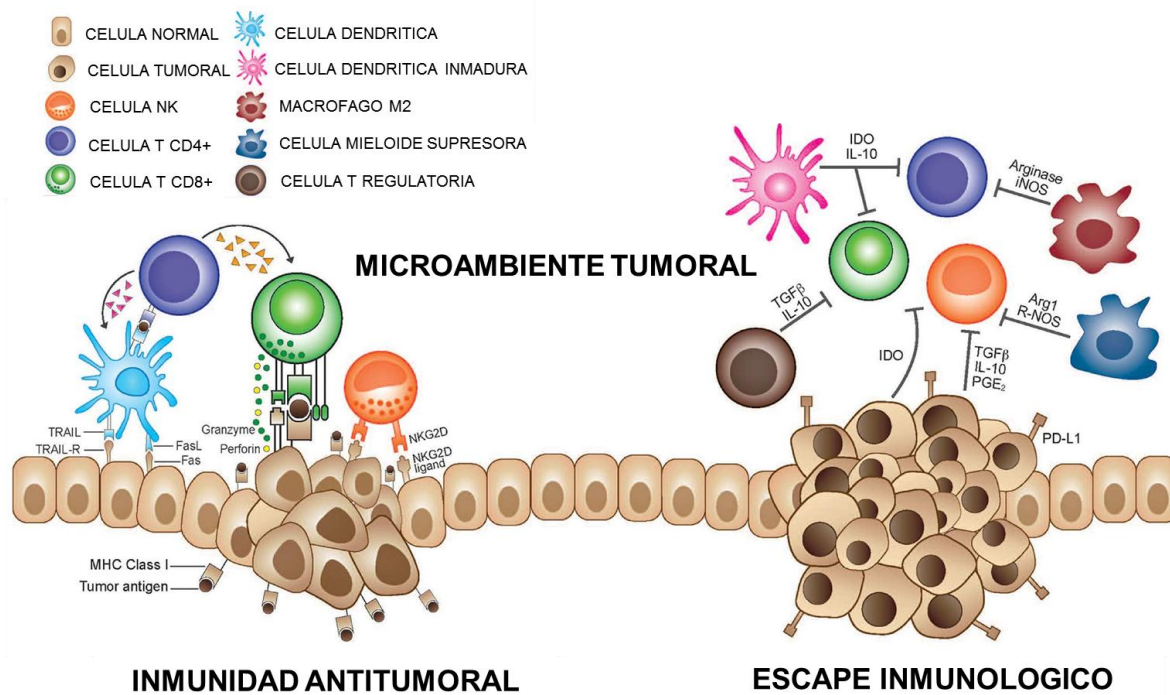


Figura 2. El microambiente tumoral inmunosupresor y la pérdida de antígenos median el escape tumoral. Durante la fase de eliminación, las células inmunes efectoras como CTL y NK con la ayuda de CDs y células T CD4+, son capaces de reconocer y eliminar a las células tumorales. Como resultado de la heterogeneidad tumoral, las células tumorales que son menos inmunogénicas o que aumentan los factores inmunosupresores, son capaces de evadir la respuesta inmune y escapar de la vigilancia inmunológica. Las células tumorales pueden secretar citoquinas que reclutan células supresoras como las Tregs y MDSC, y macrófagos M2. Las CDs inmaduras pueden generar anergia debido a la falta de moléculas coestimuladoras. Los macrófagos M2 y las MDSC inhiben la respuesta de las células T efectoras mediante una variedad de mecanismos que incluyen la generación de ROS y NO, como también la interferencia con el tráfico de células inmunes hacia el sitio tumoral. Las citoquinas inmunosupresoras y los metabolitos producidos por la enzima IDO contribuyen a un microambiente que dificulta la actividad de las células efectoras. Además, las células tumorales pueden disminuir la expresión de moléculas CMH y aumentar la expresión de moléculas inmunosupresoras como PD-L1. Figura modificada de Monjazeb y col, 2013.

INTRODUCCION

que apoyan la teoría de inmunovigilancia, entre otras, son que el 5% de pacientes con inmunodeficiencias congénitas desarrollan cáncer (frecuencia 200 veces superior a la población normal), los pacientes trasplantados inmunosuprimidos crónicamente desarrollan cáncer con una frecuencia 80 veces superior a la población normal y los pacientes con HIV, quienes presentan alta incidencia de tumores.

Los mecanismos de inmunosupresión tumoral pueden ser categorizados en intrínsecos o extrínsecos al tumor. Los mecanismos intrínsecos al tumor incluyen: (i) la secreción de factores solubles inmunosupresores como las citoquinas IL-10 y TGF- β , factores de crecimiento como VEGF o enzimas como la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), y (ii) la expresión de moléculas en la superficie celular que inhiben a las células efectoras específicas de antígenos tumorales, como ligandos de *checkpoints* inmunológicos (PD-L1, B7-H3), Fas ligando (Fas-L), moléculas de CMH no clásicos (HLA-E y G) o pérdida de expresión de moléculas de clase I del CMH. Los mecanismos extrínsecos involucran la acción de poblaciones heterogéneas de células inmunes supresoras, como las células mieloides supresoras (MDSC), los macrófagos asociados a tumor (TAMs), las CPAs inmaduras y células T regulatorias (Tregs inducibles o naturales y células Tr1) [27]. Existe evidencia de que los tumores sólidos contienen células T específicas contra antígenos tumorales- Sin embargo, éstas células se vuelven tolerantes o están inhibidas por la presencia de factores inmunosupresores en el microambiente tumoral (**Figura 2**) [28].

III.B. Papel de las células T regulatorias en la respuesta inmune antitumoral

Como indicamos más arriba, el sistema inmune posee sofisticados mecanismos para mantener la homeostasis inmune y prevenir la autoinmunidad, que también están involucrados en el escape inmunológico tumoral. Las células T regulatorias (Tregs) son las principales mediadoras de la tolerancia periférica. Estas células son forkhead box P3 (Foxp3)+ CD4+ CD25+, se desarrollan en el timo y pueden presentar un repertorio diverso de receptores T (TCR) que es específico para antígenos propios. Además, las Tregs pueden ser “inducibles” a partir de una célula T virgen (o *naive*) durante un proceso inflamatorio en los tejidos periféricos o generadas experimentalmente por propósitos terapéuticos [29]. Las Tregs parecen tener un papel central en la patogénia tumoral y han sido involucradas en la resistencia tumoral a las estrategias inmunoterapéuticas. Estas

INTRODUCCION

células tienen la habilidad de inducir la apoptosis e inhibir la proliferación y la maduración de los linfocitos T efectores antitumorales. En la **Figura 3** se describen los mecanismos básicos a través de los cuales las Tregs ejercen su acción inmunosupresora.

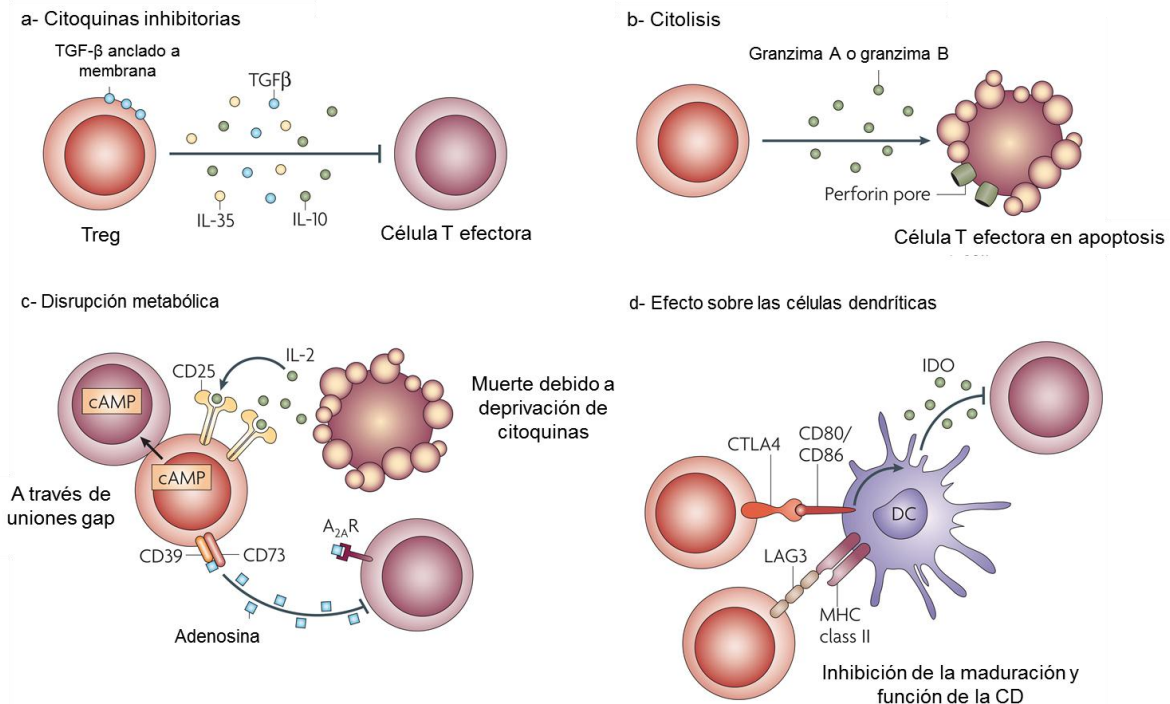


Figura 3. Mecanismos básicos utilizados por las Tregs. a- Secreción de citoquinas inhibitorias incluyendo IL-10, IL-35 y TGF β . b- Citólisis por mecanismos que involucran a la granzima A y B y a la perforina. c- Disrupción metabólica, que incluye apoptosis por privación de citoquinas mediante el receptor de alta afinidad CD25 (o receptor α de IL-2), inhibición mediada por AMP cíclico, e inmunosupresión mediada por el receptor de adenosina 2A. d- Modulación de la actividad de las CDs mediante mecanismos que involucran a LAG3 (o CD223) y CTLA-4, que estimula la inducción de la enzima IDO. Figura modificada de Vignali y col, 2008.

Las Tregs son una población heterogénea en lo que respecta a su origen, su actividad funcional y su estado de activación. Están categorizadas en dos grupos: Tregs derivadas del timo y Tregs periféricas derivadas de células T CD4+CD25+, también denominadas Tregs naturales e inducibles, respectivamente. Ambas subpoblaciones son fundamentales para el mantenimiento de la homeostasis del sistema inmune [30]. Si bien tanto las Tregs naturales como las inducibles han sido involucradas en la patogénesis del cáncer, Tregs naturales parecen ser clave en el escape inmune tumoral [31]. El factor de transcripción Foxp3 es un marcador específico de Tregs entre las poblaciones del sistema inmune. Las Tregs naturales expresan Foxp3 en forma estable, mientras que en las Tregs inducibles la expresión de Foxp3 es inducida por factores inmunosupresores como TGF- β [32]. Las mutaciones en el gen de Foxp3, que llevan a la pérdida de su función, conducen

INTRODUCCION

a la falta de Tregs, dando como consecuencia lesiones inflamatorias sistémicas fatales tanto en ratones como en el humano. Los niveles de expresión de Foxp3 parecen ser críticos para la función supresora que ejercen las Tregs. Ha sido observado que Tregs provenientes de ratones portadores de una alteración en la region 3' no codificante (UTR) del gen de Foxp3, poseían 10 veces menos contenido proteico de Foxp3, y eran incapaces suprimir a linfocitos T efectores [32].

Foxp3 forma parte de un gran complejo proteico que regula la expresión de genes claves para el fenotipo de célula Treg. Estudios recientes muestran que la función regulatoria de Foxp3 requiere de otros factores de transcripción como NFAT (factor nuclear de células T activadas), y AML1 (leucemia mieloide aguda 1), y también de histonas deacetilasas y acetiltransferasas [33]. Foxp3 es capaz de inducir un programa transcripcional que involucra el aumento de la expresión genes como CD25, CTLA-4, TNFRSF18 y LAG3 y suprimir genes proinflamatorios como IL-12 [34].

La región genómica del locus de Foxp3 tiene varias secuencias no codificantes conservadas (CNS1, CNS2 y CNS3) que juegan diferentes roles en la regulación de la transcripción de Foxp3. CNS1 contiene sitios de unión para NFAT y AP-1, y es esencial para la inducción de la expresión de Foxp3 en linfocitos periféricos. La unión del complejo RUNX1–CBF-b a la región CMS2 es crucial para la estabilidad de Foxp3 en las Tregs. La estimulación del TCR activa al factor REL, miembro de la familia de NF- κ B, de modo de permitir su unión a CNS3 lo que, a su vez, permite un cambio en la estructura de la doble hélice, aumentando la transcripción de Foxp3. La regulación de la expresión de Foxp3 aún no es comprendida por completo. Algunos trabajos muestran que las proteínas NFAT y AP-1 pueden unirse a la región promotora de Foxp3 y regular positivamente su transcripción. Otros posibles reguladores de la expresión de Foxp3 son el receptor de IL-2 (IL-12R). En casos de deficiencias genéticas en este receptor, han sido observadas anomalías en la función de Foxp3. La vía PI3K/Akt/mTOR parece estar involucrada en la diferenciación y función de las Tregs. Ha sido observado que la rapamicina, inhibidor de esta vía, promueve la diferenciación a Tregs, y la activación constitutiva de AKT disminuye de manera sustancial la transcripción de Foxp3 inducida por TGF- β [35].

La transcripción de Foxp3 también puede ser regulada a nivel epigenético y la estabilidad de la proteína puede ser controlada por modificaciones post- traduccionales.

INTRODUCCION

La estimulación con TGF- β incrementa la acetilación de la proteína Foxp3 y aumenta su asociación a la cromatina. Sin embargo, Foxp3 también puede sufrir ubiquitinación, lo cual llevan a su degradación. Tanto la ubiquitinación como la acetilación están restringidos a los residuos de lisina, de modo que ambos procesos compiten en el mantenimiento de la estabilidad de Foxp3. La fosforilación es una de las modificaciones post-traduccionales más estudiadas. Ha sido demostrado que la fosforilación en el residuo Ser418 de Foxp3 regula positivamente su actividad durante su unión al ADN. TNF- α induce la expresión de la proteína fosfatasa 1 (PP1) que específicamente desfosforila a Foxp3 en las Tregs en pacientes con artritis reumatoidea, conduciendo a una disminución en el número de Tregs y a la pérdida su función inmunosupresora [36].

Ha sido descrito que los pacientes oncológicos presentan altos niveles circulantes de Tregs. Típicamente, las Tregs constituyen el 5-10% de los leucocitos de sangre periférica, tanto en roedores como en humanos sanos [27]. Sin embargo, en sangre periférica de pacientes con cáncer, las Tregs pueden constituir hasta un 20-30% de las células CD4 + totales circulantes. Las Tregs infiltran el parénquima tumoral en diversos tipos de cáncer como mama, pulmón, hígado, páncreas, gastrointestinales y melanoma maligno. En cáncer de mama tanto la infiltración intratumoral de Tregs como los niveles circulantes de estas células aumentan con el estadio de la enfermedad [27]. Este aparente enriquecimiento es de particular importancia porque las Tregs parecen suprimir de forma dosis-dependiente a los linfocitos T efectores antitumorales [27]. La presencia de altas proporciones de Tregs entre los linfocitos que infiltran el tumor (TILs), y en particular la baja relación de células T CD8+ con Tregs Foxp3+/CD25+/CD4+, ha sido asociada con mal pronóstico en cáncer de mama y otros tumores [37]. Estos hallazgos indican que los linfocitos CD8+ reactivos frente al tumor están suprimidos por las Tregs Foxp3+. Ha sido propuesto que un mecanismo probable mediante el cual las Tregs infiltran el tejido tumoral es la producción del ligando de la quimioquina (motivo C – C) 22 (CCL22) por parte de las células tumorales o los macrófagos infiltrantes al tumor. CCL22 atrae y recluta al microambiente tumoral a Tregs que expresan el receptor de quimioquinas CCR4 [37]. Otras combinaciones de receptores de quimioquinas como CCR10-CCL28 y el receptor de ligando de quimioquina CXCR3-3 del receptor (CXCR) (como CXCL9, 10 y 11), también contribuyen a la infiltración intratumoral de Tregs [37].

INTRODUCCION

Debido a su papel central en el escape inmunológico tumoral, las Tregs han sido blanco de numerosas estrategias terapéuticas. Entre las estrategias terapéuticas que inhiben las Tregs, la más popular ha sido su depleción mediante la administración de anticuerpos anti-CD25, el receptor de interleuquina-2 (IL-2) [38], o de proteínas de fusión que combinan IL-2 con la toxina diftérica [39, 40]. En pacientes con cáncer de mama metastático la administración de un anticuerpo humanizado anti-CD25 depletó eficientemente las Tregs circulantes y mejoró la inmunidad antitumoral inducida por una vacuna antitumoral peptídica [38]. La administración de IL-2 recombinante fusionada al dominio catalítico de la toxina diftérica también reduce eficientemente los niveles y la función de las Tregs [41]. Sin embargo, no es claro aún si esta proteína depleta las Tregs o inhibe transitoriamente su función, y además su corta vida media dificulta su aplicación clínica [42]. Por otro lado, ambas estrategias carecen de especificidad, pudiendo eliminar tanto Tregs como células T efectoras [43] que expresan CD25 transitoriamente durante su activación [44-46]. La depleción sistémica de Tregs conlleva el riesgo de generar lesiones autoinmunes [47, 48]. Dado que los niveles de Tregs se recuperan rápidamente luego de la depleción, es importante lograr una inhibición sostenida de su función [49]. Dado que no han sido identificados marcadores de superficie que sean únicos de Tregs, un enfoque más específico para vencer la inmunosupresión mediada por Tregs involucra el bloqueo del factor de transcripción Foxp3, necesario para mantener el fenotipo inmunosupresor en estas células [50, 51]. Foxp3 puede ser bloqueado eficientemente utilizando el péptido penetrante de células (PPC) P60. Los PPCs son péptidos de menos de 30 aminoácidos, anfipáticos y con carga neta positiva, que penetran las membranas celulares [52]. Una de las ventajas de estos péptidos es que tienen la capacidad de penetrar las células rápidamente y en general no son tóxicos. P60 es un péptido de 15 aminoácidos que fue desarrollado utilizando una librería de fagos y tiene la capacidad de unirse a Foxp3 e inhibir su translocación nuclear y su habilidad para unirse a los factores de transcripción NF- κ B y NFAT. P60 reduce la actividad inmunosupresora de las Tregs tanto *in vitro* como *in vivo* [53]. Este péptido inhibe la acción inmunosupresora de Tregs humanas y murinas, aumentando la función efectora de los linfocitos T. La administración sistémica de este péptido a ratones aumentó la eficacia de vacunas profilácticas, inhibiendo el desarrollo de

INTRODUCCION

tumores hepáticos o previniendo el desarrollo de hepatitis C, sin generar signos aparentes de toxicidad [53].

IV. Inmunoterapias antitumorales

El objetivo de las estrategias inmunoterapéuticas es estimular al sistema inmune para que detecte y elimine a las células tumorales. Las modalidades inmunoterapéuticas pueden clasificarse en 4 tipos: activas y pasivas, específicas o no específicas (**Tabla 1**). El objetivo de la inmunoterapia activa es inducir una respuesta inmune antitumoral endógena y de larga duración, dada por el desarrollo de memoria inmunológica. La terapia en este caso puede tener una aplicación preventiva o terapéutica. Por otra parte, la inmunoterapia pasiva da lugar a una respuesta antitumoral mediante la administración de altas cantidades de moléculas efectoras. En contraste con la inmunoterapia activa, la inmunoterapia pasiva es de corto plazo y depende de la repetida administración del agente terapéutico [54]. Asimismo, ambas terapias pueden ser específicas, dirigidas hacia un antígeno particular, o no específicas.

Tipos de inmunoterapias		
Inmunoterapia	Pasiva	Activa
No específica	Terapia de transferencia adoptiva	Terapia con citoquinas, productos bacterianos, polímeros sintéticos, hormonas tiroideas
Específica	Terapia de transferencia adoptiva específica: CARs Inyección de anticuerpos monoclonales	Vacunas antitumorales: asociadas a tumor o a antígenos virales

Tabla 1. Clasificación de las inmunoterapias antitumorales.

IV.A. Inmunoterapia Pasiva No Específica

En general, la inmunoterapia pasiva no específica hace referencia a la terapia de transferencia adoptiva de linfocitos T, basada en la activación de células efectoras *ex vivo* y su subsecuente inyección al paciente. Las células utilizadas en esta terapia incluyen: linfocitos T CD8+ activados por linfoquinas (o células NK activadas por linfoquina, LAK), los cuales se obtienen de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) cultivadas

INTRODUCCION

in vitro en presencia de IL-2. Las células LAK mostraron un gran potencial para destruir células tumorales autólogas y alogénicas *in vitro*. Sin embargo, en ensayos clínicos de fase II y III esta terapia mostró baja eficacia en pacientes con diferentes tipos de cáncer, como colorectal, mama, pulmón, ovario, páncreas y riñón [55]. También se utilizan linfocitos T CD8⁺ obtenidos a partir de PBMCs y cultivados *in vitro* con IL-2, IL-1, IFN- γ y anticuerpos monoclonales anti-CD3, entre otros (células asesinas inducidas por citoquinas, CIK). Los ensayos clínicos de fase II y III muestran que la terapia con células CIK aumentó la supervivencia y el tiempo medio de progresión en pacientes con carcinoma de riñón [55].

IV.B. Inmunoterapia Pasiva Específica

La falta de especificidad de las primeras terapias de transferencia adoptiva ha llevado al desarrollo de otro tipo de terapia celular llamada Terapia de Células CIK activadas por células dendríticas (CD-CIK). En este caso las células CIK son cultivadas en presencia de CD^s autólogas las cuales presentan antígenos tumorales específicos. El tratamiento con CD-CIK en ensayos clínicos mostró un aumento en la supervivencia de los pacientes con cáncer de pulmón. La combinación de la terapia CD-CIK con otros tratamientos, como quimioterapia también aumentó la supervivencia de los pacientes con cáncer metastásico de pulmón. En cáncer de mama, la combinación de esta terapia con altas dosis de quimioterapia ha aumentado la supervivencia de las pacientes.

Otro tipo celular utilizado son los linfocitos infiltrantes a tumor (TILs). Ensayos clínicos demostraron que la terapia adoptiva utilizando TILs antitumorales en pacientes con melanoma metastásico refractario a las terapias estándares, indujo regresión tumoral en un 50-70% de los pacientes [55]. El principal inconveniente de esta terapia reside en el hecho de que no todos los tumores/pacientes poseen TILs antitumorales suficientes para el desarrollo de la terapia.

Por último, dentro de las terapias de transferencia adoptiva, existe una estrategia que utiliza células T modificadas genéticamente. Los linfocitos T derivados de PBMCs o los TILs son modificados utilizando vectores virales que codifican para TCR específicos para antígenos tumorales o receptores antigénicos quiméricos (CARs). La estructura del CAR consta de una porción extracelular, una de transmembrana y otra intracitoplasmática. La porción extracelular consta de un anticuerpo que reconoce al

INTRODUCCION

antígeno tumoral o un ligando de proteínas expresadas en la superficie del tumor. El dominio intracitoplasmático proviene de una de las cadenas del CD3, la molécula responsable de transducir señales de activación a través del TCR. En la actualidad, están siendo evaluados principalmente receptores quiméricos de segunda generación, para los cuales células T autólogas han sido modificadas para reconocer antígenos específicos y reprogramadas metabólicamente a través de receptores sintéticos. La ventaja de esta terapia es que ya no depende de la presencia de células específicas de antígeno del paciente. Además, a diferencia de los receptores TCR, los CARs son capaces de interactuar directamente con el antígeno en superficie, sin necesidad del HLA (o CMH), y por lo tanto es independiente del haplotipo de HLA y los niveles de expresión intratumorales que el paciente posea. También han sido integradas señales coestimuladoras dentro del mismo CAR de modo de lograr una eficiente expansión de células T cuando reconocen a las células blanco [56]. Los ensayos clínicos de fase I muestran que la terapia con CARs de segunda generación es eficiente en pacientes con linfoma de células B refractarios a la quimioterapia. La mayor respuesta a esta terapia fue obtenida en pacientes con leucemia linfática crónica (CLL) y leucemia linfática aguda (ALL) [57].

En los CARs de tercera generación han sido integradas señales coestimuladoras, como los receptores 4-1BB y CD28, u OX40 y CD28, de modo de lograr una eficiente expansión de células T cuando reconocen a las células blanco [56]. CARs específicos para HER2 o CD20 han sido evaluados, pero no se han observado beneficios clínicos significativos. Es necesaria más investigación para optimizar y definir mejor el potencial terapéutico de esta estrategia [56].

Si bien la terapia con CARs sigue siendo prometedora, los efectos tóxicos de esta terapia demuestran que todavía faltan más estudios. Los pacientes pueden presentar síndrome de liberación de citoquinas (CRS), síndrome de activación de macrófagos (MAS), neurotoxicidad y síndrome de lisis tumoral (TLS). El CRS y la neurotoxicidad son los problemas más frecuentemente encontrados en los tratamientos de leucemias de células B. Tanto CRS como MAS pueden ser controlados utilizando el anticuerpo monoclonal tocilizumab que bloquea la acción de IL-6 y reduce la inflamación. Sin embargo, los mecanismos que subyacen a los síntomas neurológicos asociados a la terapia, que incluyen afasia, temblor y convulsiones, aún no son totalmente comprendidos

INTRODUCCION

[58]. Los efectos colaterales de esta terapia pueden ser muy graves, como ha ocurrido en el ensayo clínico tipo II (ROCKET) llevado a cabo la compañía Juno Therapeutics para el tratamiento de la ALL de células B, en el cual se utilizó un CAR con capacidad de unión a la proteína CD19 en la superficie de los linfocitos B. Este ensayo debió ser suspendido por la *Food and Drug Administration* (FDA) debido al fallecimiento de 3 pacientes (<http://www.ascopost.com/News/42751>). Si bien estas terapias han sido diseñadas para ser específicas, la expresión de los antígenos tumorales seleccionados en tejidos normales, aún en bajas concentraciones, pueden llevar a estos graves efectos colaterales. Un paciente tratado con CARs específicas para HER2 murió por fallo respiratorio y disfunción multiorgánica debido a la expresión de HER2 en tejido pulmonar [59].

Las inmunoterapias pasivas también comprenden el uso de anticuerpos monoclonales (mAc) específicos u otros componentes del sistema inmune, desarrollados externamente y administrados al paciente. La característica principal de esta estrategia es que no estimula "activamente" al sistema inmune para que responda a una enfermedad, como sí lo hace la vacunación, por lo cual no desarrollan memoria inmunológica.

La utilización de mAc permite bloquear la función de determinados receptores/moléculas involucrados en la progresión tumoral. Han sido desarrollados y probados en ensayos clínicos de fase I, II, III diversos mAc, en diferentes tipos de cáncer. Entre los mAc podemos encontrar: (i) anticuerpos específicos para antígenos tumorales: el anti-EGFR, el receptor del factor de crecimiento epidérmico; anti-Her2, receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano y anti-CD20, un co-receptor expresado en los linfocitos B, con alta expresión en el caso de los linfomas no-Hodgkin's; (ii) anticuerpos contra factores tróficos del tumor, como anti-VEGF-A, factor de crecimiento endotelial vascular A; (iii) anticuerpos que inhiben células inmunosupresoras, como anti-IL-2Ra (CD25), expresado en las células T regulatorias; o (iv) mAc contra receptores regulatorios expresados en linfocitos T efectores, como anti-PD-1 y anti-CTLA-4.

Los anticuerpos que han sido aprobados por la FDA son el Cetuximab basado en el mAc anti-EGFR para el tratamiento de pacientes con cáncer colorectal y cáncer de cabeza y cuello; el Bevacizumab, basado en el anti-VEGF-A para el tratamiento de cáncer colorectal, pulmón de células no pequeñas, carcinoma renal, glioblastoma y cáncer de mama, así como también su combinación con quimioterapia para el tratamiento de cáncer

INTRODUCCION

de cuello uterino, epitelio ovárico, conducto de Falopio y peritoneal primario. Para pacientes con cáncer de mama ha sido aprobado el tratamiento con Trastuzumab (Herceptin, anti-HER2). El Ipilimumab, basado en el mAc anti-CTLA-4 ha sido aprobado para melanoma. Además, Rituximab (Rituxan, anti-CD20) ha sido aprobado para el tratamiento de pacientes con linfoma de células B no-Hodgkin's y otras leucemias linfáticas crónicas [55]. Si bien los anticuerpos mencionados han demostrado ser exitosos en la clínica, en muchos casos, la resistencia a la terapia se debe a la activación de receptores o vías alternativas durante la terapia. En los últimos años, se ha comenzado a desarrollar anticuerpos con múltiples especificidades. Por ejemplo, la FDA ha aprobado el Lapatinib, un anticuerpo capaz de bloquear a EGFR y HER2 para el tratamiento de tumores de mama HER2 positivos [60].

La administración de mAc presenta el riesgo de desarrollar reacciones inmunes como anafilaxis, enfermedad del suero (el sistema inmune reacciona contra el anticuerpo) y la generación de anticuerpos. Además, existen diversos efectos adversos generados por este tipo de terapia, que están relacionados con las moléculas seleccionadas para ser blanco de la terapia [61]. Por ejemplo la utilización de mAc anti-CTLA-4, genera reacciones autoinmunes, como reacciones cutáneas y gastrointestinales, endocrinopatías y hepatitis. Otros estudios demostraron desórdenes del sistema nervioso, sarcoidosis, respiratorios y renales [62]. Por otro lado, existen múltiples mecanismos mediante los cuales los pacientes portadores de tumores sólidos no logran alcanzar el beneficio terapéutico de la terapia con anticuerpos bloqueantes. Esto incluye la heterogeneidad en la expresión de los antígenos tumorales, las propiedades físicas y farmacocinéticas de los anticuerpos que tienen un impacto en la penetrancia en el microambiente tumoral. La dosis de los anticuerpos y su concentración dentro del tumor, así como la posible saturación en la cinética del receptor, también pueden impactar negativamente en el efecto terapéutico de la administración de mAc. Además, existen vías de señalización promiscuas, que pueden conducir a la escasa respuesta a la terapia y al subsecuente desarrollo de resistencia [63].

IV.C. Inmunoterapia Activa, No específica

INTRODUCCION

Dentro de esta clasificación, se incluye a los agentes que activan una respuesta inmune general. Entre ellos encontramos citoquinas como TNF- α , GM-CSF, IFN- α , como así también algunas interleuquinas como IL-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-21. Los efectos de las citoquinas sobre el sistema inmune pueden ser mediados por diferentes mecanismos que incluyen: (i) la estimulación de la proliferación, diferenciación, activación y tráfico de los linfocitos T efectores CD4+ y CD8+ y las células NK; (ii) la estimulación de la proliferación y diferenciación de células progenitoras del sistema hematopoyético, que lleva a la formación de granulocitos, monocitos/macrófagos y linfocitos T; y (iii) la estimulación de la síntesis de IFN- γ e inmunoglobulinas por células inmunes. En particular, la administración de GM-CSF, IL-2, IFN- α -2b e IL-12 fue evaluada en melanoma metastático, IFN- α y GM-CSF en leucemia mieloide e IFN- α -2b, IL-2 e IL-12 en cáncer de riñón [55]. La administración sistémica de citoquinas recombinantes como inmunoterapia antitumoral demostró regresión tumoral, prevención de la formación de metástasis, desarrollo de memoria inmunológica y reducción del riesgo de recurrencia, llevando a un aumento en la sobrevida sólo en modelos murinos de cáncer [64]. Esta terapia tiene como desventajas la necesidad de la administración reiterada de las citoquinas en cuestión durante el tratamiento, y la falta especificidad, que lleva a efectos secundarios graves como problemas hematológicos, pulmonares, endocrinos, autoinmunes y neurológicos, entre otros [65].

Para activar al sistema inmune, también se han empleado otros agentes basados en productos bacterianos. Generalmente, su efecto se basa en generar una reacción inflamatoria local dentro del microambiente tumoral que lleva a la activación de macrófagos y células NK. Por ejemplo, la administración de la vacuna de la tuberculosis conteniendo al bacilo no patogénico Calmette–Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum* (bacteria pseudodiftérica) crea una inflamación local que, en combinación con compuestos como imiquimod (agonista de TLR7/8), contribuye a la regresión tumoral, en particular del melanoma [55].

IV.D. Inmunoterapias Activas Específicas

Este tipo de terapia involucra la preparación de vacunas específicas de antígeno. El objetivo final de la terapia es lograr la correcta activación de células T

INTRODUCCION

antitumorales. Esta estrategia antitumoral posee diversas ventajas, entre ellas es la alta especificidad con la que los linfocitos T pueden reconocer antígenos antitumorales. Además, las respuestas primarias de células T generalmente son seguidas por la producción de células T de memoria de larga duración. Finalmente, la respuesta de la célula de T es adaptable y puede dar cabida no sólo la heterogeneidad del tumor sino también respuesta a nuevos antígenos expresados por los tumores recurrentes [66].

Existen vacunas profilácticas y vacunas terapéuticas. Mientras que el desarrollo de vacunas terapéuticas pueden beneficiar a pacientes portadores de diferentes tipos de cáncer [38], las vacunas profilácticas presentan un gran potencial para aquellos pacientes con riesgo a desarrollar tumores, por ejemplo, pacientes con predisposición genérica genética o con altos niveles de biomarcadores tumorales [39]. Antígenos de diferentes virus que pueden inducir cáncer pueden ser utilizados como vacunas. Como ejemplo, podemos citar el virus del papiloma humano (HPV), que puede causar cáncer cervical y los virus de hepatitis B y C, capaces de inducir cáncer hepático, entre otros. Estas vacunas pueden ser utilizadas como agentes terapéuticos para la activación de una respuesta inmunológica específica eficaz, activando linfocitos efectores T para destruir las células infectadas por esos virus. Por otra parte, pueden utilizarse antígenos asociados a tumores. Un ejemplo es la vacuna basada en el péptido E75 obtenido a partir de la proteína HER2/neu, cuya sobreexpresión es típica en cáncer de mama. Pruebas clínicas han demostrado la eficacia de esta vacuna en la prevención de la enfermedad recurrente en pacientes con alto riesgo de desarrollar este tipo de cáncer [55].

Dentro de las vacunas terapéuticas, han sido desarrolladas modalidades de vacunación que utilizan inyecciones de restos de células tumorales o péptidos expresados en el tumor [67, 68] y vacunas compuestas por CDs cargadas con restos de células tumorales [69-72] o antígenos tumorales [73, 74]. En la actualidad, la FDA ha aprobado la terapia con Sipuleucel-T (Provenge) para el tratamiento de cáncer de próstata metastático, basada en vacunas de CDs antitumorales [75]. Estas modalidades de vacunación también han sido estudiadas en distintos modelos murinos de tumores mamarios [76, 77]. A pesar de que en pacientes portadoras de tumores mamarios la administración de vacunas autólogas fusionadas con células tumorales estimulan al sistema inmune, esta respuesta no es suficiente para inducir regresión tumoral [70, 77].

INTRODUCCION

Considerando que las vacunas antitumorales han sido extensamente evaluadas en pacientes oncológicos, mostrando perfiles toxicológicos aceptables, y que han sido desarrolladas las técnicas necesarias para su aplicación clínica, es importante encontrar adyuvantes que incrementen la inmunidad antitumoral inducida por estas vacunas para lograr una respuesta clínica significativa. Los protocolos de producción y administración de las vacunas antitumorales necesitan aún ser optimizados. El éxito de esta estrategia terapéutica parece depender de la capacidad de obtener un número suficiente de CD8 maduras con capacidad de brindar las cuatro señales críticas para la adecuada inducción de células T específicas contra el tumor. Una cuestión importante que sigue siendo controvertida es definir cuál es el mejor estímulo para madurar a las CD8. La combinación de distintos agonistas de TLR puede incrementar la inmunidad antitumoral [78, 79]. Ha sido propuesto que la activación simultánea de múltiples TLRs en las CD8 es necesaria para alcanzar una respuesta inmune efectiva [78, 79]. La elección apropiada de los adyuvantes de las CD8 tendrá un impacto directo en el fenotipo de las células, el nivel relativo de moléculas coestimuladoras, los niveles y el perfil de producción de citoquinas y la vida útil de la célula, entre otras características [15]. Por otro lado, ha sido postulado que la respuesta inmune endógena de muchos pacientes es todavía insuficiente para detener la progresión tumoral debido a la alta expresión de moléculas supresoras expresadas por las células T o B regulatorias, o las células mieloides presentes en el microambiente tumoral [28]. Por ello, la combinación de vacunas antitumorales con estrategias que bloqueen la inmunosupresión característica del tumor es una modalidad terapéutica interesante para mejorar la inmunidad antitumoral y aumentar la supervivencia de los pacientes con cáncer.

V. Inmunoterapia en cáncer de mama

Tradicionalmente, el cáncer de mama ha sido considerado poco inmunogénico cuando se compara con otros tipos de cánceres como el melanoma o el cáncer renal. Esto ha resultado en un retraso importante en el desarrollo y la aplicación de estrategias inmunoterapéuticas para esta enfermedad. Sin embargo, el cáncer de mama es capaz de estimular al sistema inmune. El análisis molecular de ciertos tumores de mama ha demostrado que existe un alto nivel de activación de genes inmunoreguladores [80]. Ha

INTRODUCCION

sido observado que algunos tumores de mama presentan una infiltración importante de linfocitos y que existe una correlación positiva entre el número de células T infiltrantes al tumor y el pronóstico favorable de la paciente [81]. Sin embargo, la mayoría de los cánceres de mama tienen modesta infiltración de células T y presentan altos niveles de Tregs intratumorales.

Hay que tener en cuenta, además, que los subtipos de cáncer de mama difieren en el nivel de células inmunes infiltrantes al tumor (TILs). Los pacientes portadores de tumores triples negativos tienen mayor número de células T infiltrantes que cualquier otro subtipo. Ha sido postulado que la inestabilidad genómica de las células en estos tumores provee de nuevos antígenos que el sistema inmune es capaz de detectar. El subtipo de tumores que expresa receptores de hormonas es aquel asociado con una respuesta inmune más débil. Sin embargo, pacientes con tumores HER2+ también han mostrado poseer un número significativo de TILs [82].

El tratamiento con terapias tradicionales parece tener efectos inmunomediados en cáncer de mama. La administración de taxanos y de docetaxel aumenta la infiltración intratumoral de linfocitos T [83, 84]. Por otra parte el tratamiento con trastuzumab induce una respuesta citotóxica celular dependiente de anticuerpos, llevando a la destrucción de células tumorales HER2 mediada por células NK que es incrementada por el tratamiento concomitante con agentes quimioterapéuticos [85].

En conclusión, existe evidencia robusta que muestran que el cáncer de mama, en particular los subtipos más agresivos Her2-positivos y triple negativos, puede generar una respuesta antitumoral y dicha respuesta correlaciona con el pronóstico de vida de las pacientes. De esta manera resulta de gran interés el desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de esta patología [86].

HIPOTESIS DE TRABAJO

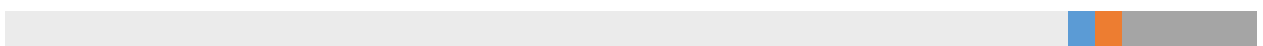
El desarrollo de estrategias de inmunoterapia antitumoral ha crecido exponencialmente en los últimos años. Las células dendríticas (CDs) han sido ampliamente utilizadas para el desarrollo de vacunas antitumorales debido a su rol en la inducción de la respuesta inmune adaptativa mediada por células T. Aunque las vacunas de CDs inducen inmunidad antitumoral, esta respuesta no es suficiente para obtener beneficios terapéuticos significativos. Los linfocitos T regulatorios han sido involucrados en la relativamente baja eficacia de la inmunoterapia en la clínica oncológica, como así también en el escape inmunológico en pacientes con cáncer de mama. Nuestra hipótesis es que el bloqueo de Foxp3, un factor de transcripción necesario para la función de los linfocitos T regulatorios, aumentará la eficacia terapéutica de vacunas antitumorales de CDs para el tratamiento del cáncer de mama, incrementando la inmunidad antitumoral y derivando en un beneficio clínico significativo.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de este trabajo fue evaluar la eficacia de una estrategia inmunoterapéutica que utiliza la administración de vacunas antitumorales de CDs en combinación con un péptido inhibidor de Foxp3 en modelos murinos de adenocarcinoma mamario metastásico.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- I. Evaluar el valor traslacional de modelos murinos de cáncer de mama para la evaluación preclínica de estrategias inmunoterapéuticas que involucren la modulación de células T regulatorias.
- II. Determinar las condiciones de cultivo y maduración/activación de las preparaciones de CDs para la generación de vacunas antitumorales.
- III. Estudiar el efecto del bloqueo de Foxp3 en combinación con vacunas antitumorales de CDs en modelos murinos de cáncer de mama.
- IV. Explorar el efecto antitumoral directo del bloqueo Foxp3 en células murinas y humanas de cáncer de mama.



MATERIALES AND MÉTODOS

Líneas celulares murinas

Se emplearon dos líneas de carcinoma mamario que son singeneicas en ratones BALB/c. Las células 4T1 fueron generosamente provistas por el Dr Podahjcer (Instituto Leloir, Buenos Aires Argentina) y cultivadas en medio RPMI 1640 conteniendo 10% suero fetal bovino (SFB, Natocor), 1% L-glut (GIBCO) y 1% Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies). Las células LM3 fueron amablemente provistas por la Dr Elisa Bal de Kier Joffé (Roffo Hospital, Buenos Aires Argentina) y cultivadas en RPMI suplementado con 10% SFB (Natocor), 1% L-glut (GIBCO) 1% Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies).

Líneas celulares humanas

La línea MDA-MB-231 fue cultivada en medio RPMI 1640 conteniendo 10% SFB (Natocor), 1% L-glut (GIBCO) y 1% Penicilina-Estreptomicina (Life Technologies). La línea MCF7 fue cultivada en medio DMEM rico en glucosa (EMEVE) suplementado con 10% SFB y 1% Penicilina-Estreptomicina. Ambas líneas son derivadas de metástasis pleural de adenocarcinomas de mama humanos. La línea celular MCF10, una línea epitelial de mama no tumorigenica, fue amablemente provista por la Dra. Andrea Randi (Departamento de Bioquímica Humana, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires). Esta línea fue cultivada en medio DMEM/F12, con 1% L-glutamina y suplementada con 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico, 100 ng/ml de toxina colérica, 5 ng/ml de insulina, 500 ng/ml de hidrocortisona y 5% de SFB.

Animales

Ratones hembras adultas BALB/c, C57BL/6 y *nude* (6-8 semanas) se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-25° C) y luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 hs). Los ratones fueron alimentados con comida estándar de laboratorio y agua *ad libitum*. El trabajo con animales se llevó a cabo según las indicaciones del NIH y con aprobación del Comité de Ética Institucional de la Facultad de Medicina (UBA, CD Res. N°120/2011).

Inoculación de células tumorales

Los ratones fueron inoculados con 200.000 a 500.000 células LM3 o 4T1 de manera subcutánea en el flanco lateral en ratones inmunocompetentes. En el caso de los

MATERIALES Y METODOS

ratones *nude*, se inocularon 2×10^6 células LM3 sc. La medición de los tumores se realizó 3 veces por semana utilizando un calibre. El tamaño tumoral fue calculado con la fórmula $\text{diámetro menor}^2 \times \text{diámetro mayor} / 2$. Los animales fueron eutanasiados según la fecha determinada en el experimento o cuando presentaron signos de distrés bajo anestesia profunda seguida de perfusión terminal con solución de Tyrode (ClNa 132 mM, Cl₂Ca 1,8 mM, PO₄NaH₂ 0,32 mM, glucosa 5,56 mM, CO₃NaH 11,6 mM, y ClK 2,68 mM) seguida por solución de Bouin (71% ácido pícrico (saturado), 24% formaldehído (37-40%), 5% ácido acético glacial).

Recuento de metástasis pulmonares

Para la visualización de metástasis pulmonares espontaneas los pulmones fueron fijados en solución de Bouin (85% solución de ácido pícrico saturada, 10% formol (40%) y 5% ácido acético) durante 2 días. Luego los lóbulos pulmonares fueron separados con precaución y se procedió al recuento de las metástasis pulmonares superficiales bajo lupa estereoscópica binocular.

Cortes histológicos en parafina

Los tumores y pulmones fueron fijados en paraformaldehído (PFA) 4% en buffer fosfato salino (PBS) y se incluyeron en parafina según técnicas de rutina. Cortes de 5 μm fueron desparafinizados en xileno y se rehidrataron con una serie de alcoholes de graduación decreciente (etanol 100%, etanol 96%, etanol 70%) hasta agua destilada. Los cortes se tiñeron con hematoxilina de Mayer (4 min), eosina (MARCA) 5 minutos, se incubaron en agua corriente durante 5 min, se deshidrataron con alcoholes de graduación creciente, se aclararon con xilol y se montaron con bálsamo de Canadá sintético.

Cálculo de índice mitótico

El índice mitótico se define como la relación entre el número de células que están en mitosis dividido por el número total de células contabilizadas. Este índice fue evaluado sobre cortes histológicos de parafina de tumor coloreados con hematoxilina-eosina.

Cortes histológicos en criostato

Los tumores y pulmones fueron extraídos luego de la perfusión con solución de PFA 4% y se mantuvieron en dicha solución durante dos días. A continuación los tejidos fueron incubados en solución de sucrosa al 20% durante dos días o hasta que se

observa la precipitación de los mismos. Luego los tumores y pulmones fueron congelados en isopentano en hielo seco. Finalmente, se realizó la inclusión medio Cryoplast (Biopack), y se realizaron cortes gruesos de 50 μm en criostato.

Inmunohistoquímica de cortes de criostato

Se utilizó la técnica de *free-floating* en la cual los cortes de tumores fueron incubados en medio líquido durante todo el proceso. La recuperación antigénica se realizó con buffer citrato (10 mM de ácido cítrico en agua destilada, pH 6) durante 5 min en microondas. Los cortes fueron lavados con PBS e incubados con TBS-5% Tritón durante 5 minutos. El bloqueo se realizó con TBS-2%-triton-10% suero de burro durante 1 hora. Luego se incubaron con anticuerpos específicos para los marcadores de ratón CD45, CD8, CD19, CD4, CMH II (Serotec, Cat# MCA-1031-GA; MCA-609-GA; MCA-1439-GA, MCA-1767-GA, MCA-45-GA, respectivamente) y Foxp3 (eBioscience, Cat# 14-5773-82) durante toda la noche. Los cortes fueron lavados durante media hora e incubados con anticuerpo anti-rat-FITC (Vector) durante dos horas. Luego de ser lavados se procedió a la marcación de los núcleos con DAPI, para finalmente ser montados en Vectashield (DAKO).

Purificación de células inmunes de tumor por gradiente de Percoll

Los tumores fueron extraídos y disgregados con homogeneizador de vidrio. Se ajustó el volumen con RPMI a 7 ml en tubos de 15 ml y se agregaron 3 ml de Percoll 90% en PBS frío. En la parte inferior del tubo se adicionó 1 ml de Percoll 70% en PBS utilizando pipeta de 1 ml, para asegurarse de obtener dos fases. Luego, de centrifugar a 2200 rpm por 20 minutos a 4°C se aspiró y descartó la fase superior que consiste en extractos ricos en lípidos, y se procedió a recoger la interfase. Se agregaron 10 ml de RPMI frío, se mezcló por inversión y centrifugo a 1500 rpm por 5 minutos. Luego del recuento de las células se procedió a su inmunomarcación directa con anticuerpos anti-CD45, anti-CD4-Percyp 5.5, anti-CD8-FITC, anti-Foxp3-APC y anti-CD25 FITC para su análisis por citometría de flujo, como se describe más abajo.

Obtención de esplenocitos

Se disgregó el bazo utilizando homogeneizador de vidrio. Los esplenocitos fueron resuspendidos en 5 ml de medio y centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos en frío. El pellet obtenido fue resuspendido en 3 ml de medio de lisis ACK (0.15 M NH_4Cl , 10 mM

MATERIALES Y METODOS

KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA) por 3 minutos en frío. Se diluyó el medio con 7 ml de RPMI con 10% de SFB. Se centrifugaron las células para luego ser resuspendidas, cuantificadas y procesadas para su inmunomarcación. Luego del recuento de las células se procedió a su inmunomarcación directa con anticuerpos anti-CD45 anti-CD4-PerCPy5.5, anti-CD8-FITC, anti-Foxp3-APC y anti-CD25 FITC para su análisis por citometría de flujo como se describe más abajo.

Citometría de flujo para antígenos de superficie

Las células fueron lavadas en buffer de citometría (PBS con 1% de SFB) e incubadas por 30 minutos a 4°C en el mismo buffer conteniendo los siguientes anticuerpos murinos conjugados con compuestos fluorescentes (BioLegend): anti-CD45-PE (Cat# 103105), anti-CD4-PerCP/Cy5.5 (Cat# 100539), anti-CD8-FICT (Cat# 100705), anti-CD11c-PE (Cat# 117307), anti-CD86-FICT (Cat# 105005), anti-CMH II-FITC (Cat# 107605). Se utilizó también anti-CD25-FITC (eBioscience, Cat# 53-0253-80). Además, las células fueron incubadas en presencia de los controles de isotipo correspondientes. Luego las células fueron lavadas, fijadas con paraformaldehído 2% en frío por 10 minutos y mantenidas en PBS-0,1 % azida sódica hasta su análisis por citometría de flujo en FACS Aria II (Servicio de citometría de flujo del Hospital de Clínicas de la Universidad de Buenos Aires). Los datos fueron analizados usando los softwares Summit v4.3 (DAKO), WinDMI 98 o Flowing Software 2.5.1.

Citometría de flujo para el antígeno intracelular Foxp3

Las células fueron lavadas en buffer de citometría y luego se utilizó el kit de Fijación/Permeabilización (eBioscience, Cat# 00-5523-00), según instrucciones del fabricante. Las células fueron luego incubadas con un anti-Foxp3-APC murino (eBioscience, Cat# 17-5773-82). En el caso de las células LM3 la expresión de Foxp3 fue evaluada luego de la incubación por 24 hs en presencia de 50 µM de Rapamicina (Cayman Chemical Company, Cat# 53123-88-9), un inhibidor de la vía de mTOR, 50 µM de Indometacina (Montpellier), un inhibidor de la vía de Cox o 10 ng/ml de TGF-β recombinante humano (Cayman Chemical Company, Cat# 6164552UG) .Los datos fueron analizados usando los softwares Summit v4.3 (DAKO), WinDMI 98 o Flowing Software 2.5.1.

Cultivos de células dendríticas murinas

MATERIALES Y METODOS

Fémures y tibias provenientes de ratones BALB/c fueron removidos y el tejido muscular circundante fue resecado. Los extremos fueron cortados con tijera y la médula ósea fue colectada mediante irrigación con medio RPMI. Los eritrocitos fueron lisados con solución ACK durante 3 minutos en hielo como se indicó más arriba. Los leucocitos se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB, Natocor), 2 mM L-glutamina (GIBCO), 100 IU/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina (Life Technologies) y 1% β-mercaptoetanol (SIGMA). Los leucocitos (10^7) se sembraron en placas de petri de 100 mm² y luego de 24 hs a 37°C, las células no adherentes fueron removidas mediante lavado con PBS. Las células adherentes fueron entonces suplementadas con RPMI conteniendo 50 ng/ml IL-6 (BioLegend, Cat# 575704) y 100 ng/ml Ftl3L (Preprotech, Cat# 250-31L) o 10 ng/ml de IL-4 (BioLegend, Cat# 574304) y 10 ng/ml de GM-CSF (BioLegend, Cat# 576304). Medio fresco con citoquinas fue adicionado cada 3 días. Las células no adherentes fueron recogidas luego de 7-10 días y procesadas para citometría de flujo o sembradas en placas de 24 wells para inducir su activación por 2, 24 o 48 horas en medio sin citoquinas y en presencia de 10 µg/ml de ODN CpG 1826 (Eurofins Genomics) o 10 µg/ml de R848 (Santa Cruz Biotechnology, Cat# 203231) o ambos agonistas en las mismas concentraciones finales. Para los experimentos que implican el bloqueo de la vía de NF-kappa se utilizó 2µM de BAY117082 (Enzo Life Sciences International, BML-EI278) o 10 µM de Ro 106-9920 (Tocris). En el caso de los experimentos de bloqueo de las óxido nítrico sintasas se utilizó 0,5 mM de *N*_ω-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, Sigma-Aldrich, N5751), un análogo de la arginina que inhibe la producción de NO. El 1-Metil-D-triptopano (1-D-MT), un inhibidor de la enzima indolamina 2,3 dioxigenasa 1 (IDO) fue adquirido en Santa Cruz Biotechnology (sc-200313).

Ensayo de ELISA

IL-12p70, IFN-γ, TNF-α e IL-10 fueron medidos en los sobrenadantes de cultivos de CDs mediante la técnica de ELISA luego de la incubación por 24 hs con los agonistas de los TLR, siguiendo el protocolo del fabricante (eBioscience ELISA Ready-Set Go! IL-12p70 cat#88-7121, IFN-γ cat#88-7314, TNF-α cat#555268 and BioLegend Mouse IL-10 ELISA MAXTM Deluxe cat#4314). La absorbancia fue leída en placas de 96 wells (Spectramax Plus, Molecular Devices) a 450 nm.

Ensayo de fagocitosis en CDs murinas

Luego de 2, 24 o 48 hs de incubación con CpG1826, 10 µg/ml, R848, 10 µg/ml o ambos, las CDs fueron lavadas, y sembradas en placas de 24 wells en presencia de microesferas fluorescentes de 1.0 µm (10 microesferas por célula, Invitrogen, Molecular Probes, *Cat # F8823*). Luego de 16 hs a 37°C, o 4°C como control, las células fueron recogidas, lavadas y fijadas con PFA 4%. Las células fueron marcadas con anti-CD11c (BioLegend) o anti-CMHII (ABC Serotec MCA Cat# 2401) por 1 h y luego lavadas e incubadas con Dylight™ 594 anti-IgG de hamster o de rata (1:400, BioLegend). El núcleo fue coloreado con Nuclei DAPI (5 µg/ml, Molecular Probes, Cat# D1306) y montado con Vectashield (Vector, Cat# H-1000). El recuento celular se realizó con un microscopio de fluorescencia.

Reacción de leucocitos mezclados (MLR) alogeneicos con CDs murinas

Las CDs fueron incubadas con lisados de células 4T1 en relación 1 CD:3 células 4T1. Luego, las CDs fueron lavadas y activadas con 10 µg/ml de CpG 1826, R848 ambos por 2, 24 ó 48 hs. Las células fueron fijadas con PFA 2% frío y lavadas para ser utilizadas como estimuladoras en MLR alogeneicos. Esplenocitos de ratones C57/Bl6 fueron obtenidos como se indicó más arriba. 200.000 esplenocitos fueron incubados en placas de 96 wells con las CDs como estimulador alogeneico (1:10) en 100 µl de RPMI suplementado a 37°C. Esplenocitos sin CDs fueron incubados como control. Dos días después, 10 µl de solución de bromodeoxiuridina (BrdU) (1:100) fue adicionada al medio por 18 hs adicionales y la incorporación de BrdU a la cadena de ADN fue medida mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Millipore, *Cat #2750*). La absorbancia de las muestras fue medida mediante un lector de placa a 450 nm.

Western blotting

Las proteínas fueron extraídas utilizando buffer de lisis (pH 7.9) conteniendo 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1% IGEPAL CA-630, 0.2 mM etilenediaminetetraacético ácido (EDTA) en 10 mM Hepes, 2.5 mM fluoruro de sodio, 0.5 mM ortovanadato de sodio e inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, Cat#P8340). Luego de centrifugar por 12000 g durante 30 min, el sobrenadante fue recuperado. La concentración proteica de cada muestra fue determinada mediante el ensayo de

MATERIALES Y METODOS

Bradford (Bio-Rad). 10-20 μg de proteínas fueron sembradas en membranas de 12% de poliacrilamida y un gel de apilamiento con 3% de poliacrilamida. Se realizó la corrida electroforética en una cuba de electroforesis (Bio-Rad) con buffer de corrida (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 1 g de SDS, en un volumen final de 1000 ml) a 150 V durante 30 min. Se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences), utilizando buffer de transferencia (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 200 ml de metanol en un volumen final de 1000 ml), ON a 60 mA en una cuba de transferencia (BioRad). Se comprobó la transferencia de proteínas a la membrana por tinción con Ponceau S 0,1% en 1% de ácido tricloroacético. Se comprobó la igualdad de carga proteica en cada calle revelando las membranas con un anticuerpo anti- β -actina (Santa Cruz Biotech). Las membranas se bloquearon con TBS con 5% BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS con Tween 20 al 0,1% con agitación. Se procedió a la incubación ON con los anticuerpos anti-fosfo-p65-NF- κ B (Santa Cruz, Cat# 33039) o anti-Foxp3 (eBioscience, Cat# 14-7979-80) y β -actina (Sigma-Aldrich, Cat# A2066). A continuación, post lavado de las membranas, se incubo con el anticuerpo secundario anti-rabbit HRP (Millipore, Cat# AP103P). La inmunoreactividad fue detectada mediante quimioluminiscencia (ECL plus, Amersham Biosciences). El escaneo de las bandas se realizó utilizando el Image Quant 300, en el análisis de las mismas se utilizó el software Image Quant TL software (Amersham Biosciences, GE).

Preparación de vacunas de células dendríticas

Precusores de médula de ratón fueron incubados con GM-CSF e IL-4 por 7 días como se describió más arriba. Las CDs obtenidas fueron incubadas con lisados tumorales (3 células tumorales 4T1 o LM3: 1 CDs) durante 3 horas. Los lisados de células tumorales fueron obtenidos por ciclos repetidos de congelamiento-descongelamiento y conservados en medio RPMI a -70°C . Las células fueron lavadas y al momento de la inyección se adicionó 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ODN CpG₁₈₂₆, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R848 o ambos.

Vacunación profiláctica con CDs en modelos murinos de cáncer de mama

El día 1 y 14 previo a la implantación tumoral, ratones hembra BALB/c fueron inyectados con vacunas de CDs por vía s.c. (300.000-500.000 CDs/ratón). En el día 0, los animales fueron inyectados en el flanco con 200.000 células 4T1 o LM3 s.c. Los animales

fueron monitoreados diariamente y ante la aparición de los primeros signos de dolor/distrés fueron eutanasiados bajo anestesia profunda seguida de perfusión terminal como se indicó más arriba.

Cultivos de células dendríticas humanas

Los monocitos fueron purificados de sangre periférica (PBMCs) de donantes adultos sanos, no fumadores, utilizando buffy coats en el Servicio de Medicina Transfusional del Hospital Italiano de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina) mediante centrifugación con gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences, Germany). Las células CD14⁺ fueron entonces aisladas por selección positiva de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Germany). La pureza, analizada por citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CD14 fue mayor al 95%. Los monocitos (1×10^6 /ml) fueron cultivados en medio RPMI1640 suplementado con 10% de SFB inactivado, 50 U/ml penicilina, 50 μ g/ml estreptomicina en presencia de 20 ng/ml IL-4 y 20 ng/ml GM-CSF, en placas de 6 wells. En el día 5, las células fueron analizadas por citometría de flujo y la expresión de CD1a fue analizada como marcador de la diferenciación de CD. La generación de CD humanas fue aprobada por el Comité de Ética de la Academia Nacional de Medicina (Buenos Aires, Argentina, CEIANM 76/2015). Todos los donantes de sangre dieron su consentimiento informado para la colecta de la muestra y el subsecuente análisis.

Evaluación de marcadores de coactivación en CD humanas

Las CD fueron incubadas con los agonistas de TLR9 humano, CpG2006 o IMT504, 10 μ g/ml o el agonista de TLR7/8 humanos R848, 10 μ g/ml durante 24 horas en presencia de GM-CSF e IL-4. Las células se procesaron para el análisis por citometría de flujo como se indicó más arriba utilizando anticuerpos anti-CD86 y anti-HLA-DR (BD Biosciences).

Ensayo de fagocitosis en CD humanas

Las CD fueron incubadas con los agonistas de TLR 24 horas, luego fueron lavadas e incubadas por 16 horas con las microesferas. A continuación se procedió como se explicó más arriba.

MLR alogeneicos con CD humanas

MATERIALES Y METODOS

Las células T CD4⁺ *naïve* fueron purificadas a partir de las PBMC mediante selección negativa con perlas magnéticas utilizando el *naïve CD4⁺ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec), según recomendaciones del fabricante. Las CDs humanas fueron incubadas con los agonistas de TLR9, CpG2006 o IMT504 o el agonista de TLR7/8, R848 durante 2 horas en presencia de las citoquinas de cultivo. Al cabo de ese tiempo, las células fueron lavadas con pbs y se incubaron con linfocitos T provenientes de dadores sanos durante 72 horas en relación 1CD:2 linfocitos T. Esplenocitos sin CDs fueron incubados como control. . Dos días después, 10 µl de solución de BrdU (1:100) fue adicionada al medio por 18 hs adicionales y la incorporación de BrdU a la cadena de ADN fue medida mediante la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (Millipore, *Cat #2750*). La absorbancia de las muestras fue medida mediante un lector de placa a 450 nm.

Vacunación terapéutica con CDs en combinación con el bloqueo de Foxp3 en modelos murinos de cáncer de mama

Hembras BALB/c fueron inoculadas con 200.000 células LM3 o 4T1. Cuando los tumores fueron palpables los animales recibieron una vacuna de CDs (300.000 CDs aproximadamente) s.c cargada con lisados tumorales y activadas con CpG en el momento de la vacunación como se indicó más arriba. Los animales recibieron 6-7 inyecciones i.p. diarias de 100 µg de péptido inhibidor de Foxp3 P60 (RDFQSFRKMWPFFAM) y el péptido control P301 (MKMFFDAFPQRRSWF) generosamente donados por los Dres Noelia Casares y Juan José Lasarte (Universidad de Navarra). Los animales fueron eutanasiados como se indicó más arriba a distintos tiempos post-tratamiento o ante los primeros síntomas de distrés.

Tratamiento con P60 en ratones inmunosuprimidos portadores de tumores de mama

Hembras *nude* fueron inoculadas con 200.000 células LM3. A partir del momento en que los tumores fueron palpables los animales recibieron 7 inyecciones i.p. diarias de 100 µg de péptido inhibidor de Foxp3 P60 y el péptido control P301. Los animales fueron eutanasiados como se indicó más arriba al finalizar el tratamiento o ante los primeros síntomas de distrés.

Detección de Foxp3 en líneas tumorales murinas y humanas

MATERIALES Y METODOS

Las células fueron sembradas en sobre vidrios en placas de 24 wells. Al cabo de 24 hs., fueron fijadas con acetona, durante 15 minutos a -20°C. Luego de ser lavadas con PBS, se procedió al bloqueo con 10% suero fetal equino, 2% seroalbúmina bovina en PBS, durante 2 horas. La inmunomarcación se realizó con un anti-humano-ratón Foxp3 (BioLegend, Cat# 623802) durante toda la noche. Se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo-FITC (Vector, Cat# FI-1000).

Análisis de proliferación celular

Las células tumorales fueron incubadas en presencia de P60 o P301 (50 nM) durante 24 horas. Se adicionó BrDU al medio de incubación 4 horas antes de terminar el ensayo. La incorporación de BrDU por las células en proliferación fue detectada por ELISA (ROCHE). La absorbancia fue determinada por lector de placa (abs 450 nm).

Análisis de viabilidad celular

Las células tumorales fueron incubadas en presencia de P60 o P301 (50 nM) durante 24 horas. Al cabo de este tiempo las células fueron lavadas con solución de Krebs (0,9% NaCl, 1,15% KCl, 1,22% CaCl₂, 2,1% KH₂PO₄, 3,8% MgSO₄, 2,6% NaHCO₃) e incubadas con 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT, Molecular Probes) durante 4 horas. Luego la reacción fue finalizada utilizando una solución 6 N HCL. La absorbancia fue determinada por lector de placa (Abs 595nm).

Desarrollo de vectores para el bloqueo terapéutico de Foxp3

Se desarrolló un plásmido que codifica para el péptido inhibidor de Foxp3, P60, unido mediante una secuencia IRES a un gen reportero (d-Tomato) bajo el control del promotor de CMV murino. El vector control codifica para d-Tomato bajo el control del CMV humano. Los plásmidos fueron construidos por VectorBuilder. Células 4T1 fueron transfectadas con 1 µg de ADN de cada uno de los plásmidos empleados y el reactivo de transfeccion Lipofectamina, según las indicaciones del fabricante (Productos Bio-Logicos, Argentina). El medio condicionado de estas células fue colectado luego de 24 hs y utilizado para incubar células LM3 por 24 hs adicionales. La viabilidad y la secreción de IL-10 fueron evaluadas como se indicó más arriba.

Análisis Estadístico.

Los datos fueron graficados y analizados usando el software GraphPad Prism versión 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California USA). Las curvas de sobrevivencia Kaplan

MATERIALES Y METODOS

Meier fueron analizadas usando el log test Rank Mantel. Los datos de crecimiento tumoral fueron analizados mediante análisis de regresión múltiple. Los datos de citometría de flujo, viabilidad, proliferación, MLR, Western Blot, ELISA, número de metástasis fueron analizados mediante el análisis de la varianza de una o dos vías (ANOVA) seguido del test de Tukey o test de t de Student de acuerdo al número de grupos. Los porcentajes de células fagocíticas o células inmunoreactivas para Foxp3 fueron analizados mediante el test de χ^2 . Las diferencias entre grupo fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$.

CAPITULO I

**Caracterización de los modelos murinos inmunocompetentes de
carcinoma mamario metastásico**

RESULTADOS

I. Caracterización de los modelos murinos inmunocompetentes de carcinoma mamario metastásico

Para evaluar las estrategias terapéuticas propuestas utilizamos dos modelos experimentales de cáncer de mama murino, LM3 y 4T1. Ambos modelos se caracterizan por ser singeneicos en ratones BALB/c. Esta característica los hace apropiados para el estudio de inmunoterapias antitumorales ya que el sistema inmune de estos ratones está intacto y, en ellos, las células tumorales no son inmunogénicas *per se*.

I.A. Características del modelo experimental LM3

La línea celular LM3 fue desarrollada en el Instituto de Oncología “Angel Roffo”. Derivan del pasaje *in vitro* sucesivo de células obtenidas a partir del adenocarcinoma mamario primario M3, que surgió de manera espontánea en una hembra BALB/c. Las células LM3 se caracterizan por ser negativas para receptor de estrógeno (ER) y receptor de progesterona (PR), y por tener alta expresión del receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico (Her2) [87]. El modelo experimental LM3 ha sido ampliamente utilizado en oncología preclínica por grupos de investigación nacionales e internacionales [88, 89].

En primer término evaluamos la reproducibilidad del crecimiento tumoral y la capacidad metastásica de este modelo experimental luego de la inoculación subcutánea de

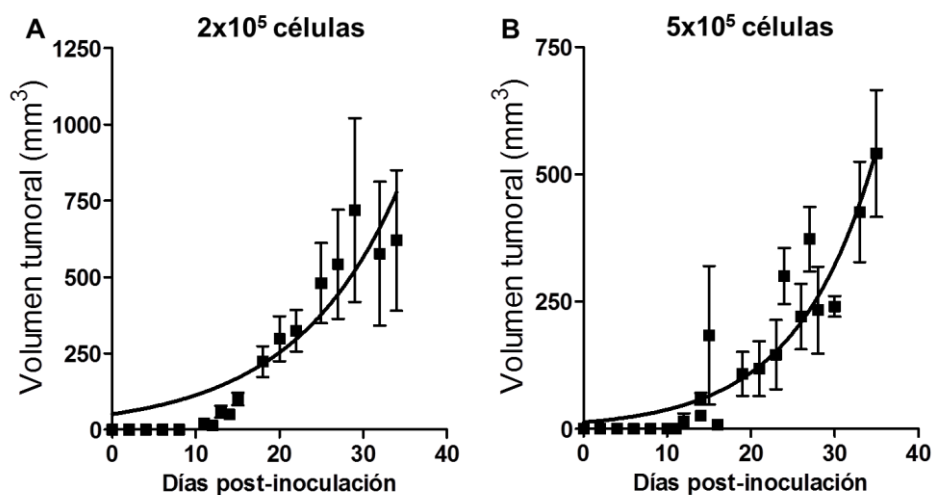


Figura 4. Crecimiento subcutáneo del tumor LM3. Las células LM3 (2×10^5 , A; 5×10^5 , B) fueron inyectadas s.c. en ratones singeneicos BALB/c. El gráfico muestra la curva de regresión y la media \pm SEM del tamaño tumoral a distintos tiempos (n= 6-8 ratones).

distinto número de células. Los tumores LM3 crecieron en todos los ratones inoculados, siendo detectables aproximadamente a partir del día 12 post-inyección, tanto para una dosis de 2×10^5 como de 5×10^5 células (**Figura 4**). Dado que las curvas de crecimiento tumoral observadas luego de la inoculación de ambas dosis de células fueron similares [tiempo de duplicación: dosis alta=6,9d ($IC_{0,05}$: 5,5-9,2) vs dosis baja=8,5d ($IC_{0,05}$: 6,2-13,3)] (**Figura 4**), en todos los experimentos subsiguientes inyectamos 2×10^5 células LM3 para generar el modelo experimental.

La histopatología de los tumores LM3 reveló adenocarcinomas poco diferenciados de fenotipo agresivo, caracterizados por una marcada infiltración de células tumorales en el tejido adyacente al sitio de inoculación (**Figura 5**). También observamos la presencia de regiones necróticas dentro de la masa tumoral. Los tumores presentaron gran número de células con atipia nuclear y abundantes mitosis. Mediante la cuantificación de figuras mitóticas se determinó que el índice mitótico de estos tumores era de $2,09 \pm 0,8$ %.

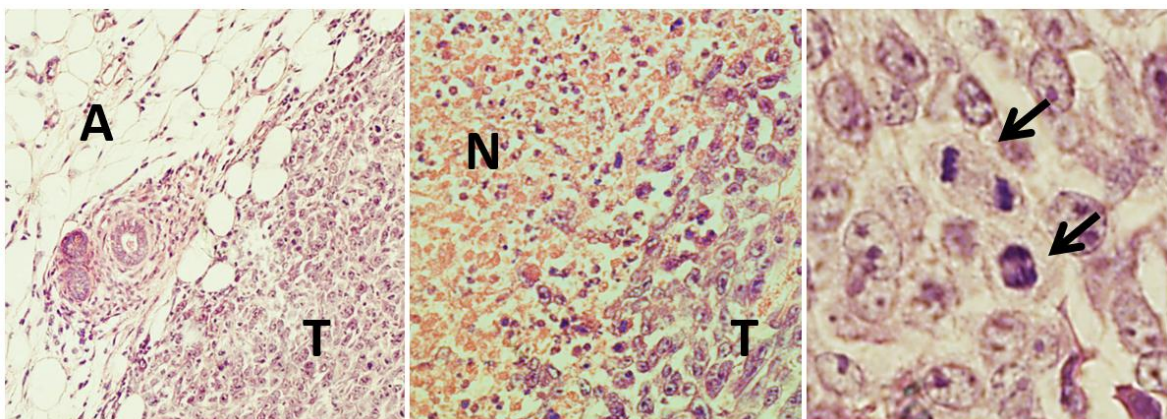


Figura 5. Histopatología de adenocarcinomas mamarios LM3. Cortes de parafina de los tumores LM3 obtenidos 35 días luego de la inoculación del tumor fueron teñidos con hematoxilina y eosina. En las microfotografías puede observarse el tumor (T) infiltrando el tejido adyacente (A). N: necrosis. La flecha señala una figura mitótica.

El desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas fue evaluado 35 días luego de la inoculación s.c. de las células LM3. En ese momento los tumores presentaban un volumen de entre 500 y 700 mm³ y los animales aún no evidenciaban síntomas visibles de distrés. El recuento de las metástasis pulmonares espontáneas superficiales fue realizado bajo lupa de disección luego de la fijación de los pulmones con fijador de Bouin. Todos los ratones desarrollaron metástasis espontáneas (**Figura 6 A**). En la **Figura 6 B** se observan las características histológicas de las metástasis pulmonares, que son similares a las del

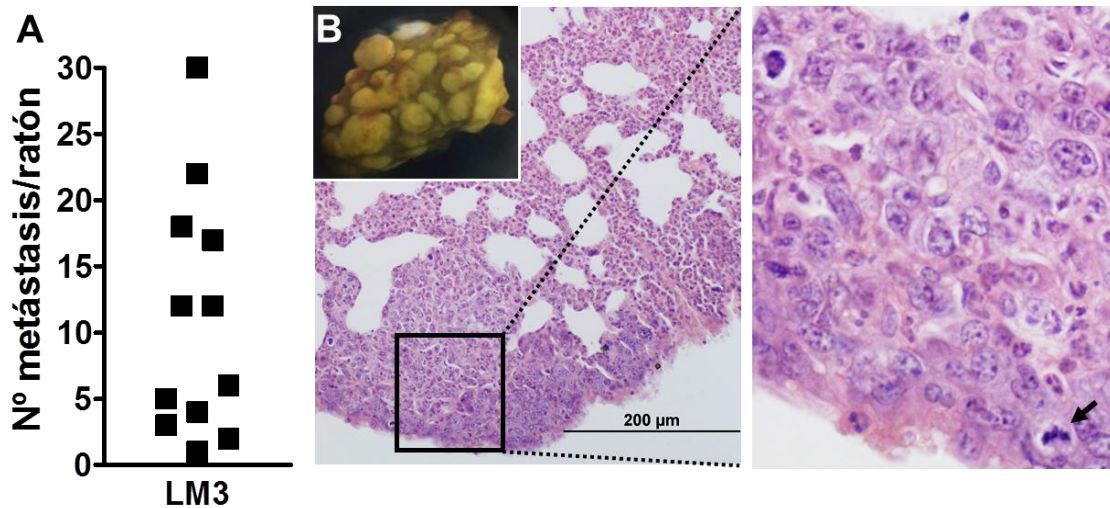


Figura 6. Metástasis pulmonares espontáneas en ratones portadores de tumores LM3. El día 35 luego de la inoculación s.c. de 2×10^5 células LM3 se cuantificaron las metástasis pulmonares. **A**, Número de metástasis pulmonares por ratón. **B**, Histopatología de las metástasis pulmonares (panel izquierdo) y ampliación del cuadrante (panel derecho). Las flechas indican células en mitosis. El inserto muestra una imagen representativa de los pulmones fijados con Bouin.

tumor s.c. primario, con una gran cantidad de figuras mitóticas. En el pulmón se observó engrosamiento de los tabiques interalveolares. Mediante inmunofluorescencia indirecta también detectamos la presencia de células B (CD19+) y T (CD4+) dentro del parénquima pulmonar (**Figura 7**).

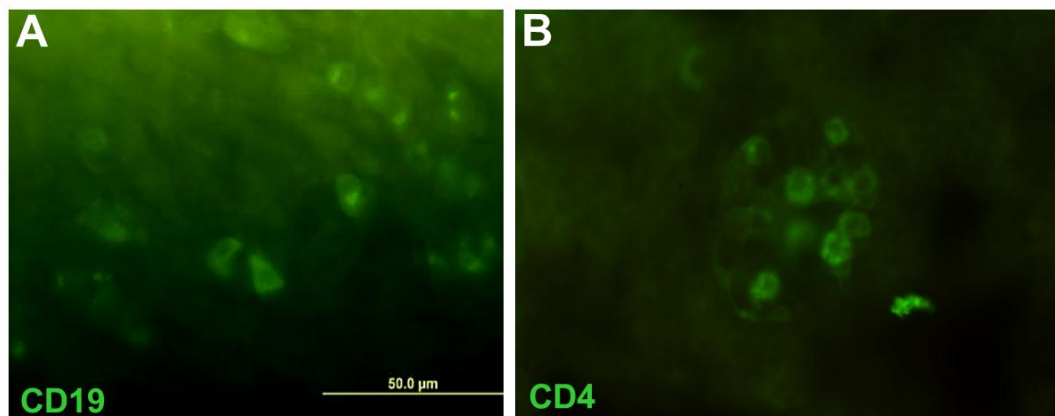


Figura 7. Presencia de células inmunes en pulmones metastásicos. Las células inmunes fueron identificadas por inmunofluorescencia indirecta en cortes de criostato de pulmones de ratones portadores de tumores LM3 usando anticuerpos específicos. Las microfotografías muestran células CD19+ (**A**) y células CD4+ (**B**) en pulmón.

Infiltración Intratumoral de Células Inmunes

A pesar de que el cáncer de mama ha sido tradicionalmente considerado un tumor poco inmunogénico, en los últimos años se ha fortalecido la idea de que estos tumores

también pueden ser tratados con estrategias inmunoterapéuticas [90]. Sin embargo, en las pacientes con cáncer de mama, así como en otros pacientes oncológicos, se ha observado la expansión de células T regulatorias (Tregs) y otras células inmunosupresoras que favorecen el escape inmunológico del tumor [91]. A fin de establecer la pertinencia de nuestro modelo para evaluar la eficacia de modalidades inmunoterapéuticas, y especialmente de aquellas estrategias que apuntan al bloqueo de Tregs, evaluamos la presencia de células inmunes en los tumores primarios mediante inmunofluorescencia. En particular, evaluamos la presencia de células inmunorreactivas para CD45, Foxp3, CD8 y CMH II en el día 35 post-inoculación tumoral (**Figura 8**). Nuestros resultados indican que las células inmunes (CD45⁺) son capaces de acceder al sitio del tumor (**Figura 8 A**).

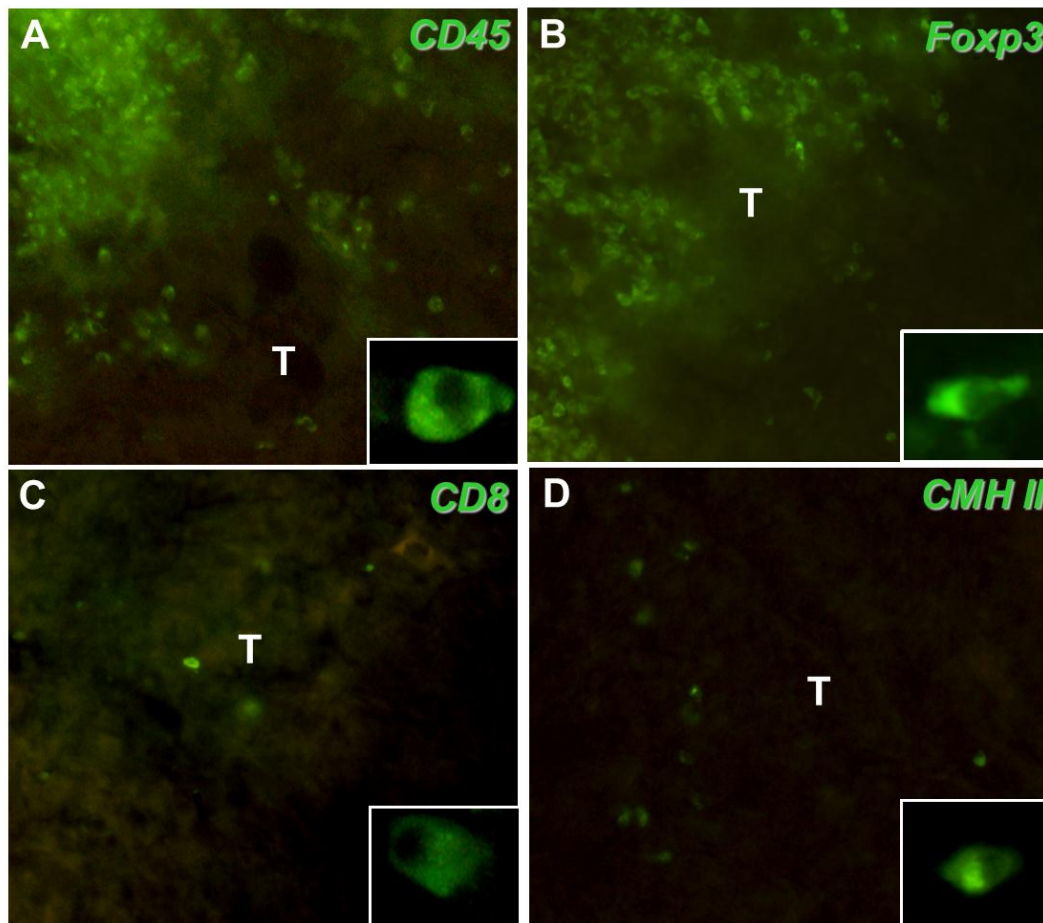


Figura 8. Detección de células inmunes en los adenocarcinomas mamarios LM3. Las células inmunes fueron identificadas por inmunofluorescencia indirecta en cortes de crióstato de tumores LM3 usando anticuerpos específicos contra **A**, CD45, **B**, Foxp3, **C**, CD8 y **D**, CMH II. T: tumor. El inserto en cada panel muestra células inmunorreactivas representativas a mayor aumento.

Cuando se evaluaron los marcadores específicos para las distintas subpoblaciones, se

observó gran cantidad de células Foxp3^+ (**Figura 8 B**), mientras que sólo se observaron esporádicamente células T citotóxicas (CD8^+) y células presentadoras de antígeno (MCHII^+) en el microambiente tumoral o en su periferia (**Figura 8 C-D**). Dado que observamos células Foxp3^+ en el microambiente tumoral, procedimos a cuantificar las células inmunosupresoras intratumorales por citometría de flujo. En el día 35 post-inoculación tumoral detectamos la presencia tanto de células $\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$ como $\text{CD4}^+/\text{Foxp3}^+$ (**Figura 9**). La población de Tregs constituyó entre un 10% y un 35% de las células T CD4^+ presentes en el tumor (**Figura 9**). Es importante notar que también detectamos la presencia de células B (CD19^+) entre las células mononucleares purificadas del parénquima tumoral (**Figura 10**). De acuerdo al análisis por citometría de flujo, hasta un 15% de las células B intratumorales fueron células B regulatorias, definidas como $\text{CD19}^+\text{CD25}^+$ [92]. Estos resultados sugieren que los linfocitos regulatorios, tanto B como T, serían reclutados al microambiente tumoral en este modelo experimental de cáncer de mama.

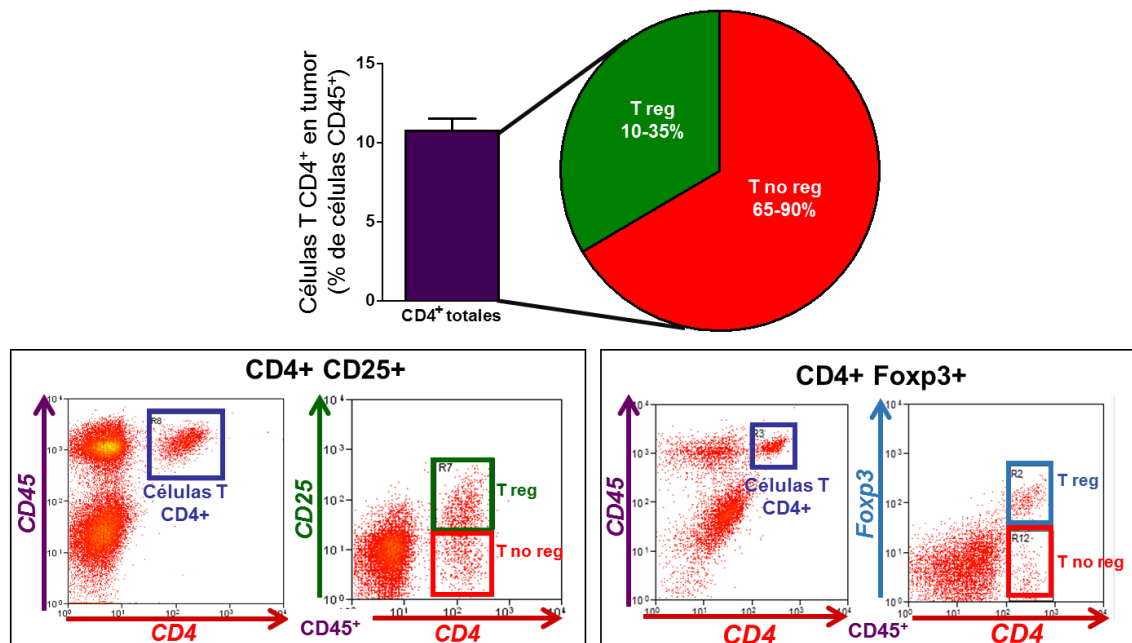


Figura 9. Detección de Tregs intratumorales. Las células mononucleares fueron purificadas de tumores LM3 35 días post-inoculación tumoral. Las células inmunes intratumorales fueron cuantificadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD45, CD4, CD25 y Foxp3. Panel superior: Porcentaje de células CD4^+ intratumorales, $n=4$; Paneles inferiores: Dot plots representativos de Tregs intratumorales identificadas como $\text{CD45}^+/\text{CD4}^+/\text{CD25}^+$ o $\text{CD45}^+/\text{CD4}^+/\text{Foxp3}^+$.

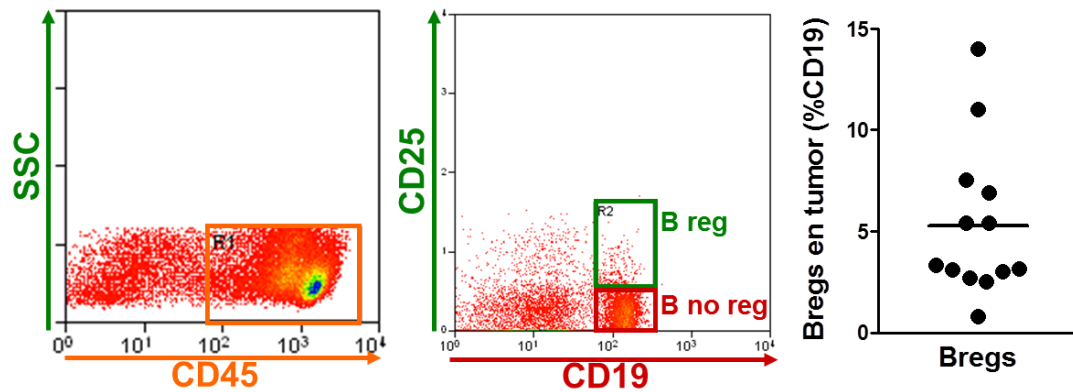


Figura 10. Presencia de Bregs en tumores mamarios LM3. Las células mononucleares fueron purificadas de tumores LM3 35 días post-inoculación tumoral. Las células B regulatorias y no regulatorias fueron cuantificadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD45, CD19 y CD25. A la izquierda se muestran dot plots representativos. A la derecha se observa el porcentaje de Breg, n=13

Si bien los tumores LM3 crecen con alta reproducibilidad *in vivo*, existe una variabilidad individual en la velocidad de crecimiento del tumor. Para definir si esta variabilidad en el crecimiento tumoral podría estar relacionada con la infiltración intratumoral de células inmunes, dividimos a los animales en dos grupos dependiendo del tamaño tumoral al día 35. Elegimos arbitrariamente el valor de 500 mm³ (mediana del tamaño tumoral al día 35) y dividimos a los animales de acuerdo a si el tumor que presentaban tenía un tamaño mayor o menor que ese valor (**Figura 11 A**). Luego purificamos las células inmunes intratumorales para analizarlas por citometría de flujo. Observamos que los tumores grandes presentaron menor cantidad total de células

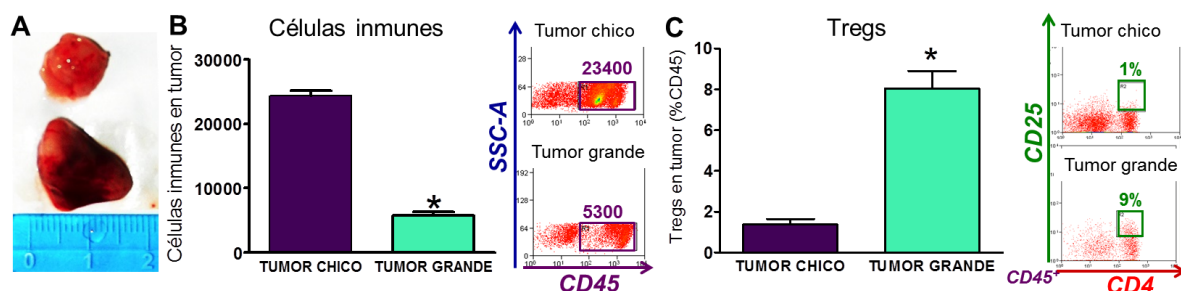


Figura 11. Asociación entre infiltración de Tregs y tamaño tumoral. Las células inmunes intratumorales fueron purificadas de tumores grandes (>500 mm³) y chicos (<500 mm³) 35 días post-inoculación tumoral. Las células inmunes fueron cuantificadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD45, CD4, y CD25. **A**, Las imágenes muestran tumores representativos de cada grupo. **B**, Células inmunes totales (CD45⁺) en tumores grandes y chicos. **C**, Porcentaje de Tregs (CD45⁺/CD4⁺/CD25⁺) en tumores grandes y chicos. *p<0.05 (Test *t* de Student), n=4.

inmunes intratumorales (CD45⁺, **Figura 11 B**) y que la proporción de Tregs en los infiltrados inmunes fue mayor que en los tumores pequeños (**Figura 11 C**). Estos resultados sugieren que en este modelo la presencia de linfocitos reguladores en el tumor podría inhibir el reclutamiento de células inmunes inflamatorias y favorecer la progresión tumoral, como ocurre en los tumores humanos [93]

Expansión de células inmunosupresoras en bazo

A continuación evaluamos si la presencia de un tumor LM3 en crecimiento induce la expansión de Tregs, como ocurre en pacientes oncológicos [94]. Cuantificamos el contenido de células CD4⁺/CD25⁺ en el bazo de ratones normales y de ratones portadores de tumores LM3. Si bien no encontramos diferencias en el porcentaje de células T CD4⁺ totales entre los animales controles y aquellos portadores de tumor (**Figura 12 A**), observamos un aumento significativo en la población de linfocitos CD4⁺/CD25⁺ en el bazo de los ratones portadores de tumor (**Figura 12 B**). Estas observaciones sugieren que la progresión de los tumores LM3 estaría asociada a una expansión de Tregs esplénicas.

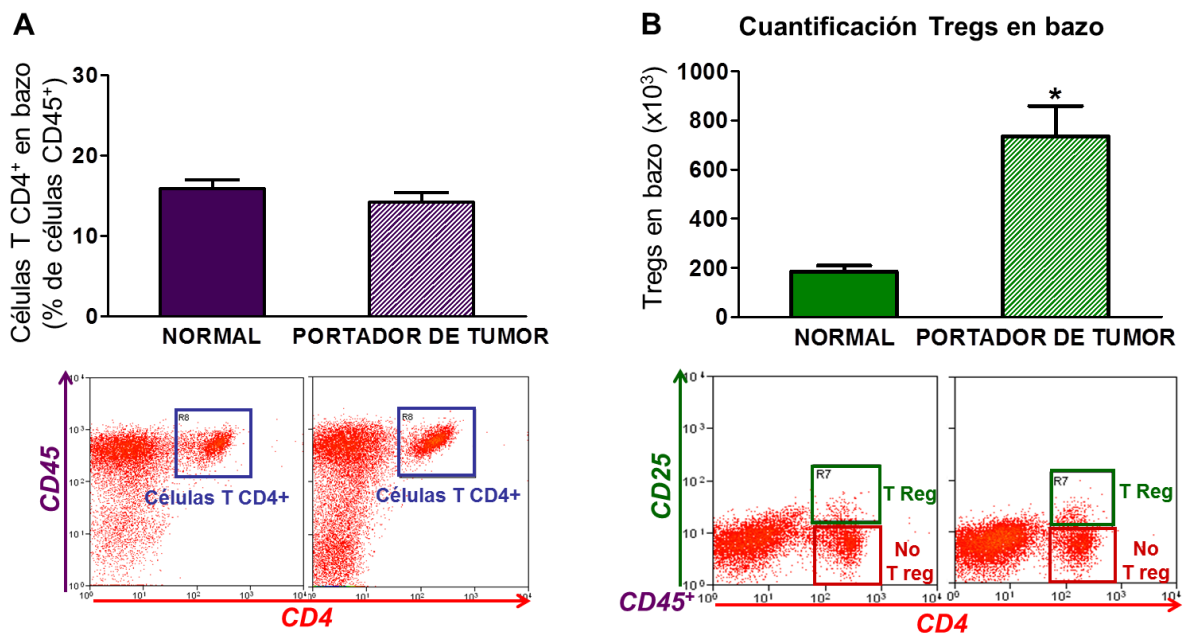


Figura 12. Cuantificación de Tregs en bazo. El bazo fue extraído de ratones normales o portadores de tumor 35 días post-inoculación tumoral. Las células T CD4⁺ totales y regulatorias fueron cuantificadas mediante citometría de flujo. **A**, Panel superior, porcentaje de células T CD4⁺. Panel inferior, dot plot representativo. **B**, Panel superior, número de Tregs esplénicas (CD45⁺/CD4⁺/CD25⁺). Panel inferior, dot plot representativo, *p<0.05 (Test t de Student), n=4.

I.B. Características del modelo experimental 4T1

El modelo de adenocarcinoma mamario 4T1 proviene de una subpoblación celular seleccionada a partir de un tumor de mama originado de manera espontánea en una hembra BALB/c [95]. Los tumores 4T1 son capaces de desarrollar metástasis espontáneas en pulmón e hígado, entre otros órganos. Esta línea celular se encuentra disponible comercialmente (ATCC® CRL-2539™) por lo cual este modelo ha sido muy utilizado en las últimas décadas para ensayos preclínicos en oncología translacional [96]. Este modelo resulta representativo de tumores de mama triples negativos. Además, considerando que ha sido ampliamente reportado que los tumores 4T1 son profusamente infiltrados por Tregs [97], este modelo resulta apropiado para evaluar estrategias que apunten a limitar la función de estas células. Este modelo fue altamente reproducible luego de la inoculación subcutánea de 2×10^5 células (**Figura 13**). Los tumores fueron palpables alrededor del día 9 post inoculación, registrándose un tiempo de duplicación de 6 días.

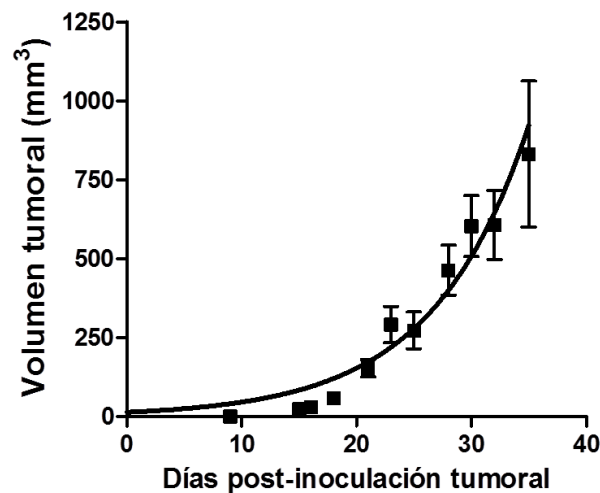


Figura 13. Crecimiento subcutáneo del tumor 4T1. Las células 4T1 (2×10^5) fueron inyectadas s.c. en ratones singéneos BALB/c. El gráfico muestra la curva de regresión y la media \pm SEM del tamaño tumoral a distintos tiempos ($n=12$ ratones).

El desarrollo de metástasis pulmonares espontáneas fue evaluado 35 días luego de la inoculación s.c. del tumor primario. En ese momento, los ratones eran portadores de tumores de aproximadamente 600 a 700 mm^3 y no presentaban síntomas visibles de distrés. Todos los animales inoculados con tumor primario desarrollaron metástasis pulmonares. Fueron detectadas entre 20 y 80 metástasis pulmonares en cada ratón (**Figura 14 A**). En la **Figura 14 B** puede observarse la histología de un pulmón con una gran

metástasis que contiene abundantes figuras de mitosis, además de engrosamiento de los tabiques interalveolares.

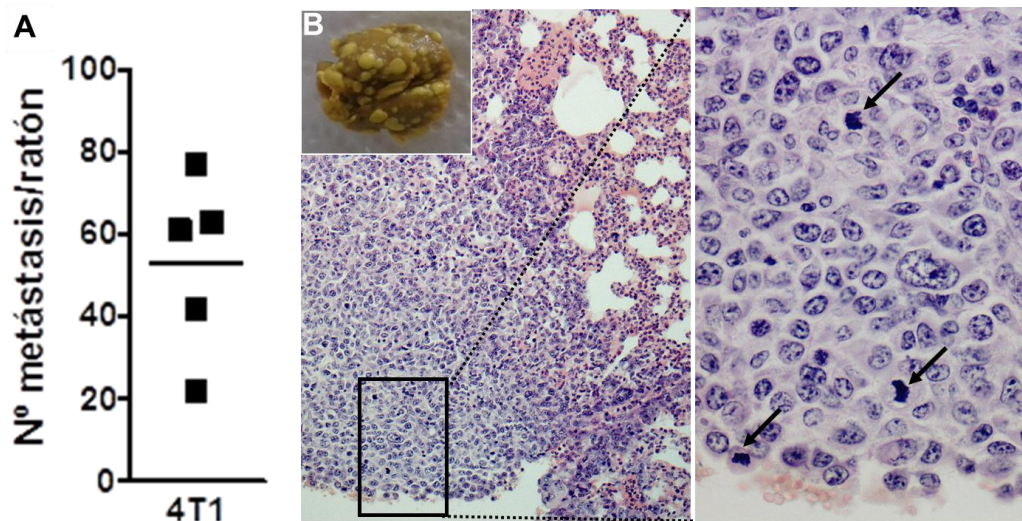


Figura 14. Metástasis pulmonares espontáneas en ratones portadores de tumores 4T1. Las metástasis pulmonares fueron cuantificadas el día 35 luego de la inoculación s.c. de células 4T1. **A**, Número de metástasis pulmonares/ratón. **B**, Histología de las metástasis pulmonares (panel izquierdo) y amplificación del cuadrante (panel derecho). Las flechas indican células mitóticas. El inserto muestra una imagen representativa de los pulmones fijados con Bouin.

En los cortes histológicos del tumor 4T1 pudimos observar que las células tumorales son capaces de infiltrar el tejido no neoplásico adyacente (**Figura 15 A**). Además se observan áreas de necrosis (**Figura 15 B**), como así también gran cantidad de figuras mitóticas aberrantes (**Figura 15 C**). Mediante la cuantificación de figuras mitóticas se determinó que el índice mitótico de estos tumores fue de $3,30\% \pm 1,08$.

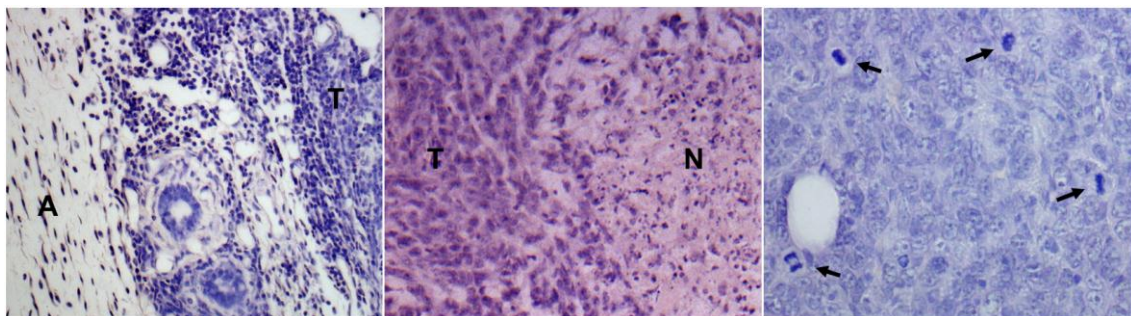


Figura 15. Histología de los adenocarcinomas mamarios 4T1. Cortes de parafina de los tumores 4T1 obtenidos 35 días luego de la inoculación del tumor fueron teñidos con hematoxilina y eosina. En las microfotografías puede observarse el tumor (T) infiltrando el tejido no neoplásico adyacente (A). Se observan áreas de necrosis (N) y abundantes figuras mitóticas (flechas).

Cuando evaluamos la presencia de células inmunes en los tumores 4T1 al día 35 post-inoculación tumoral, observamos abundantes células CD45⁺ en el microambiente tumoral (**Figura 16 A**). Mediante el uso de marcadores específicos para las distintas subpoblaciones observamos gran cantidad de células T CD8⁺ (**Figura 16 B**), mientras que las células presentadoras de antígeno (MCHII⁺) fueron muy escasas tanto en el microambiente tumoral como en su periferia (**Figura 16 C**). El análisis por citometría de flujo de las células mononucleares purificadas de estos tumores mostró que estos tumores se encuentran infiltrados por Tregs, que constituyen un 20-30% del total de células CD4⁺ intratumorales (**Figura 16 D**).

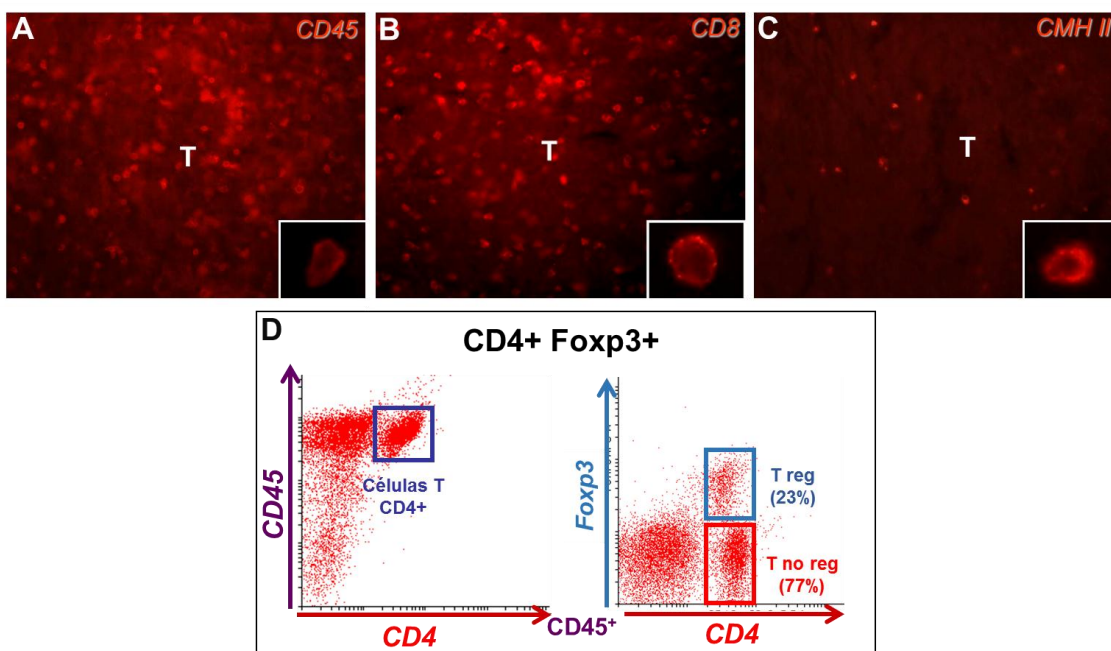


Figura 16. Detección de células inmunes en carcinomas mamarios 4T1. Las células inmunes fueron identificadas por inmunofluorescencia indirecta en cortes de crióstato de tumores 4T1 usando anticuerpos específicos contra **A**, CD45, **B**, CD8 y **C**, CMH II. T: tumor. El inserto en cada panel muestra células inmunorreactivas representativas a mayor aumento. **D**, Las células inmunes intratumorales fueron purificadas y analizadas mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti CD45, CD4, y Foxp3. Las Tregs fueron identificadas como CD45⁺/CD4⁺/Foxp3⁺.

Nuestras observaciones indican que ambos modelos experimentales, LM3 y 4T1, son apropiados para evaluar estrategias terapéuticas que apunten a reducir la acción de Tregs y estimular una respuesta inmune antitumoral.

CAPITULO II

Optimización de vacunas de células dendríticas

RESULTADOS

Capítulo II: Optimización de vacunas de células dendríticas

Las estrategias de vacunación con CDs requieren obtener un número suficiente de CDs maduras con capacidad de brindar las cuatro señales críticas: interacción del receptor de la célula T CD8⁺ o CD4⁺ con el péptido presentado en las moléculas del CMH de tipo I o II, regulación de las moléculas co-estimuladoras, diferenciación hacia un perfil de respuesta inmune y regulación del tráfico de las células T efectoras [98]. En esta etapa evaluamos distintos protocolos de producción y maduración de CDs.

II.A. Evaluación de combinaciones de citoquinas para la generación de CDs a partir células progenitoras de MO

Varios estudios demuestran que GM-CSF induce la expansión CDs *in vivo* e *in vitro* y pueden enriquecerse aún más con la adición de IL-4 [99, 100]. Otra metodología para generar CDs a partir de cultivos de MO ha sido el uso de Flt3L+IL-6, que genera CDs con características fenotípicas más diversas [101]. En una primera instancia, evaluamos la eficiencia de estas dos combinaciones de citoquinas para generar CDs a partir de MO de ratón (**Figura 17 A**). Las preparaciones de CDs obtenidas a partir de la incubación por 10-14 días con 50 ng/ml de IL-6 y 100 ng/ml de Flt3-L tuvieron un rendimiento de $0,30 \times 10^6 \pm 0,07$ células por ratón y una pureza de tan sólo 30% de células CD11c⁺. El rendimiento y la

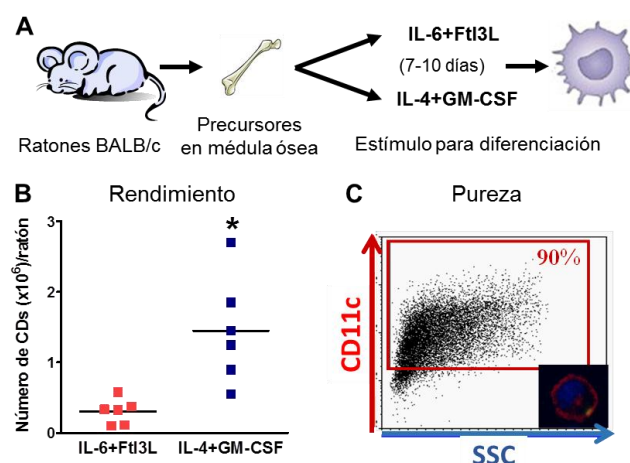


Figura 17. Rendimiento y pureza de cultivos de CDs. A, Precursores de MO de ratones BALB/c fueron incubados con 10 ng/ml de IL4 y 10 ng/ml de GMCSF o con 10 ng/ml de IL-6 y 50 ng/ml Flt3L por 7 a 13 días. B, Número de CDs obtenidas de MO de cada ratón. *p<0.05 (Test t de Student). C, El dot plot muestra la pureza de un cultivo representativo realizado con GM-CSF e IL-4. El inserto muestra una CD con inmunomarcación de CD11c.

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

pureza de estos cultivos fue independiente del tiempo de incubación con IL-6+Flt3L. Sin embargo, las preparaciones de CDs obtenidas a partir del tratamiento con GM-CSF+IL-4 exhibieron un mejor rendimiento y pureza. Los cultivos procesados al día 7 mostraron un rendimiento de $1,40 \times 10^6 \pm 0,31$ células y presentaron un 70-90% de células CD11c⁺ (**Figura 17 C**). En vista de estos resultados, la combinación de GM-CSF+IL-4 fue utilizada para generar las CDs en protocolos de vacunación.

II.B. Evaluación de agonistas de TLR como adyuvantes de vacunas antitumorales en modelos murinos de carcinoma mamario metastático

Los agonistas de receptores tipo toll (TLR) han sido ampliamente utilizados como inmunomoduladores y adyuvantes de vacunas de péptidos y de CDs [102]. La combinación de agonistas de TLR es una estrategia que puede mejorar la inmunidad antitumoral, habiendo sido propuesto que la estimulación simultánea de múltiples TLRs es necesaria para lograr una respuesta inmune efectiva [78, 79]. Dado que los agonistas de TLR9 y TLR7/8 son agentes inmunoestimuladores no tóxicos en pacientes humanos [103, 104], nuestro objetivo fue evaluar si la adición del agonista de TLR7, R848 mejora el efecto proinflamatorio del ligando de TLR9, CpG1826, en preparaciones de CDs.

Una de las características principales de las CDs es su habilidad para activar a los linfocitos T [105]. Con el fin de evaluar el efecto de los agonistas de TLR sobre la capacidad de las CDs para facilitar la proliferación de células T, realizamos una reacción de leucocitos mezclados (MLR) (**Figura 18 A**). En los cocultivos de CDs estimuladas por 2 hs. con CpG1826 se observó un aumento en la proliferación de esplenocitos alogeneicos con respecto al control (**Figura 18 B**). Aunque este efecto no se observó cuando las CDs fueron incubadas con R848 sólo, las CDs activadas con R848 en combinación con CpG también fueron capaces de inducir la proliferación de leucocitos alogeneicos (**Figura 18 B**). Cuando evaluamos estos efectos luego de 24 hs. de estimulación de las CDs, observamos que estos efectos se atenúan, y CpG solo o en combinación con R848 sólo inducen un leve aumento no significativo con respecto al control (**Figura 18 C**). Luego de 48 hs de incubación con agonistas de TLR, no observamos cambios entre los grupos. (**Figura 18 D**).

En experimentos *in vivo*, evaluamos la eficacia profiláctica de vacunas de CDs estimuladas con los agonistas de TLR. Utilizamos un esquema de vacunación profiláctica

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

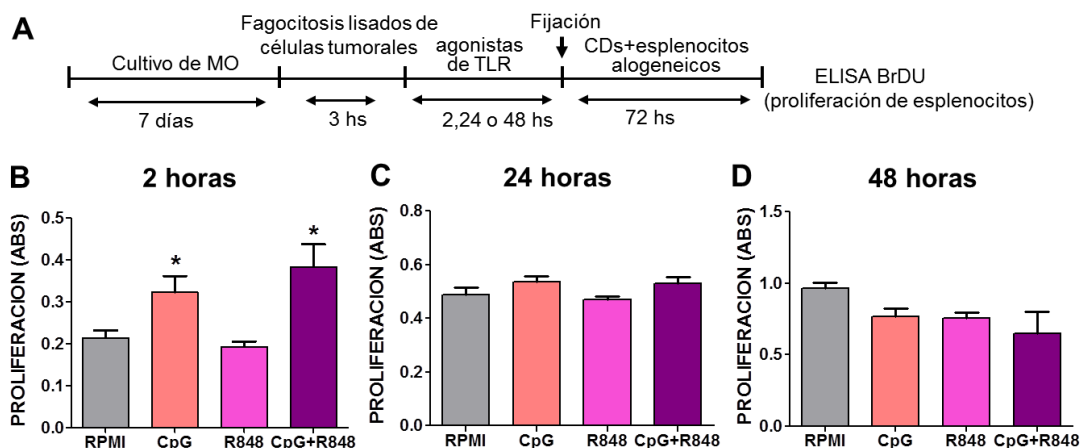


Figura 18. Reacción de leucocitos mezclados allogeneica. A, Precursores de MO de ratones BALB/c fueron cultivados en presencia de IL-4+GM-CSF durante 7 días. Las CDs obtenidas fueron incubadas con lisados tumorales para luego ser estimuladas con los agonistas de TLR9 (CpG₁₈₂₆, 10 µg/ml) y/o TLR7/8 (R848, 10 µg/ml) durante 2 (B), 24 (C) o 48 hs. (D). Luego, las CDs fueron fijadas y finalmente fueron incubadas con esplenocitos allogeneicos de ratones C57/Bl6 durante 72 hs. La incorporación de BrDU por las células en proliferación fue determinada por ELISA. *p<0.05 vs RPMI (ANOVA, seguido por test Tukey).

para evaluar con claridad la eficacia antitumoral y anti-metastática de las vacunas antitumorales de CDs. Los animales recibieron dos inyecciones de vacunas de CDs en el día 14 y 1 antes de la implantación del tumor (Figura 19). Es importante mencionar que las CDs fueron previamente incubadas durante 3 hs. con lisados celulares de modo de lograr inmunidad antitumoral específica. Al momento de la inyección se adicionaron los agonistas de TLR a las preparaciones de CDs.

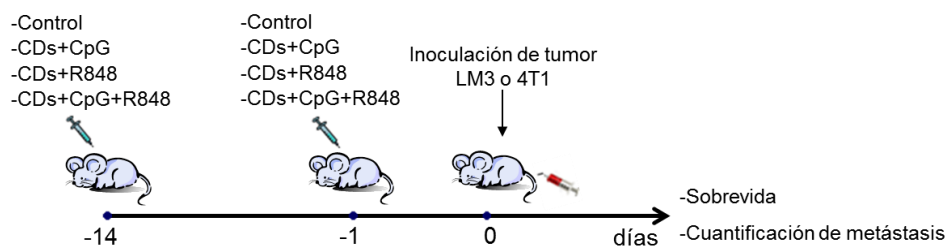


Figura 19. Esquema de vacunación profiláctica. Ratones BALB/c recibieron dos inyecciones s.c. (1 y 14 días antes de la inoculación tumoral) de vacunas antitumorales. CDs obtenidas de cultivos de MO fueron cargadas con lisados de células tumorales durante 3 hs. Al momento de la inyección se adicionaron los agonistas de TLR a las preparaciones de CDs CpG₁₈₂₆, 10 µg/ml, R848, 10µg/ml o la combinación de ambos. En el día 0, los ratones fueron inoculados (s.c.) con 200.000 células singeneicas de carcinoma mamario LM3 o 4T1.

En el modelo de carcinoma mamario murino LM3, si bien no hubo diferencias en la sobrevida de los animales tratados con vacunas R848-CDs con respecto al control, el 50% de los animales tratados con vacunas de CDs activadas con CpG mostraron sobrevida a largo plazo (Figura 20 A). Sin embargo, en el caso de los animales tratados con vacunas de CDs activadas con CpG+R848, sólo el 25% de los animales sobrevivió a largo plazo. Nótese, que la adición de R848 redujo la eficacia de las vacunas activadas con CpG (Figura 20 A). Con el objetivo de evaluar la capacidad de las distintas preparaciones de CDs para inducir memoria inmunológica, los ratones sobrevivientes fueron reinoculados con tumores en el flanco contralateral 4 meses luego de la inoculación del primer tumor, sin recibir ningún tratamiento adicional. Ratones *naive* fueron inoculados

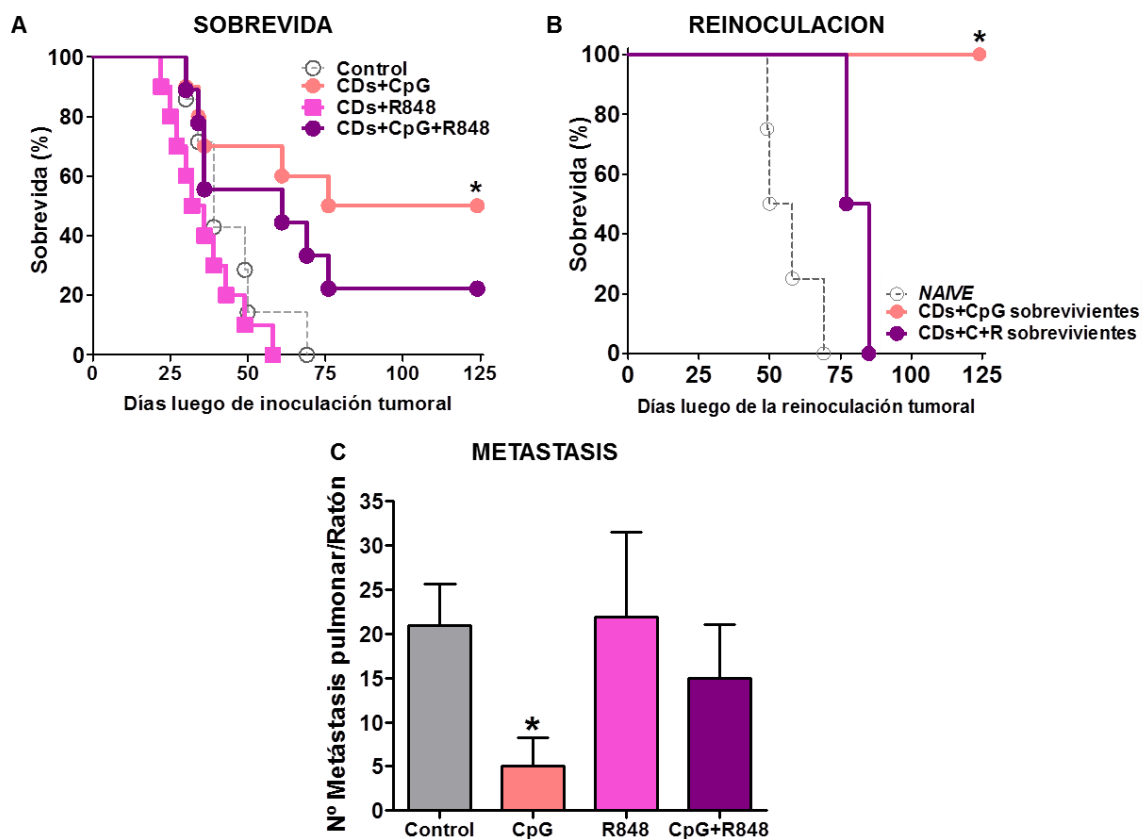


Figura 20. Eficacia de vacunas de CDs activadas con agonistas de TLR en el modelo murino de cáncer de mama LM3. A, Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de ratones portadores de tumores LM3 tratados con vacunas de CDs activadas con los agonistas de TLR. * $p < 0.05$ vs control (Long-rank test, $n = 7-10$). B, Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de ratones reinoculados con tumores LM3 que no recibieron tratamiento adicional. * $p < 0.05$ vs *naive* (Long-rank test). C, Las metástasis pulmonares fueron cuantificadas bajo lupa. * $p < 0.05$ vs control (Kruskal Wallis seguido de Dunn's test).

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

con tumor como control de crecimiento tumoral. Todos aquellos animales que recibieron inicialmente vacunas activadas con CpG no desarrollaron tumores, sin embargo los ratones que recibieron vacunas de CpG-R848 sucumbieron a la progresión tumoral post-reinoculación tumoral (**Figura 20 B**). Cuando estudiamos la presencia de metástasis en los pulmones de los animales tratados observamos que sólo las vacunas estimuladas con CpG disminuyeron el desarrollo de metástasis pulmonares (**Figura 20 C**). Es importante notar que la adición de R848 a las CDs estimuladas con CpG bloqueó el efecto antimetastásico de la vacuna (**Figura 20 C**).

Con el objetivo de evaluar estas vacunas en un segundo modelo preclínico de cáncer de mama, administramos las vacunas profilácticas en ratones que luego fueron inoculados con tumores 4T1. En este modelo, si bien no observamos sobrevida a largo plazo, las vacunas de CDs activadas con CpG promovieron un aumento significativo en la sobrevida mediana en comparación con los ratones control (**Figura 21 A**), efecto que fue suprimido cuando se adicionó R848 a las CDs activadas con CpG (**Figura 21 A**). No observamos ningún efecto anti-metastático (**Figura 21 B**),

Nuestros resultados indican que la utilización profiláctica de vacunas de CDs activadas con el agonista de TLR9, CpG1826, resulta beneficiosa en modelos murinos de cáncer de mama. La utilización del agonista de TLR7, R848, no muestra ningún beneficio terapéutico. De hecho, R848 inhibe el efecto antitumoral de las vacunas estimuladas con CpG, por lo que la combinación de ambos agonistas no sería apropiada para inducir inmunidad antitumoral.

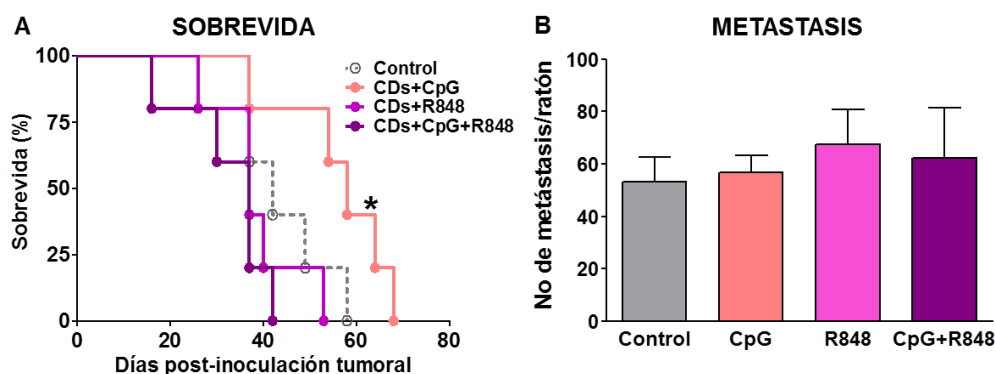


Figura 21. Eficacia de las vacunas de CDs luego de la activación dual de TLR en el modelo murino de cáncer de mama 4T1. **A**, Curvas de sobrevida Kaplan-Meier de ratones portadores de tumores 4T1 tratados con vacunas de CDs activadas con los agonistas de TLR. * $p < 0.05$ vs control (Long-rank test, $n=5$). **B**, Las metástasis pulmonares fueron cuantificadas bajo lupa.

II.C. Evaluación de la maduración de CDs inducida por agonistas de TLR *in vitro*

En vista de nuestros resultados *in vivo*, evaluamos *in vitro* si la adición de R848 afecta la activación de CDs inducida por CpG. Para ello, incubamos las CDs en presencia de los agonistas de TLR y estudiamos sus características fenotípicas. Primero evaluamos la viabilidad de las CDs 2, 24 y 48 hs. post-estimulación con los agonistas de TLR (**Figura 22**). Si bien al finalizar el cultivo, la mortalidad es menor al 5%, luego de 2 hs de estimulación la mortalidad fue del 20%, sin observarse diferencias entre los grupos. En todos los grupos tratados encontramos un aumento en la mortalidad celular a las 24 y 48 hs con respecto a su control correspondiente a 2 hs. También observamos que a las 48 horas de incubación de las CDs, la combinación de ambos agonistas aumenta la mortalidad celular con respecto a las CDs incubadas con CpG o R848 individualmente (**Figura 22**).

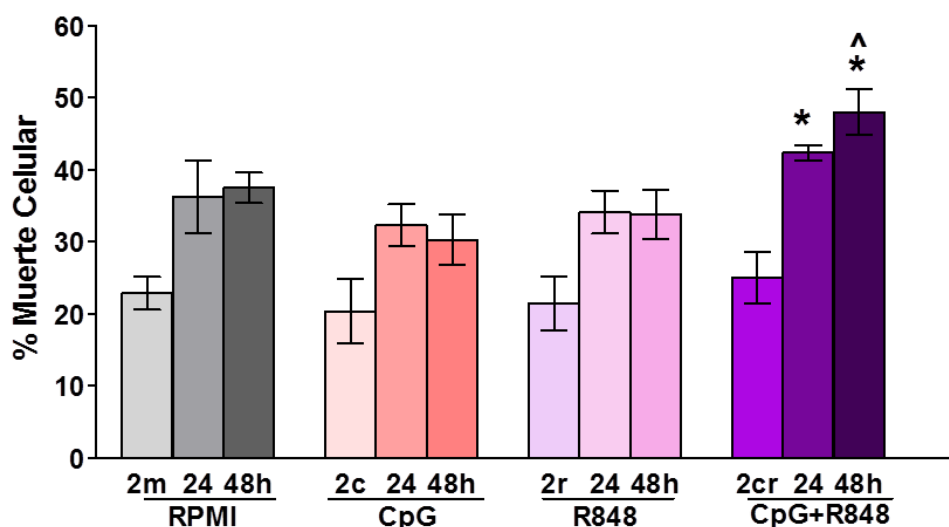


Figura 22. Mortalidad *in vitro* de CDs activadas con agonistas de TLR. La mortalidad celular fue evaluada luego de 2, 24 y 48 hs. mediante exclusión de azul de Tripan. * $p < 0.05$ vs 2 hs., ^ $p < 0.05$ vs respectivo CpG (ANOVA seguido del test de Tukey), $n=4$.

Teniendo en cuenta que durante la maduración las CDs aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras que son necesarias para una activación eficiente de células T [106], evaluamos los niveles de expresión de CD86 y del CMH II en CDs viables en respuesta a la estimulación de los TLR (**Figura 23**). Luego de 24 hs. de estimulación no observamos diferencias en el número de CDs inmunorreactivas para CD86 entre el grupo

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

de control y los grupos experimentales (Figura 23 A, panel izquierdo). Sin embargo, a las 48 hs. encontramos un aumento en la expresión de CD86 en las CDs tratadas con CpG ó R848 versus el grupo control. No obstante, la combinación de CpG+R-848 mostró una disminución de la expresión de CD86. (Figura 23 B, panel derecho).

Cuando evaluamos la expresión de CMH II, observamos que la estimulación con

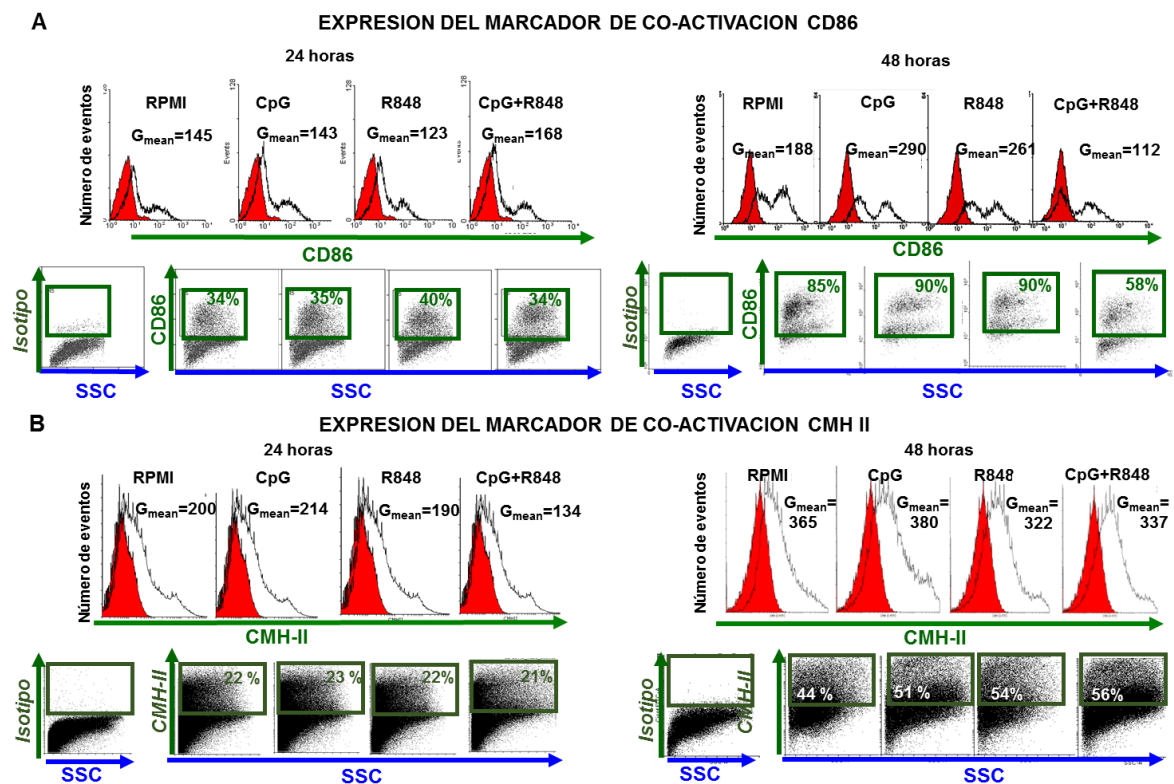


Figura 23. Expresión de marcadores de co-activación en CDs activadas con agonistas de TLR. La expresión de CD86 (A) y CMH II (B) en CDs viables fue evaluada mediante FACS luego de la estimulación con agonistas de TLR durante 24 ó 48 hs. Se muestran histogramas (paneles superiores) y dot plots (paneles inferiores) representativos de cada condición. En los histogramas el isotipo correspondiente se muestra en rojo.

los diferentes agonistas de TLR o la combinación de los mismos, durante 24 hs o 48 no indujo cambios respecto el porcentaje de células CMH II⁺ (Figura 23 B). Sin embargo, cuando evaluamos la intensidad media de fluorescencia (Gmean) observamos un aumento en CpG a las 48 hs. con respecto al control, y el tratamiento dual disminuye su expresión respecto al control y a CpG (Figura 23 B, panel derecho).

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

A continuación investigamos el patrón de producción de citoquinas en las CDs activadas con CpG, R848 o la combinación de ambos durante 24 hs, de modo de permitir la acumulación de citoquinas en el sobrenadante de las CDs, mediante la técnica de ELISA (**Figura 24**). Se evaluó la producción de IFN- γ e IL-12p70, ya que son citoquinas proinflamatorias implicadas en la respuesta Th1 y en la activación de linfocitos citotóxicos [107, 108]. También medimos la síntesis de TNF- α debido a que esta citoquina ha sido involucrada en la maduración de las CDs [109] y evaluamos la producción de IL-10, una citoquina con funciones inmunosupresoras que ha sido implicada en el escape inmunológico tumoral [110, 111]. Observamos que la estimulación de CDs con CpG aumentó significativamente la secreción de IFN- γ , IL-12p70 e IL-10, pero R848 solo fue capaz de incrementar la producción de IL-10 (**Figura 24**). Cuando utilizamos ambos agonistas en combinación, encontramos una inhibición en la secreción de IFN- γ e IL-12p70 inducida por CpG, sin detectar cambios en los niveles de IL-10 (**Figura 24**). Notoriamente, el R848 fue el único capaz de estimular la secreción de TNF- α . En este caso, la activación dual con los agonistas de TLR no afectó significativamente la secreción de esta citoquina inducida por R848 sólo (**Figura 24**).

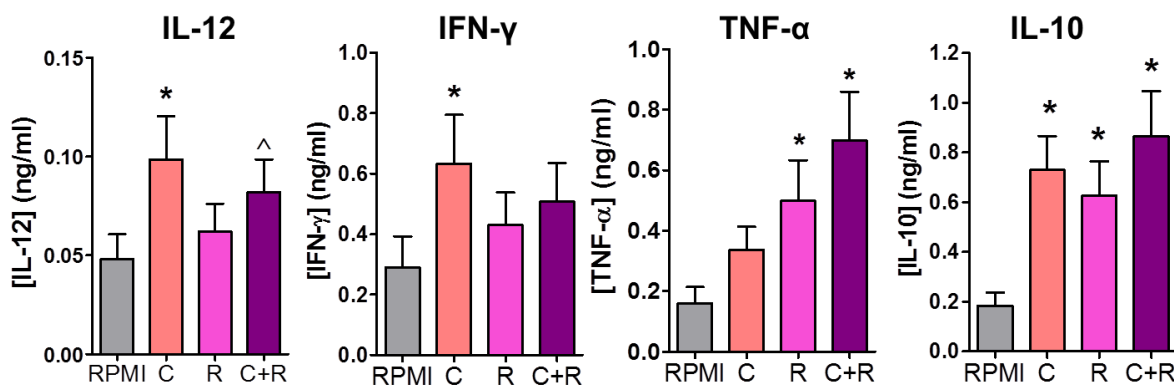


Figura 24. Secreción de citoquinas por CDs activadas con agonistas de TLR. Las CDs fueron estimuladas con CpG₁₈₂₆ (C), R848 (R), o la combinación de ambos (C+R) durante 24 hs. La concentración de IL-12, IFN- γ , TNF- α e IL-10 fue determinada en el sobrenadante de cultivo mediante la técnica de ELISA. * $p < 0.05$ vs RPMI, $n = 11-20$.

Una característica del proceso de maduración es la disminución de la capacidad fagocítica, lo cual restringiría la capacidad de las CDs maduras para capturar y presentar antígenos encontrados después del estímulo inicial [112]. Para continuar con la evaluación del estado de maduración de las CDs activadas, determinamos su capacidad fagocítica utilizando microesferas fluorescentes, que pueden ser luego visualizadas dentro del

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

citoplasma cuando las CDs son marcadas con faloidina, bajo microscopia de fluorescencia. Las CDs fueron estimuladas a diferentes tiempos con los agonistas de TLR y, luego de la remoción de los mismos del medio de cultivo, fueron incubadas con las microesferas. Se observó una reducción en el porcentaje de CDs fagocíticas a partir de las 2 hs de incubación con CpG, que fue revertida cuando añadimos simultáneamente R848 (**Figura 25 A-B**). Si bien la incubación con R848 *per se* no modificó el porcentaje de CDs fagocíticas a tiempos más cortos (**Figura 25 A-B**), sí inhibió la fagocitosis luego de 48 hs. de incubación (**Figura 25 C**). En la **Figura 25 D** se muestran fotos representativas.

Nuestros resultados *in vitro* sugieren que, mientras que R848 no tiene un efecto robusto sobre la maduración de las CDs, el agonista de TLR9, CpG1826, es un estimulante apropiado para la correcta maduración de las CDs. Sin embargo, la activación

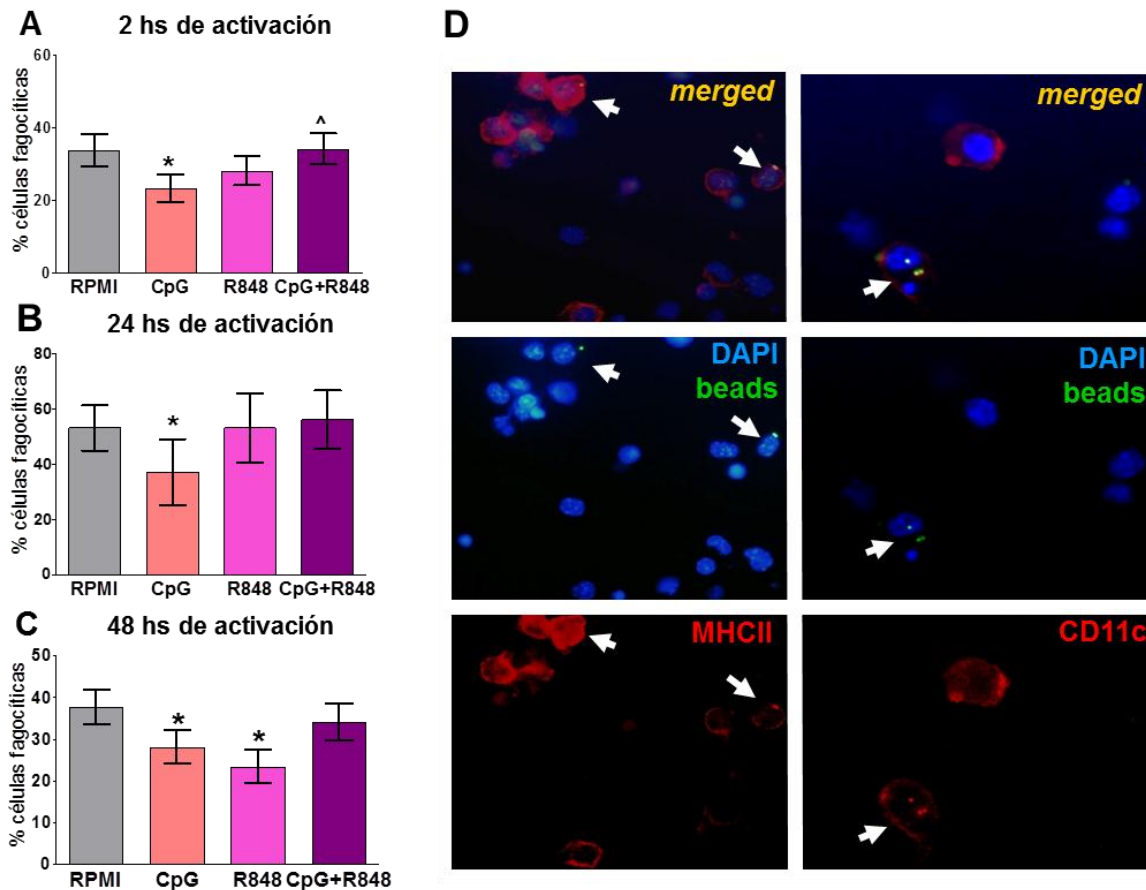


Figura 25. Capacidad fagocítica de las CDs luego de la activación con agonistas de TLR. Las barras representan la media \pm $IC_{a=0.05}$ del porcentaje de CDs conteniendo microesferas fluorescentes en su citoplasma luego de 2 (A), 24 (B) o 48 horas (C) de estimulación con CpG, R848 o la combinación de ambos. * $p < 0.05$ vs RPMI; [^] $p < 0.05$ vs CpG (χ^2). D, Microfotografías representativas de células inmunomarcadas con anticuerpos anti-MHCII o anti-CD11c (rojo). Las flechas indican células conteniendo microesferas fluorescentes (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

concomitante de TLR9 y TLR7 tiene un efecto negativo sobre el proceso de maduración de las CDs y acelera los procesos de muerte celular en estas células. En vista de estas observaciones procedimos a la evaluación de diferentes vías activadas durante la estimulación de TLR con la finalidad de dilucidar potenciales mecanismos por los cuales R848 es capaz de inhibir la maduración de CDs inducida por CpG.

Papel de las óxido nítrico sintasas (NOS) en la activación de las CDs inducida por agonistas de TLR

El óxido nítrico parece ser un mediador importante en la activación de las CDs. Sin embargo, han sido reportado que este mediador ejerce tanto efectos pro-inflamatorios como tolerogénicos en las CDs [113-115]. A continuación, evaluamos si la producción de óxido nítrico está involucrada en el efecto inhibitorio de R848 sobre la activación de CDs inducida por CpG. Para ello, incubamos las CDs con los agonistas de TLR en presencia de un inhibidor de las óxido nítrico sintasas (NOS), el L-NAME, durante 24 horas y evaluamos indicadores de maduración (**Figura 26**). El bloqueo de NOS incrementó la producción de IL-12 inducida por CpG (**Figura 26 A**) y redujo la liberación de IL-10

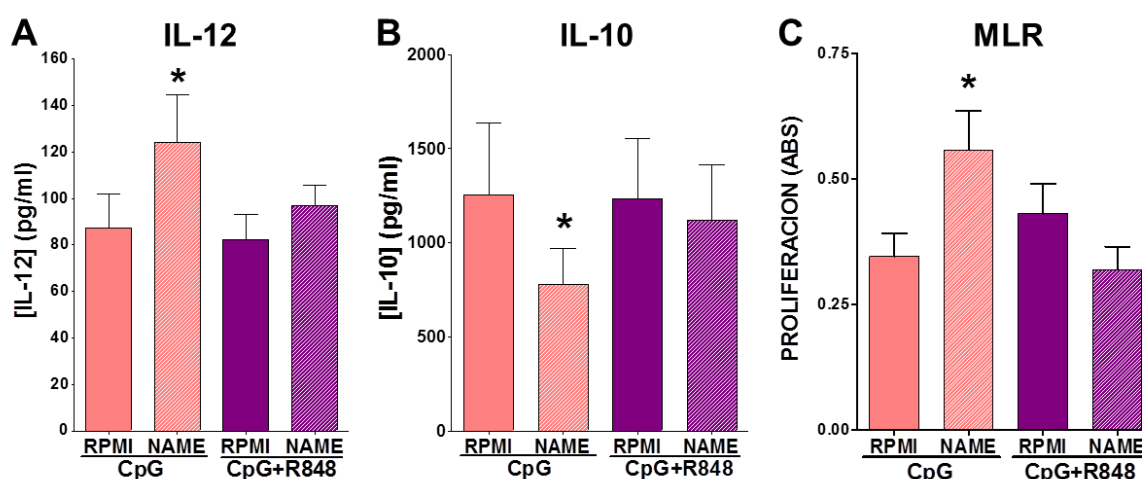


Figura 26. Efecto del bloqueo de la NOS sobre la activación de CDs inducida por agonistas de TLR. **A-B**, Las CDs fueron incubadas con CpG sólo o en combinación con R848 durante 24 hs. en presencia de un inhibidor de las óxido nítrico sintasas, L-NAME (0.5 mM). La concentración de IL-12 (**A**) e IL-10 (**B**) en el sobrenadante de las CDs fue determinada por ELISA. **C**, Las CDs fueron incubadas con lisados tumorales de células 4T1 durante 3 hs. para luego ser estimuladas con CpG sólo o combinado con R848 durante 2 hs en presencia del inhibidor L-NAME. Luego, las CDs fueron fijadas e incubadas con esplenocitos alogeneicos durante 72 hs. La incorporación de BrDU fue determinada por ELISA. * $p < 0.05$ vs RPMI (Test t de Student apareada), $n = 12-18$.

(Figura 26 B). Sin embargo, el bloqueo de NOS no modificó la síntesis de IL-12 o IL-10 en CDs tratadas con CpG+R848. Consecuentemente, el bloqueo de NOS aumentó la habilidad de las CDs estimuladas con CpG para sostener la proliferación de leucocitos en el MLR alógeno, pero no afectó a las CDs estimuladas con CpG+R848 (Figura 26 C). Nuestros resultados sugieren que si bien la actividad de NOS inducida por estimulación de TLR9 tiene un efecto inhibitorio sobre la activación de CDs, esta enzima no está involucrada en el efecto inhibitorio de R848 sobre la maduración de CDs inducida por CpG.

Papel de la indolamida 2,3 dioxigenasa (IDO) en la activación de las CDs inducida por agonistas de TLR

A continuación exploramos el papel de IDO en la maduración de nuestras preparaciones de CDs. La enzima IDO es la responsable de catabolizar al triptófano y ha sido involucrada en respuestas inmunes supresoras [116]. Ha sido demostrado que las CDs que expresan IDO tienen capacidad para suprimir la proliferación de linfocitos T y

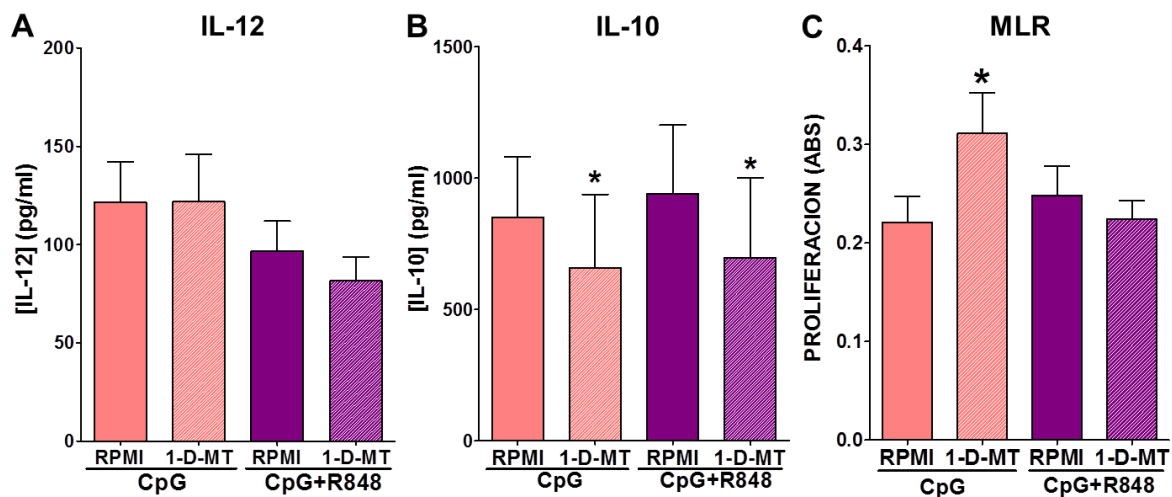


Figura 27. Efecto del bloqueo de la IDO sobre la activación de CDs inducida por agonistas de TLR. A-B, Las CDs fueron incubadas con CpG solo o en combinación con R848 durante 24 hs. en presencia de un inhibidor de la enzima IDO, 1-D-MT (0.5 mM). La concentración de IL-12 (A) e IL-10 (B) en el sobrenadante de cultivo fue determinada por ELISA. C, Las CDs fueron incubadas con lisados tumorales durante 3 hs. y luego estimuladas con CpG sólo o en combinación con R848 durante 2 hs. en presencia del inhibidor 1-D-MT. Luego, las CDs fueron fijadas e incubadas con leucocitos alógenos durante 72 hs. La incorporación de BrDU fue detectada por ELISA. *p<0.05 vs RPMI (Test t de Student apareada), n=6-18.

están involucradas en el establecimiento de la tolerancia sistémica. [117, 118]. Si bien la función de IDO sobre la maduración de las CDs no ha sido aún definida claramente, ha sido reportado que la activación de TLRs puede inducir la actividad de IDO en CD [119]. Por ello investigamos si IDO está involucrada en la maduración de las CDs luego de la activación dual de los TLRs. Con ese fin, incubamos las preparaciones de CDs en presencia de los agonistas de TLR y un inhibidor de la enzima IDO, el 1-D-MT [120], y determinamos la secreción de IL-12 e IL-10. A pesar de que el 1-D-MT no modificó la secreción de IL-12, la inhibición de la IDO redujo la secreción de IL-10 en las CDs estimuladas tanto con CpG sólo como combinado con R848 (**Figura 27 A-B**). Sin embargo, el 1-D-MT sólo mejoró la capacidad de sostener la proliferación de leucocitos alogeneicos en las CDs estimuladas con CpG (**Figura 27 C**). Estos resultados indican que aunque IDO no parece estar involucrada en el efecto inhibitorio de R-848 sobre la maduración de CDs inducida por CpG, el bloqueo de esta enzima podría mejorar la maduración de las CDs inducida por activación de TLR9.

Papel del NF- κ B en la activación de CDs mediada por TLR

Nuestros resultados sugieren que aunque NOS e IDO ejercen un efecto inhibitorio en la maduración de las CDs en respuesta a la estimulación de TLR9, estas vías no parecen estar involucradas en la inhibición de la maduración de CDs observada luego de la activación dual de TLR7 y TLR9. Dado que ambas vías de TLR conducen a la fosforilación y la traslocación nuclear del factor de transcripción NF- κ B [121], hipotetizamos que la desregulación en la activación de la vía de NF- κ B podría estar involucrada en la inhibición de la maduración de las CDs observada luego de la activación simultánea de TLR9 y TLR7.

Para investigar esta vía utilizamos dos inhibidores de NF- κ B: el BAY11-7082, un inhibidor irreversible de IKK α [122], y el Ro 106-9920, el cual se postula ejerce el bloqueo de esta vía mediante inhibición de la ubiquitinación de I κ B α [123]. Se seleccionó una dosis de cada uno de los inhibidores, con la cual la viabilidad de las CDs no se afectara, pero tuviera un efecto bloqueante. Para evaluar estos parámetros realizamos una curva de dosis y se evaluó la secreción de IL-12 inducida por CpG en presencia de cada inhibidor (**Figura 28**). Observamos que la dosis de 2 μ M de BAY11-7082 y 10 μ M de Ro 106-9920 tienen un efecto inhibitorio sobre la secreción de IL-12 inducida por CpG sin afectar la

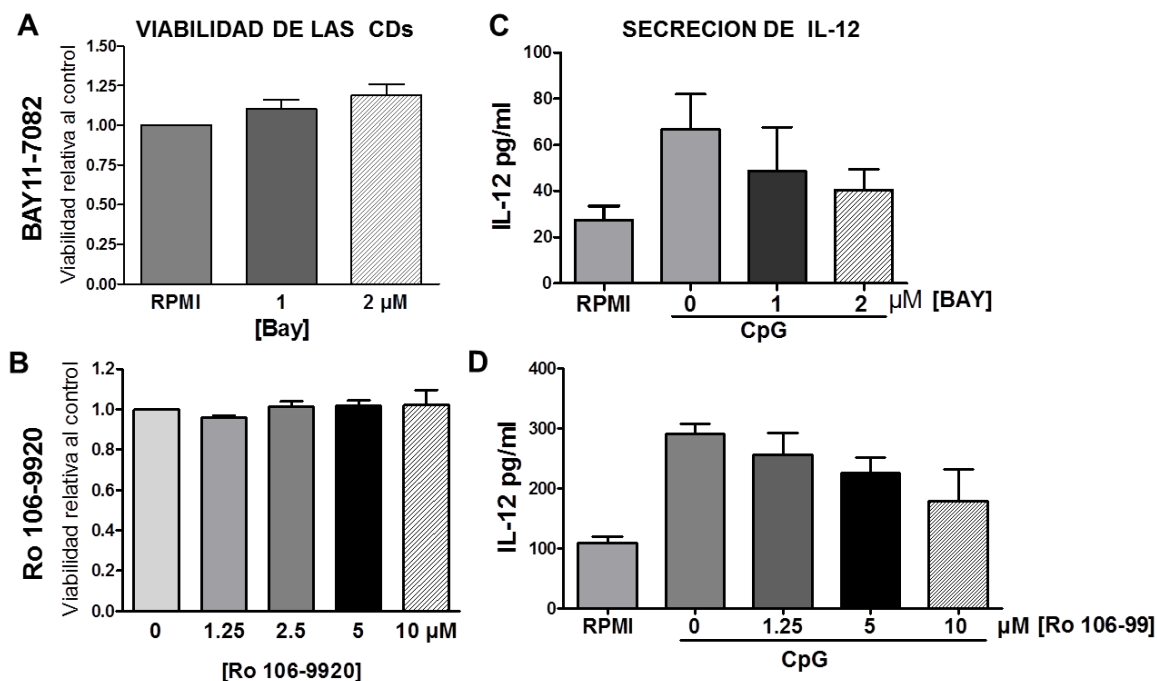


Figura 28. Curvas dosis-respuesta de inhibidores de NF-κB en CDs. A-B, Las CDs fueron incubadas por 24 hs. con distintas dosis de inhibidores de la vía NF-κB, BAY11-7082 (A) o Ro 106-9920 (B) y se evaluó la viabilidad celular mediante el método de MTT. C-D, Las CDs fueron estimuladas 24 hs. con CpG en presencia de BAY11-7082 (C) o Ro 106-9920 (D) y se determinó la secreción de IL-12 mediante ELISA.

viabilidad de las CDs (Figura 28). Luego evaluamos el efecto del bloqueo de NF-κB sobre la secreción de citoquinas en CDs incubadas con CpG sólo o en combinación con R848 utilizando las concentraciones de inhibidores seleccionadas. Observamos que tanto

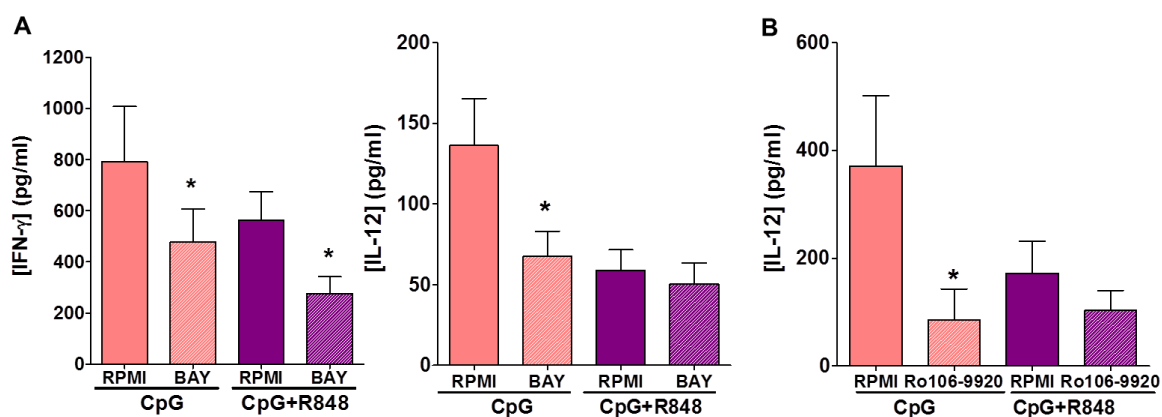


Figura 29. Efecto del bloqueo de NF-κB sobre la secreción de citoquinas inducida por agonistas de TLR en CDs. A, Las CDs fueron incubadas con CpG sólo o en combinación con R848 durante 24 hs. en presencia de BAY117082 (2 μM) y se evaluó la concentración de IL-12 e IFN-γ en el sobrenadante de cultivo por ELISA. *p<0.05 vs RPMI (Test t de Student apareada). B, Las CDs fueron incubadas con CpG o CpG+R-848 en presencia de Ro106-9920 (10 μM) y se evaluó la concentración de IL-12 en el sobrenadante del cultivo por ELISA. *p<0.05 vs control sin Ro106-9920 (Test t de Student apareada).

BAY11-7082 como Ro 106-9920 inhibieron significativamente la producción de IL-12 inducida por CpG, pero no modificaron la inhibición inducida por la presencia concomitante de R848 (**Figura 29**). Por otra parte, la inhibición de NF- κ B condujo a una reducción significativa de la secreción de IFN- γ inducida tanto por CpG como por CpG+R848 (**Figura 29 A**).

Dado que NF- κ B es necesario para la adecuada producción de citoquinas y para la supervivencia de las CDs, dos características que encontramos alteradas cuando TLR9 y TLR7 fueron activados simultáneamente, evaluamos si la vía de NF- κ B era correctamente activada luego de la incubación con CpG y R-848. En primer término, evaluamos mediante western blot la expresión de la subunidad de NF- κ B p65 (RelA) fosforilada en las CDs estimuladas con ambos agonistas durante 24 horas. La fosforilación de NF- κ B p65

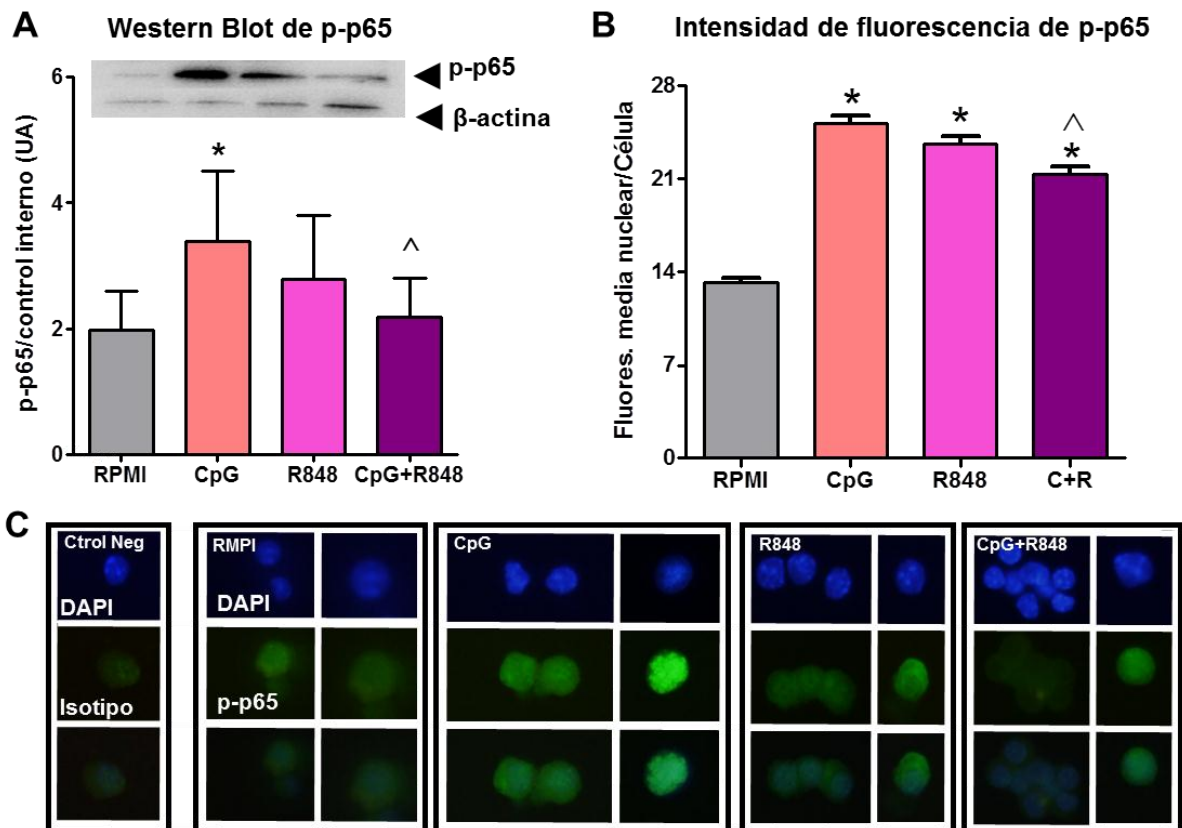


Figura 30. Evaluación de la activación de la vía de NF- κ B en respuesta a la estimulación de TLR7/8 y TLR9. **A**, Las CDs fueron incubadas con CpG y R848 solos o en combinación durante 24 hs. Se extrajeron proteínas y se evaluó la concentración de p65 fosforilada mediante Western Blot. Los datos fueron relativizado a la expresión de control interno, β -actina. **B**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de fosfo-p65 por célula. **C**, Fotos representativas de la inmunofluorescencia de fosfo-p65 en CDs de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ vs RPMI, ^ $p < 0.05$ vs CpG (ANOVA seguido del test de Tukey), $n = 7$.

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

en residuos específicos de serina o treonina son particularmente importantes porque son capaces de aumentar su capacidad transcripcional [124]. Observamos que sólo CpG aumentó significativamente el contenido de fosfo-p65 (**Figura 30 A**). Es importante notar que dicho aumento es bloqueado cuando se adiciona R848. Teniendo en cuenta que fosfo-p65 puede localizar tanto en núcleo como en el citoplasma, evaluamos la intensidad de fluorescencia de fosfo-p65 nuclear mediante inmunofluorescencia indirecta (**Figura 30 B-C**). Observamos un aumento en la intensidad de fluorescencia de fosfo-p65-NF- κ B nuclear en las CDs estimuladas con CpG o con R848 individualmente, el cual se ve significativamente reducido con la estimulación dual (**Figura 30, B-C**). Cuando evaluamos la vía de NF- κ B a las 4 hs de estimulación, tanto CpG como la combinación de CpG+R848 son capaces de aumentar fosfo-p65 nuclear mientras que R848 no indujo cambios (**Figura 31**).

Estos resultados sugieren que una activación incompleta de la vía de NF- κ B puede estar involucrada en el efecto inhibitorio de R848 sobre la activación de CDs mediada por CpG.

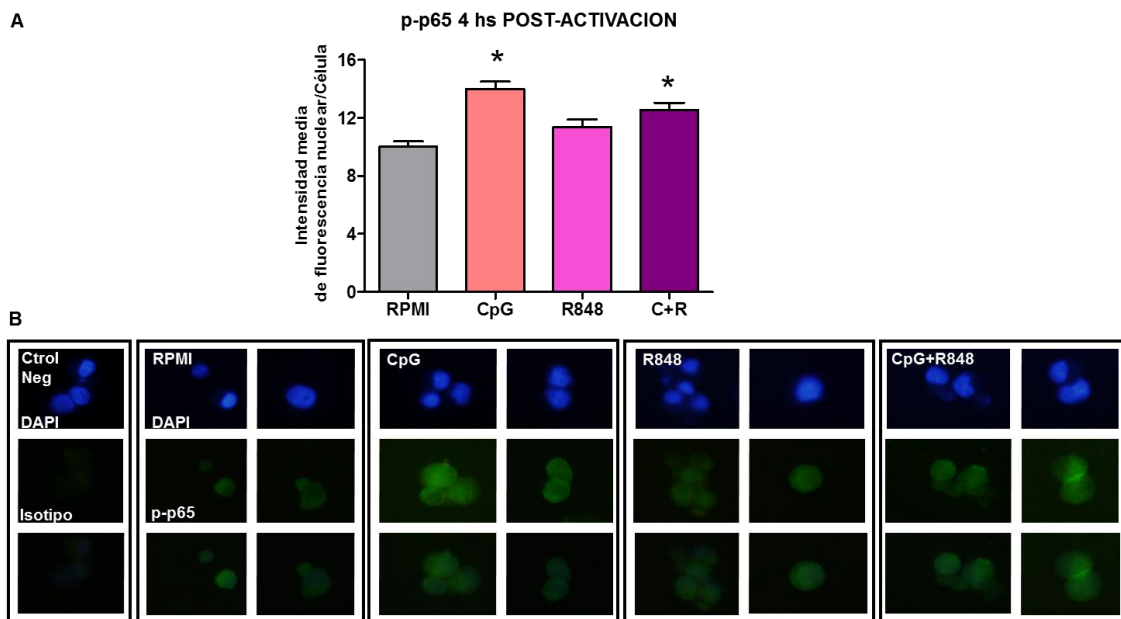


Figura 31. Activación de la vía de NF- κ B en CDs activadas con agonistas de TLR a tiempos cortos. Las CDs fueron estimuladas por 4 hs. con CpG, R848 o la combinación de ambos. **A**, Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de fosfo-p65 por célula. **B**, Fotos representativas de la inmunofluorescencia de fosfo-p65 en CDs de cada grupo experimental. * $p < 0.05$ vs RPMI (ANOVA seguido del test de Tukey), $n = 3$.

II.D. *Evaluación de los agonistas de TLR7 y TLR9 en la activación de CDs humanas*

Considerando que existen diferencias en el fenotipo entre las CDs murinas y humanas [125], evaluamos el efecto de los agonistas de TLR9 y TLR7/8 sobre la activación de CDs humanas. Monocitos fueron purificados de sangre periférica de donantes adultos sanos mediante MACS, obteniendo una pureza del 96-99% (Figura 32 A). Los PBMCs

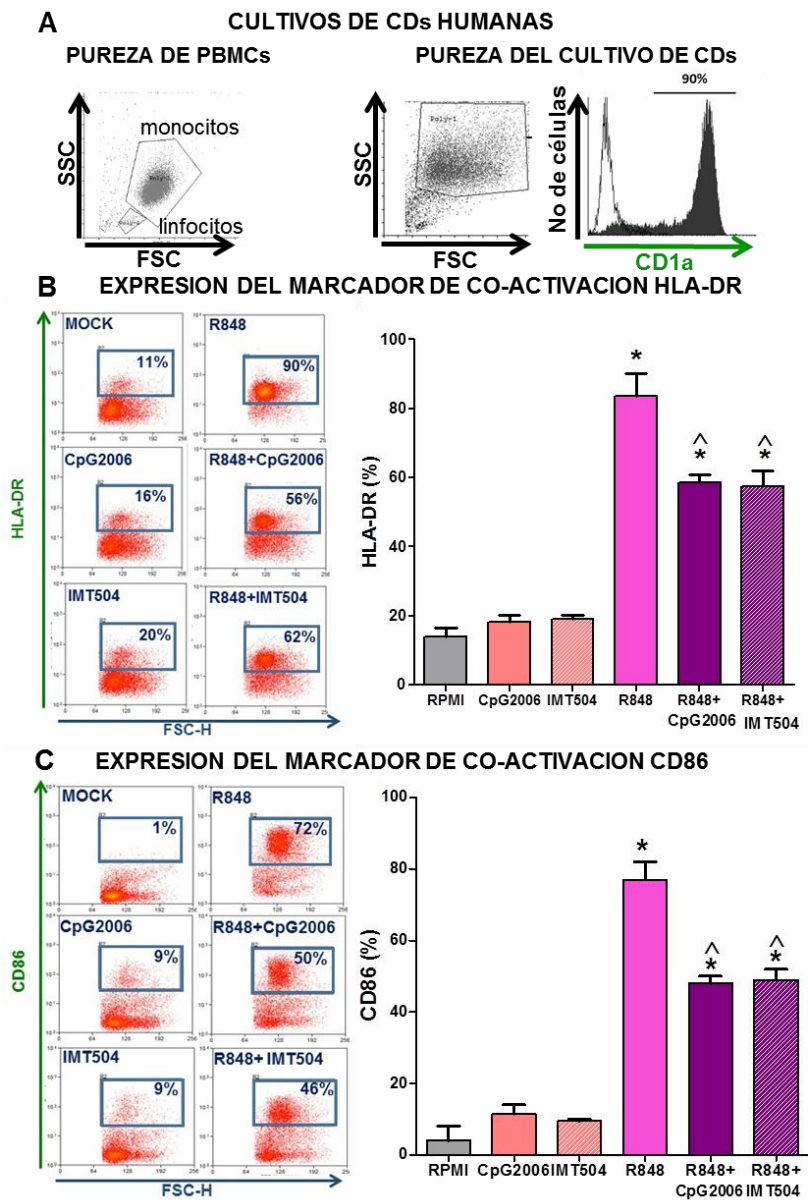


Figura 32. Expresión de co-activadores luego de la activación de TLR7/8 y TLR9 en CDs humanas. A, Monocitos purificados de sangre periférica (PBMCs), fueron incubados con GM-CSF e IL-4. La pureza de los cultivos de CDs fue de más del 90%, según el análisis por FACS de CD1a. B-C, Las CDs humanas fueron incubadas con agonistas de TLR9 humanos CpG2006 o IMT504 y el agonista de TLR7/8, R848 durante 24 hs. Se evaluó la expresión de HLA-DR (B) y CD86 (C) por citometría de flujo. * $p < 0.05$ vs RPMI, ^ $p < 0.05$ vs R848 (ANOVA seguido del test de Tukey). Se muestran dot plots representativos, $n=2$.

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

fueron cultivados con GM-CSF+IL-4 durante 5 días. La pureza de los cultivos fue de más del 90% de células CD1a⁺, según el análisis por citometría de flujo (**Figura 32 A**). Las CDs humanas fueron incubadas por 24 hs con los agonistas de TLR9 humano, CpG2006 e IMT504 [126], y el agonista de TLR7/8, R848, utilizados solos o en combinación. Cuando evaluamos la expresión de marcadores de co-activación en las CDs humanas observamos que mientras los agonistas de TLR9 indujeron una estimulación muy débil de la expresión de HLA-DR (**Figura 32 B**) y CD86 (**Figura 32 C**), R848 produjo un fuerte aumento en los niveles de expresión de estos marcadores. En concordancia con nuestros resultados en CDs murinas, la estimulación dual de los receptores TLR9 y TLR7/8 redujo la activación de las CDs humanas comparada con R848 sólo (**Figura 32 A-B**).

Cuando evaluamos el efecto de los agonistas de TLR sobre la capacidad fagocítica de las CDs humanas observamos que luego de 24 hs. de estimulación sólo R848 redujo el porcentaje de células fagocíticas, siendo este efecto revertido por la estimulación concomitante de TLR9 utilizando tanto CpG2006 como IMT504 (**Figura 33 A**).

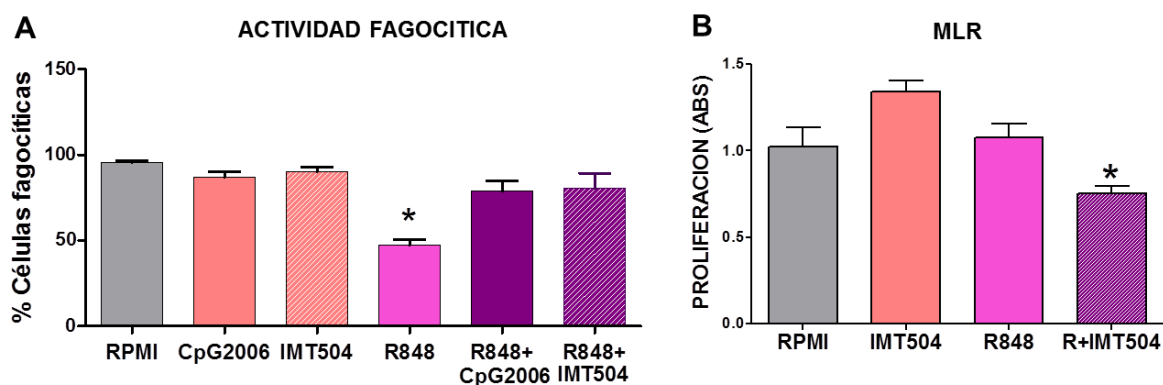


Figura 33. Capacidad fagocítica y MLR alogeneico luego de la activación dual de TLR7/8 y TLR9 en CDs humanas. Las CDs humanas fueron incubadas con agonistas de TLR9 humanos CpG2006 o IMT504 y el agonista de TLR7/8, R848 durante 24 horas para ensayo de MLR hs. **A**, Luego de la incubación con los agonistas de TLR las CDs fueron incubadas con microesferas fluorescentes. Las barras representan la media \pm IC_{a=0.05} del porcentaje de CDs conteniendo microesferas fluorescentes en su citoplasma luego 16 horas. * $p < 0.05$ vs RPMI. Test de χ^2 . **B**, Luego de la incubación con los agonistas de TLR, las CDs fueron fijadas e incubadas con linfocitos purificados de sangre periférica de otro paciente durante 72 hs. La incorporación de BrDU por los linfocitos en proliferación fue determinada por ELISA. * $p < 0.05$ vs RPMI (ANOVA, seguido por test Tukey), $n=3$.

Por último, analizamos la capacidad de las CDs estimuladas por 2 hs. con los diferentes agonistas, de sostener la proliferación de linfocitos T alogeneicos (**Figura 33 B**). En concordancia con los resultados observados previamente, la combinación de los

RESULTADOS – CAPITULO II: Optimización de vacunas de células dendríticas

agonistas de TLR, CpG y R848 redujola proliferación de linfocitos T con respecto al resto de las condiciones experimentales (**Figura 33 B**).

Nuestros resultados indican que R848 puede ser un adyuvante útil para las vacunas de CDs humanas y que la estimulación de múltiples TLR debe ser cuidadosamente estudiada para su uso en la terapia antitumoral.

CAPITULO III

Bloqueo terapéutico de Foxp3

Capítulo III: Bloqueo terapéutico de Foxp3

III.A. Efecto de la vacunación con células dendríticas sobre las poblaciones linfocitarias de bazo y tumor

Las células T regulatorias (Tregs) han sido involucradas en la baja eficacia de las modalidades inmunoterapéuticas en pacientes con cáncer [127]. Nuestro objetivo general es bloquear la acción de estas células para mejorar la inmunidad antitumoral inducida por vacunas antitumorales. En una primera instancia evaluamos si la vacunación con CDs

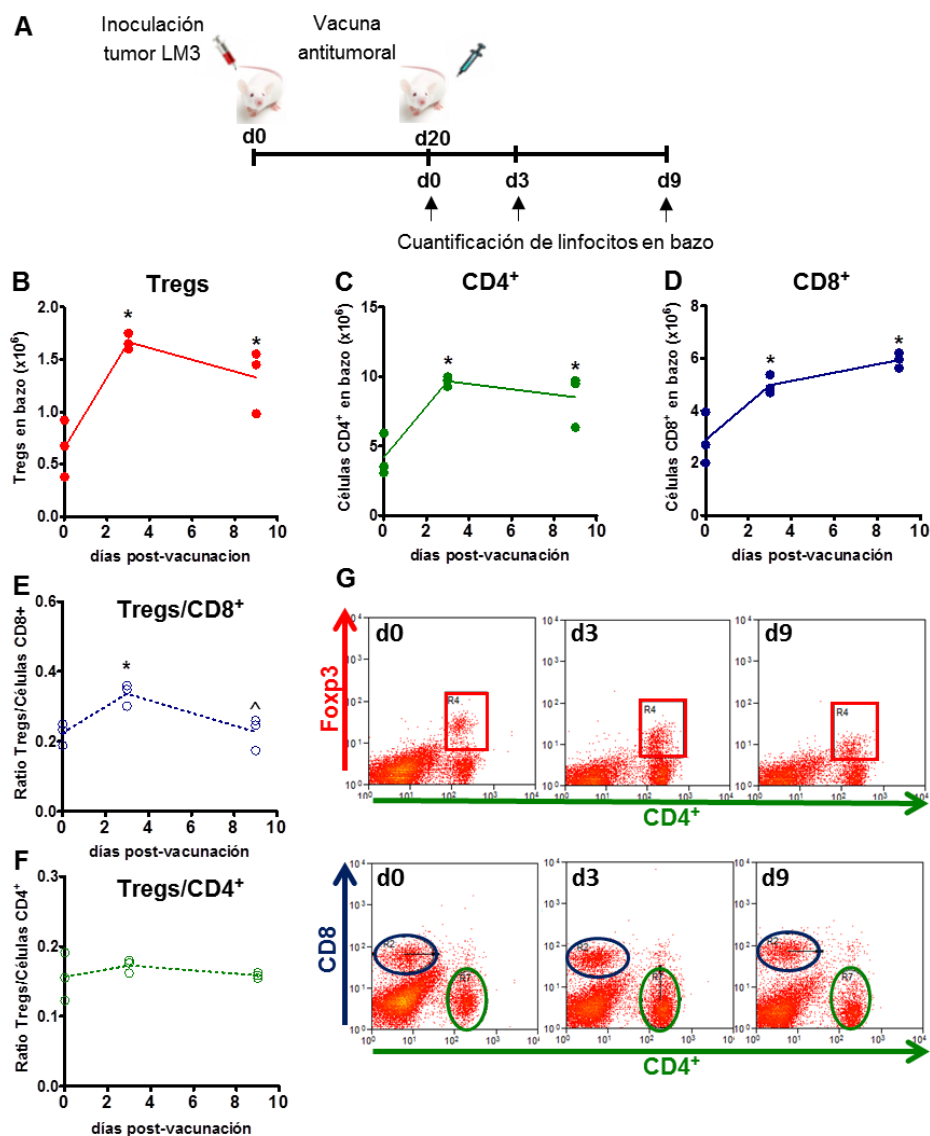


Figura 34. Efecto de la vacunación antitumoral sobre las poblaciones linfocitarias esplénicas. **A**, Esquema de vacunación terapéutica. Ratones portadores de tumores LM3 recibieron vacunas de CDs cargadas con lisados de células LM3 y activadas con CpG. El contenido de Tregs (CD4⁺/Foxp3⁺, **B**), linfocitos CD4⁺ (**C**) y CD8⁺ (**D**) en bazo fue evaluado 0, 3 y 9 días post vacunación mediante citometría de flujo. **E**, Relación entre el contenido de Tregs/linfocitos CD8⁺ **F**, Relación entre el contenido de Tregs/CD4⁺ esplénicas. **G**, Dot plots representativos de las poblaciones linfocitarias en bazo a distintos tiempos post vacunación. * $p < 0.05$ vs d0 (ANOVA seguido del test de Tukey), $n = 3$.

en ratones portadores de tumores LM3, es capaz de inducir la expansión de Tregs, como ocurre en pacientes oncológicos. Para ello los ratones fueron inoculados con tumores LM3 y recibieron vacunas antitumorales 20 días post-inoculación tumoral. CDs cargadas con lisados de células tumorales, fueron activadas con CpG al momento de la inoculación e inyectadas s.c. en el flanco contralateral al tumor (**Figura 34 A**). Evaluamos el contenido de Tregs ($CD4^+/Foxp3^+$), linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en bazo y tumor a diferentes tiempos post-vacunación (**Figura 34-35**). Observamos un aumento en el número de Tregs, linfocitos $CD4^+$ y $CD8^+$ en el bazo 3 y 9 días luego de la vacunación. La relación de Tregs/linfocitos $CD8^+$ aumentó al día 3 post-vacunación ($p<0,05$), volviendo a los niveles iniciales al día 9 (**Figura 34 E**). Respecto a la relación Tregs/linfocitos $CD4^+$, no se observan diferencias en ninguno de los tiempos evaluados (**Figura 34 F**). A continuación evaluamos las poblaciones de Tregs, y linfocitos $CD8^+$ y $CD4^+$ presentes en el tumor. Detectamos un aumento significativo de todas las poblaciones al día 9 post-vacunación. (**Figura 35**). Nuestros resultados indican que la vacunación antitumoral con CDs aumenta la presencia no sólo de linfocitos efectores, sino también de células T regulatorias en bazo y tumor, recapitulando lo que se observa en los pacientes oncológicos [128].

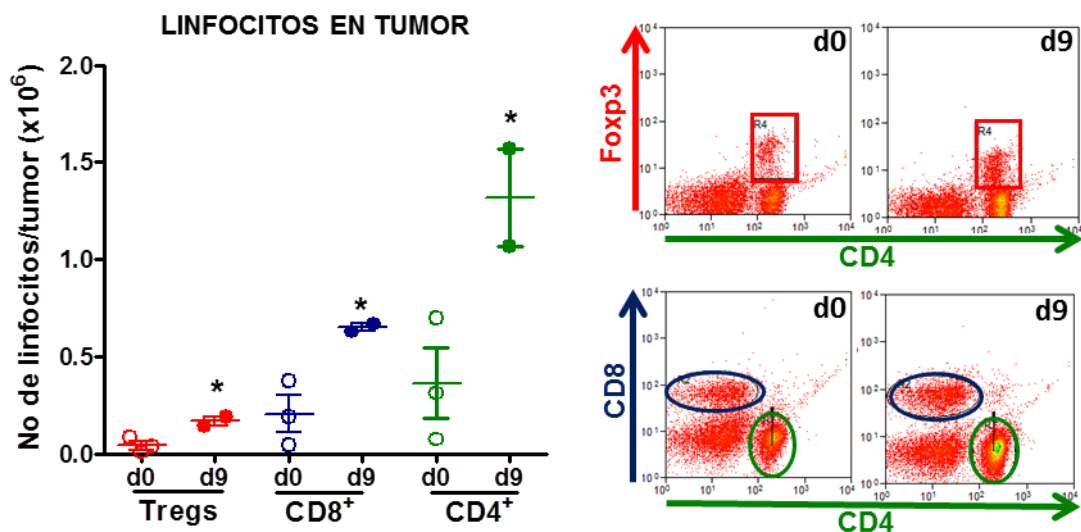


Figura 35. Efecto de la vacunación antitumoral sobre las poblaciones inmunes intratumorales. La presencia de Tregs ($CD45^+/CD4^+/Foxp3^+$), linfocitos $CD8^+$ y $CD4^+$ en tumor fue evaluada mediante citometría de flujo en el día de la vacunación y 9 días después. En el panel de la derecha se muestran dotplots representativos de las distintas poblaciones celulares. * $p<0,05$ vs d0 (Test *t* Student), $n=3$.

III.B. Eficacia de la terapia combinada de vacunas de CDs y péptido bloqueante de Foxp3 en ratones inmunocompetentes portadores de carcinomas mamarios metastásicos

Para bloquear el bloqueo específico de Tregs, utilizamos el péptido penetrante de células P60 que se une a Foxp3 e inhibe su translocación nuclear (Casares et al, 2010). Ratones hembras BALB/c fueron inoculadas con células singeneicas de carcinoma de mama LM3. Cuando los tumores fueron palpables (día 18), se procedió a la vacunación

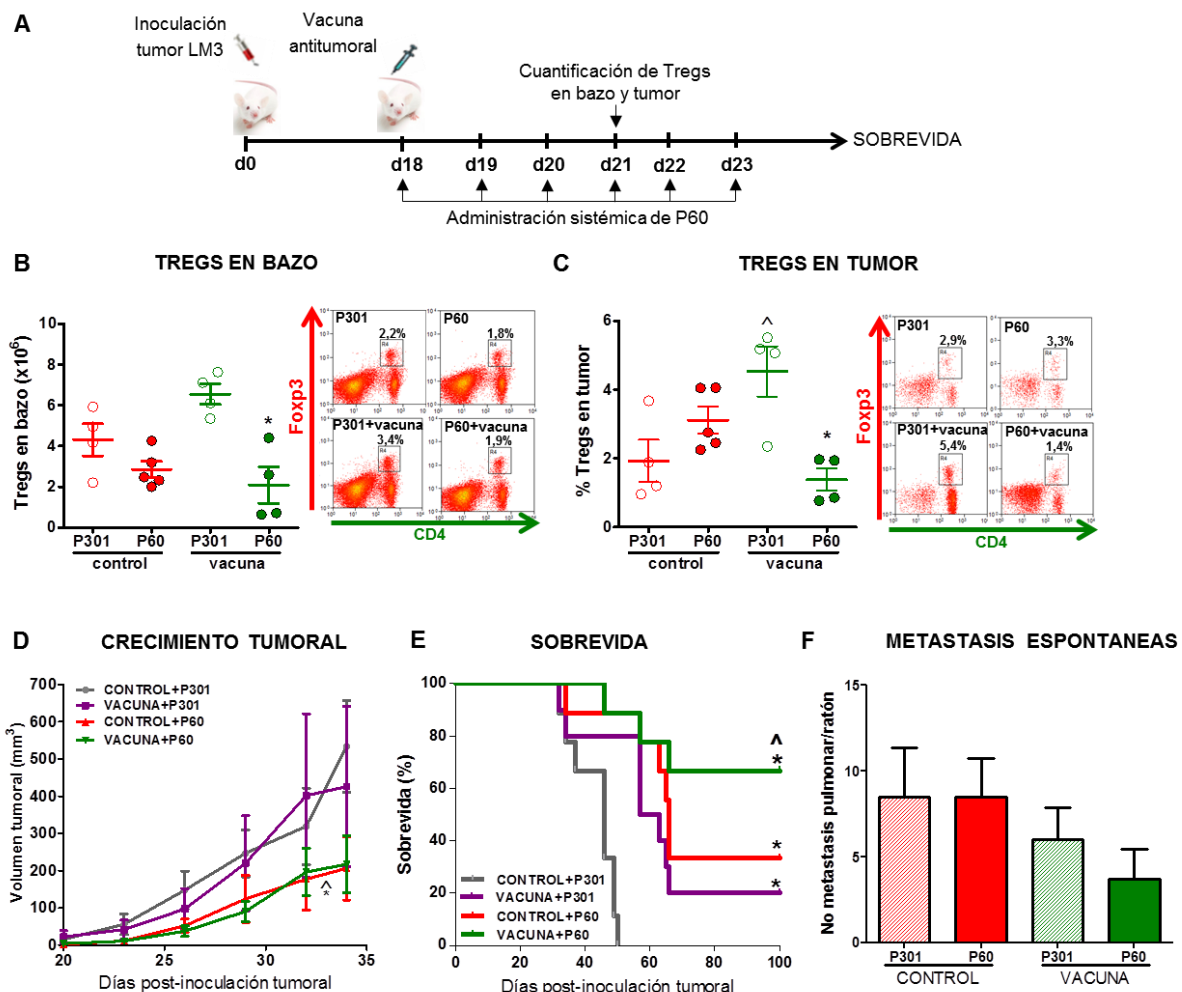


Figura 36. Eficacia de vacunas antitumorales combinadas con el bloqueo de Foxp3 en ratones inmunocompetentes portadores de tumores LM3. A, Esquema del diseño experimental. Ratones portadores de tumores LM3 recibieron vacunas de CDs cargadas con lisados de células LM3 y activadas con CpG 18 días post-inoculación tumoral. A partir de ese día, los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. de 100 µg/día de péptido inhibidor de Foxp3 (P60) o péptido control (P301) por 6 días. La presencia de Tregs en bazo (CD4⁺/Foxp3⁺, B) y tumor (CD45⁺/CD4⁺/Foxp3⁺, C) fue determinada 3 días post-vacunación. *p<0.05 vs P301; ^p<0.05 vs vacuna+P301 (ANOVA seguido del test de Tukey), n=4-5. D, Crecimiento tumoral, evaluado con calibre 3 veces por semana. *p<0.05 vs P301; ^p<0.05 vs vacuna+P301, (Análisis de regresión múltiple) n=9-10 E, Curvas de supervivencia Kaplan Meyer. *p<0.05 vs P301; ^p<0.05 vs vacuna+P301 (Log Rank test). F, Numero de metástasis pulmonares espontáneas por ratón.

s.c. con CDs cargadas con lisados de células LM3 y activadas con CpG. Teniendo en cuenta que la expansión de Tregs se observa a partir del día 3 post vacunación, los animales fueron inyectados i.p. diariamente con el péptido P60 o péptido control P301 durante 6 días, comenzando el día de la vacunación (**Figura 36 A**). Luego de 3 días de iniciado el tratamiento, evaluamos la presencia de Tregs en bazo y tumor en un grupo de animales. Observamos que el tratamiento con P60 redujo significativamente la expansión de Tregs esplénicas (**Figura 36 B**) e intratumorales (**Figura 36 C**) en los ratones vacunados. Cuando evaluamos la progresión tumoral, observamos que la vacunación terapéutica con CDs no modificó el crecimiento tumoral respecto a los animales controles. Sin embargo, el tratamiento con el péptido P60 sólo o en combinación con la vacuna antitumoral inhibió el crecimiento del tumor (**Figura 36 D**). Cuando analizamos la sobrevida observamos que entre un 25 y un 30% de los animales tratados con la terapia individual con P60 o vacunación tuvieron sobrevida a largo plazo (**Figura 36 E**). Sin embargo, la terapia combinada mejoró significativamente la sobrevida de los ratones en comparación con las terapias individuales, llegando al 70% de sobrevida 100 días post-inoculación tumoral (**Figura 36 E**). El análisis de las metástasis pulmonares espontáneas no mostró diferencias significativas entre grupos, aunque el grupo con menor frecuencia de metástasis fue el tratado con la terapia combinada de vacuna y P60 (**Figura 36 F**).

A continuación, evaluamos la terapia de vacunas de CDs combinada con el bloqueo de Foxp3 en el modelo de carcinoma mamario murino triple negativo 4T1. Hembras BALB/c fueron inoculadas con células singeneicas 4T1 y cuando el tumor resultó palpable (día 9), se procedió a la vacunación con CDs cargadas con lisados de células 4T1 y activadas con CpG al momento de la inoculación. A partir de ese día y por 7 días consecutivos se inyectaron los péptidos P301 o P60 por vía i.p. Observamos que la monoterapia con vacunas o con el péptido P60 redujeron significativamente el crecimiento tumoral respecto de los animales control (**Figura 37 A**). La combinación de vacunación seguida del bloqueo de Foxp3 resultó en una mayor inhibición del crecimiento con respecto a las terapias individuales. Cuando evaluamos la sobrevida, observamos solo la terapia combinada aumento significativamente la sobrevida de los animales (**Figura 37 B**). El recuento de metástasis pulmonares indico que solo el tratamiento combinado con vacunas y P60 tuvo un efecto antimetastático significativo (**Figura 37 C**).

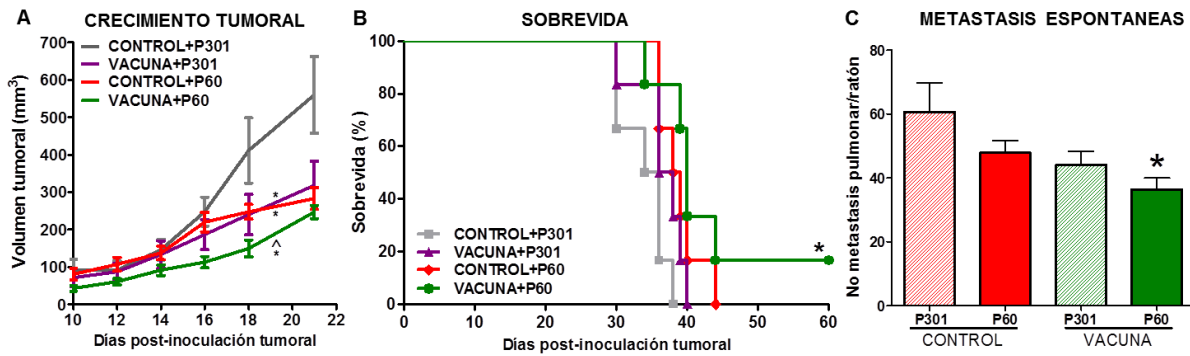


Figura 37. Eficacia de vacunas antitumorales combinadas con el bloqueo de Foxp3 en ratones inmunocompetentes portadores de tumores 4T1. Ratones portadores de tumores 4T1 recibieron vacunas de CDs cargadas con lisados de células 4T1 y activadas con CpG 9 días post-inoculación tumoral. A partir de ese día, los ratones recibieron diariamente inyecciones i.p. de 100 µg/día de péptido inhibidor de Foxp3 (P60) o péptido control (P301) por 7 días. **A**, Crecimiento tumoral, evaluado con calibre 3 veces por semana. * $p < 0.05$ vs P301; ^ $p < 0.05$ vs vacuna+P301, (Análisis de regresión múltiple) $n = 6$. **B**, Curvas de supervivencia Kaplan Meyer. * $p < 0.05$ vs P301 (Log Rank test). **C**, Número de metástasis pulmonares espontáneas por ratón, * $p < 0.05$ vs P301 (ANOVA seguido de test de Tukey).

Nuestros resultados en ambos modelos, LM3 y 4T1, indican que la terapia combinada resulta en un mayor beneficio terapéutico en comparación con las terapias individuales. Sin embargo, observamos que el bloqueo de Foxp3 también tiene un efecto antitumoral *per se*. Para evaluar si P60 tiene un efecto antitumoral directo, estudiamos la expresión y función de Foxp3 en células tumorales.

III. C. Evaluación de la expresión de Foxp3 en líneas celulares murinas de carcinoma mamario

Ha sido descrito que, si bien dentro del sistema inmune Foxp3 se expresa específicamente en Tregs [129], las células tumorales también pueden expresar este factor de transcripción. La presencia de Foxp3 ha sido observada tanto en líneas de células tumorales como en biopsias de tumores de mama y melanoma, entre otros [130]. Dado que en nuestros experimentos *in vivo* observamos que P60 tiene un efecto antitumoral *per se*, evaluamos la expresión de Foxp3 en ambas líneas celulares murinas, LM3 y 4T1 mediante inmunofluorescencia indirecta (**Figura 38 A**) y citometría de flujo (**Figura 38 B**). Encontramos que tanto la línea LM3 como las células 4T1 presentan inmunomarcación positiva para Foxp3 (**Figura 38**). Sin embargo, la intensidad de expresión de Foxp3 es mayor en células LM3 que en células 4T1 (**Figura 38 A-B**). Teniendo en cuenta las

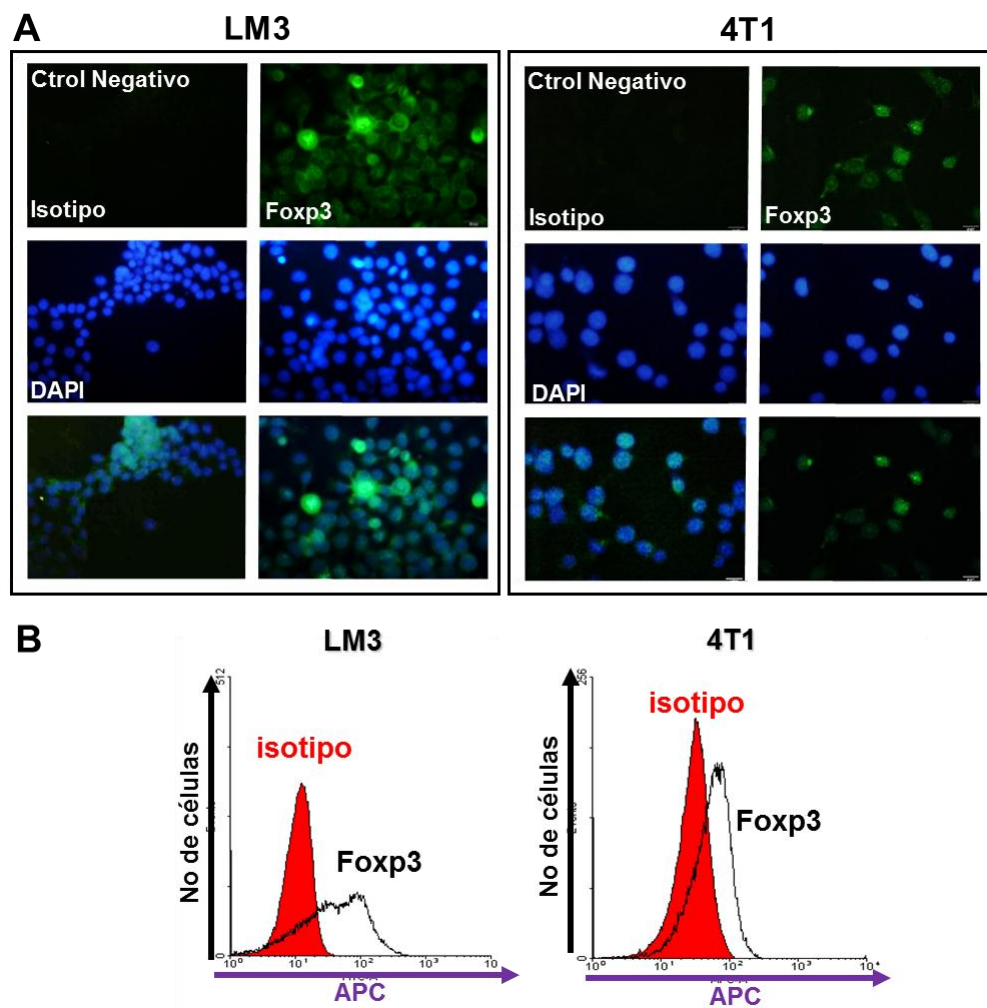


Figura 38. Expresión de Foxp3 en líneas murinas de carcinoma mamario. A, Expresión de Foxp3 en células LM3 y 4T1 mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos anti-Foxp3 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). En el panel izquierdo se muestra la línea celular LM3, en el panel derecho, la línea celular 4T1, ambas con su correspondiente control de isotipo. B, Expresión de Foxp3 en la línea LM3 (izquierda) y 4T1 (derecha) evaluado por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos. Los números corresponden a la intensidad media de fluorescencia (G_{mean}). El isotipo correspondiente se muestra en rojo.

implicancias que puede tener la localización subcelular de Foxp3 respecto a la función que el mismo ejerce [130], cuantificamos las células que exhibían expresión de alta intensidad en núcleo y citoplasma en ambas líneas celulares (**Figura 39**). Prácticamente todas las células evaluadas presentaron expresión de Foxp3. Mientras que la mayoría de las células 4T1 presentaron expresión citoplasmática y de baja intensidad, aproximadamente un 30% de las células LM3 exhibió alta intensidad de expresión de Foxp3 tanto citoplasmática como nuclear (**Figura 39**).

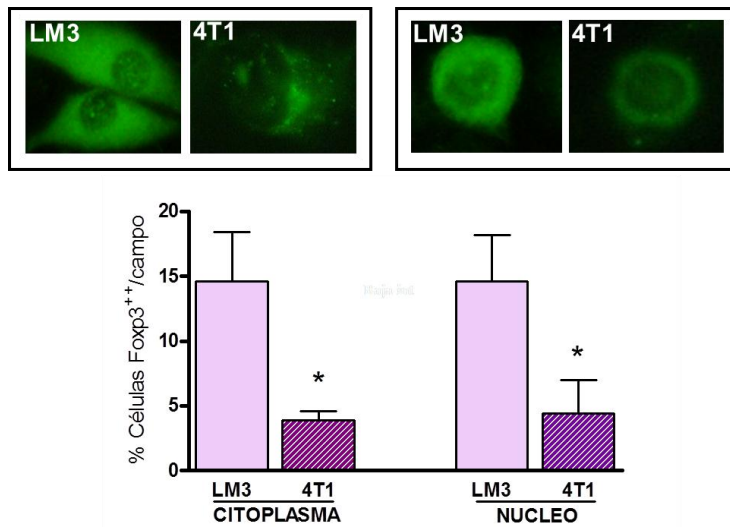


Figura 39. Distribución celular de la expresión de Foxp3 en líneas murinas de cáncer de mama. Las barras indican los porcentajes de células LM3 o 4T1 que exhiben alta intensidad de expresión de Foxp3 citoplasmático nuclear. Se muestran fotos representativas de la distribución observada para Foxp3 en cada línea celular. * $p < 0.05$ vs LM3 (test χ^2).

Regulación de la expresión de Foxp3 en líneas celulares murinas de carcinoma mamario

A continuación, investigamos si los mecanismos regulatorios que actúan sobre Foxp3 en Tregs se encontraban conservados en las células tumorales ([35]. Evaluamos el

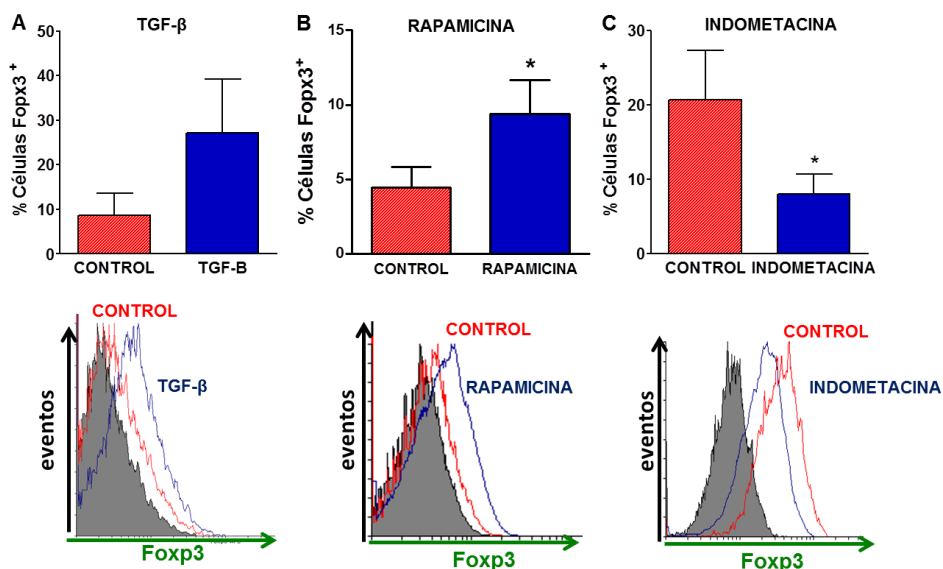


Figura 40. Regulación de la expresión de Foxp3. La expresión de Foxp3 fue evaluada mediante citometría de flujo en células LM3 incubadas en presencia de TGF-beta recombinante (A), el inhibidor de la vía de mTOR rapamicina (B) y el inhibidor de COX-2 indometacina (C). Se muestran histogramas representativos. En gris se muestra el histograma de células incubadas con control de isotipo. * $p < 0.05$ vs control (Test t de Student).

efecto de la estimulación con TGF- β y del bloqueo de las vías mTOR y COX sobre la expresión de Foxp3 en células LM3 mediante citometría de flujo (**Figura 40**). Mientras que la incubación con TGF-beta recombinante (**Figura 40 A**) y con el inhibidor de la vía de mTOR rapamicina (**Figura 40 B**) incrementaron la expresión de Foxp3 en las células LM3. La inhibición de Cox mediante indometacina, disminuyó significativamente la expresión de este factor de transcripción (**Figura 40 C**). Estos resultados sugieren que los mecanismos de regulación de Foxp3 en células tumorales son similares a los descritos para las Tregs [36].

Evaluación de la función de Foxp3 en líneas celulares tumorales murinas in vitro

Aunque la expresión de Foxp3 ha sido reportada en varias líneas tumorales [131], su función en estas células es aún materia de controversia. Para evaluar si Foxp3 podría estar involucrado en la supervivencia y/o proliferación de las células de carcinoma mamario murino, incubamos las células LM3 y 4T1 en presencia del péptido bloqueante de Foxp3 P60 o del péptido control P301 (**Figura 41**). Cuando evaluamos la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT observamos que la incubación con P60 por 24 horas redujo en aproximadamente un 25% la viabilidad de las células LM3, pero no modificó la viabilidad

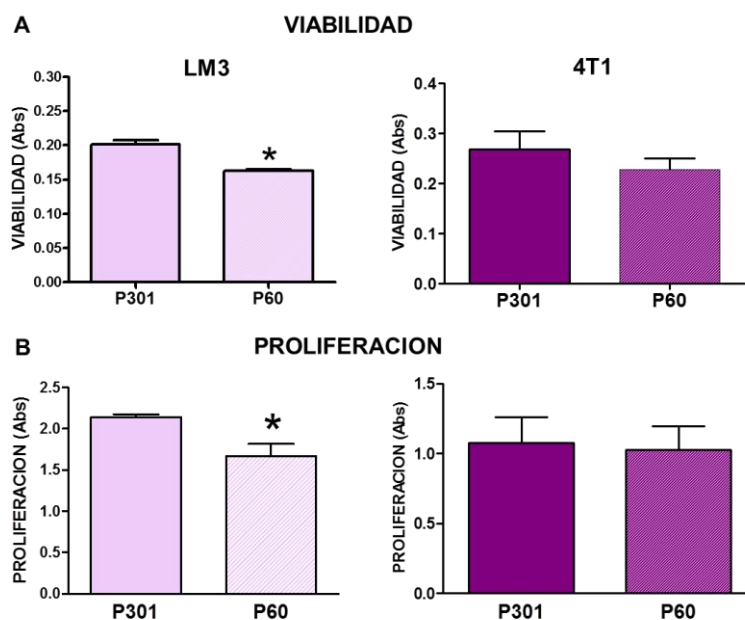


Figura 41. Bloqueo de Foxp3 en líneas murinas de cáncer de mama. Las células LM3 (panel izquierdo) y 4T1 (panel derecho) fueron incubadas en presencia del péptido bloqueante de Foxp3, P60 o péptido control, P301 durante 24 hs. **A**, La viabilidad fue determinada mediante la técnica de MTT. **B**, La proliferación fue evaluada mediante la incorporación de BrdU por ELISA. *p<0.05 vs P301 (Test *t* Student), n=3-5.

de las células 4T1 (**Figura 41 A**). Luego evaluamos la proliferación mediante la incorporación de BrDU, cuantificada por la técnica de ELISA. Hallamos que la incubación con P60 por 24 horas inhibió significativamente la proliferación de las células LM3 en aproximadamente un 25%, sin modificar la proliferación de las células 4T1 (**Figura 41 B**).

A continuación, teniendo en cuenta que Foxp3 modula la producción de la citoquina IL-10 en Tregs, y que esta citoquina juega un papel relevante en el mantenimiento del microambiente tumoral inmunosupresor [132], evaluamos el efecto de P60 sobre la producción de IL-10 en las líneas LM3 y 4T1 mediante la técnica de ELISA (**Figura 42**). Observamos que aunque ambas líneas tuvieron la capacidad de sintetizar y liberar IL-10, la incubación con P60 por 24 horas inhibió la producción de IL-10 en la línea LM3, sin afectar significativamente la síntesis de esta citoquina en las células 4T1 (**Figura 42**).

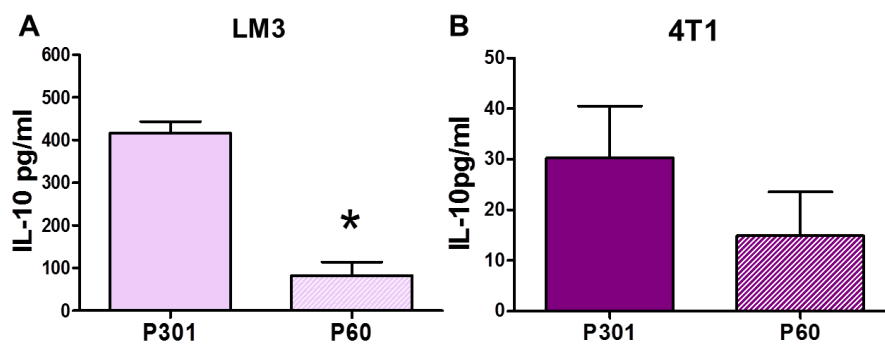


Figura 42. Efecto de P60 sobre la secreción de IL-10 en líneas murinas de cáncer de mama. Las células LM3 (A) y 4T1 (B) fueron incubadas en presencia del péptido bloqueante de Foxp3, P60 o péptido control, P301 durante 24 hs. El contenido de IL-10 fue evaluado en el sobrenadante mediante la técnica de ELISA. * $p < 0.05$ vs P301 (Test *t* de Student), $n = 3-4$.

Estos resultados indican que la sobre-expresión de Foxp3 podría favorecer la supervivencia y proliferación de las células tumorales y participar en el mantenimiento del microambiente tumoral inmunosupresor. Por lo tanto, es posible que P60 tenga un efecto antitumoral directo en tumores que sobre-expresan Foxp3.

Efecto del bloqueo de Foxp3 en ratones inmunosuprimidos portadores de tumores LM3

A partir de nuestros resultados *in vitro* que muestran que las células tumorales LM3 sobre-expresan Foxp3 y que este factor favorece la viabilidad de las células tumorales y el mantenimiento de un microambiente tumoral inmunosupresor, evaluamos el efecto del

bloqueo de Foxp3 sobre las células tumorales *in vivo* en ratones inmunosuprimidos. Ratones *nude*, los cuales se caracterizan por presentar deficiencia de linfocitos T por atrofia tímica, fueron inoculados con células LM3 y cuando los tumores fueron palpables (día 10) se procedió a la administración i.p. de P60 por 7 días (**Figura 43 A**). El último día de tratamiento evaluamos la expresión de Foxp3 en extractos de proteínas tumorales por western blot y observamos una reducción significativa en el contenido de Foxp3 intratumoral (**Figura 43 B**). La administración de P60 inhibió significativamente el crecimiento tumoral en comparación con ratones que recibieron péptido control (**Figura 43 C**). A pesar de que la inhibición de Foxp3 tuvo efecto antitumoral en estos animales, no observamos supervivencia a largo plazo (**Figura 43 D**).

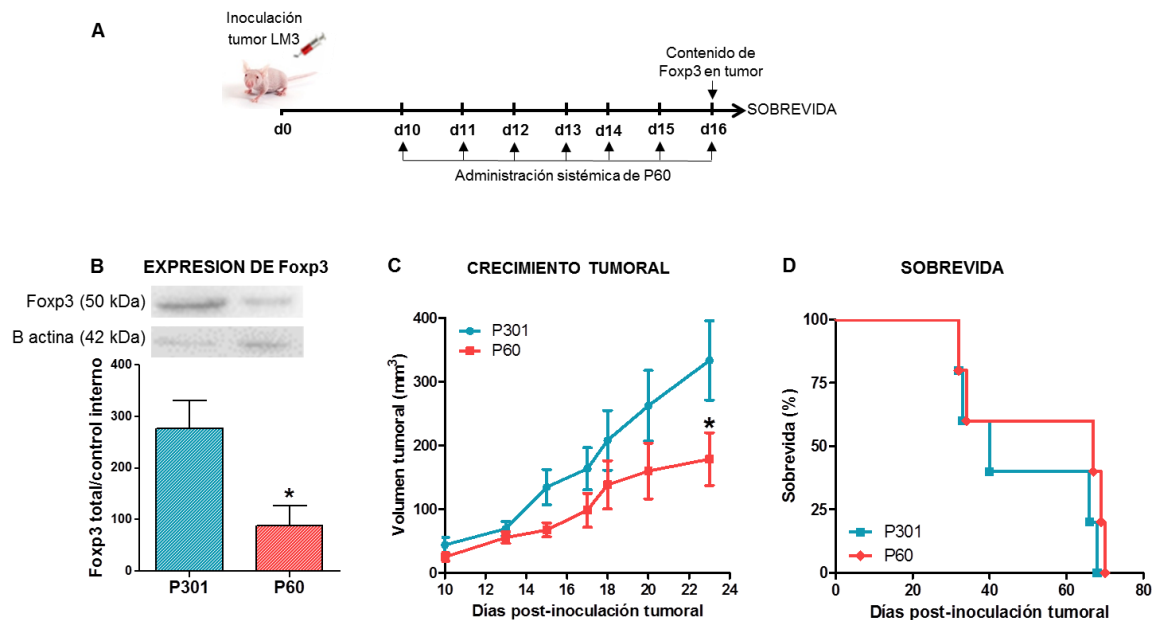


Figura 43. Efecto del bloqueo de Foxp3 en ratones inmunosuprimidos portadores de tumores LM3. **A**, Esquema del diseño experimental. Ratones *nude* fueron inoculados con células LM3 y luego de 10 días comenzaron a recibir inyecciones i.p. diarias de 100 µg de péptido control (P301) o péptido inhibidor de Foxp3 (P60) durante 7 días. **B**, El contenido de Foxp3 fue evaluado por Western Blot en extractos de proteínas tumorales al día 16 post inoculación tumoral. Se muestran bandas representativas de Foxp3 y control interno Beta-Actina. * $p < 0.05$ vs P301 (Test *t* de Student), $n = 3$. **C**, Crecimiento tumoral, evaluado con calibre 3 veces por semana. * $p < 0.05$ vs P301, (Análisis de regresión múltiple) $n = 6$. **D**, Curvas de supervivencia Kaplan Meyer.

Nuestros resultados indican que, en concordancia con lo observado *in vitro*, Foxp3 es un factor que favorece el crecimiento tumoral. El hecho de que la administración sistémica del péptido bloqueante P60 haya logrado inhibir la proliferación tumoral en

ratones *nude*, que carecen de Tregs [133], indica que dicho péptido fue capaz de ingresar al microambiente del tumor y ejercer una acción directa sobre las células tumorales

III.D. Evaluación de la expresión y función de Foxp3 en líneas celulares tumorales humanas

Con el objeto de evaluar el valor traslacional de nuestras observaciones en modelos murinos de cáncer de mama, evaluamos la expresión y función de Foxp3 en líneas celulares de carcinoma mamario humano. Utilizamos la línea MCF7, que se caracteriza por ser ER+, PR+, Her2+ [134] y la línea celular MDA-MB-231, caracterizada como ER-, PR-, Her2- [134]. Mediante inmunofluorescencia detectamos expresión de Foxp3 en las células MCF7, pero no en células MDA-MB231 (**Figura 44**). Es importante notar que no detectamos expresión de Foxp3 en la línea de células de epitelio mamario humano no tumoral MCF-10 [135]. Luego evaluamos el efecto de la incubación con P60 por 24 horas sobre la viabilidad de las líneas de cáncer de mama humano, medido por ensayo de MTT (**Figura 45**). Observamos que el bloqueo de Foxp3 redujo la viabilidad de las células MCF7 que son inmunoreactivas para Foxp3, sin afectar a las células MDA-MB-231, que no expresan Foxp3.

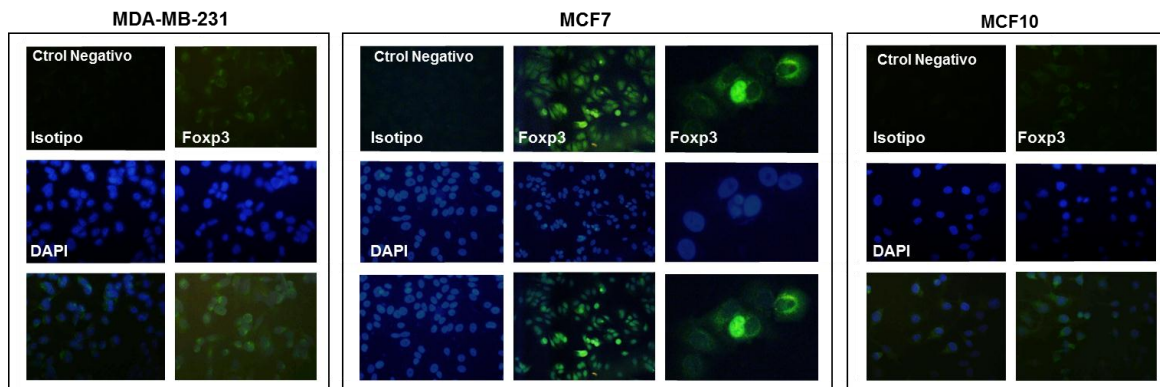


Figura 44. Expresión de Foxp3 en cultivos de líneas celulares humanas. A, Expresión de Foxp3 en células de carcinoma mamario MDA-MB-231 y MCF7 y células no tumorales de epitelio mamario MCF10, evaluada mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos específicos anti-Foxp3 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Se muestran los controles de isotipo correspondientes.

Estas observaciones indican que Foxp3 también puede expresarse en células de cáncer de mama humano y favorecer la supervivencia de estas células. Por lo tanto, el bloqueo de Foxp3 podría constituir una estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer de

mama no sólo por su efecto sobre las Tregs, sino también por sus efectos inhibitorios directos sobre células tumorales que expresan Foxp3.

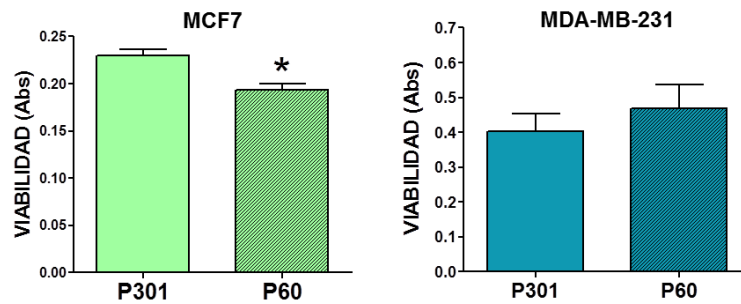


Figura 45. Función de Foxp3 en líneas humanas de cáncer de mama. Las células MCF7 y MDA-MB-231 fueron incubadas en presencia del péptido bloqueante de Foxp3, P60 o péptido control, P301 durante 24 hs. La viabilidad fue evaluada mediante la técnica de MTT. * $p < 0.05$ (Test t de Student), $n = 4$.

III.E. Desarrollo de vectores terapéuticos que bloquean Foxp3

Nuestros resultados indican que el péptido P60 sería una herramienta útil para el desarrollo de terapias que involucren el bloqueo del factor de transcripción Foxp3. Sin embargo, la posible aplicación clínica de una terapia basada en la administración de un péptido de vida media corta, dificulta el bloqueo sostenido del factor en cuestión durante

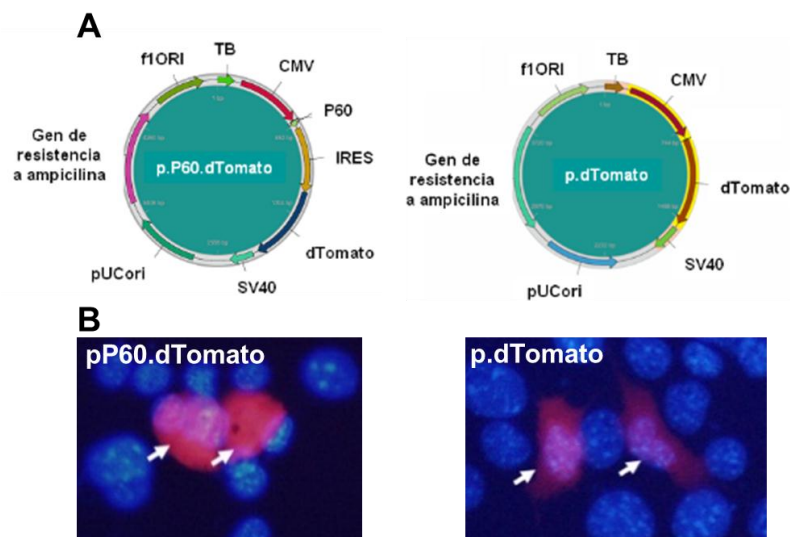


Figura 46. Desarrollo de un plásmido que codifica para el péptido P60. A, Esquema del plásmido que codifica para el péptido P60, unido mediante una secuencia IRES a la proteína fluorescente dTomato (p.P60.dTomato) y del plásmido control (p.dTomato). B, Células 4T1 transfectadas con los plasmidos. Las flechas indican células positivas para dTomato (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul).

terapias prolongadas. Por lo tanto, el desarrollo de un vector de terapia génica que permita expresar localmente el péptido P60 conduciría a una inhibición constante y prolongada de las Tregs que invaden el tumor o de las células tumorales Foxp3⁺, sin la necesidad de la administración continua del péptido. Con este objetivo, diseñamos un plásmido con la secuencia codificante para P60, bajo la regulación del promotor constitutivo del citomegalovirus murino (CMV). La secuencia que codifica para el péptido terapéutico se haya unida mediante una secuencia IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) al gen reportero dTomato (p.P60.dTomato), una proteína fluorescente que permite la visualización sencilla de las células transfectadas (**Figura 46 A**). Asimismo, diseñamos un plásmido control, que codifica para dTomato bajo el control del promotor CMV (p.dTomato). La capacidad de transducción de estos plásmidos fue evaluada en células 4T1, ya que observamos que tienen baja expresión de Foxp3 y P60 no tiene efectos deletéreos sobre las mismas. Luego de 24 horas observamos células dTomato⁺ en células transfectadas con ambos plásmidos, indicando que las secuencias se expresan correctamente (**Figura 46 B**). Con el objeto de evaluar si el péptido P60 codificado en el plásmido p.P60.dTomato era correctamente liberado desde las células transfectadas, tomamos el medio condicionado de 24 hs. de las células 4T1 transfectadas con p.P60.dTomato o p.dTomato para incubar las células LM3 durante 24 hs adicionales

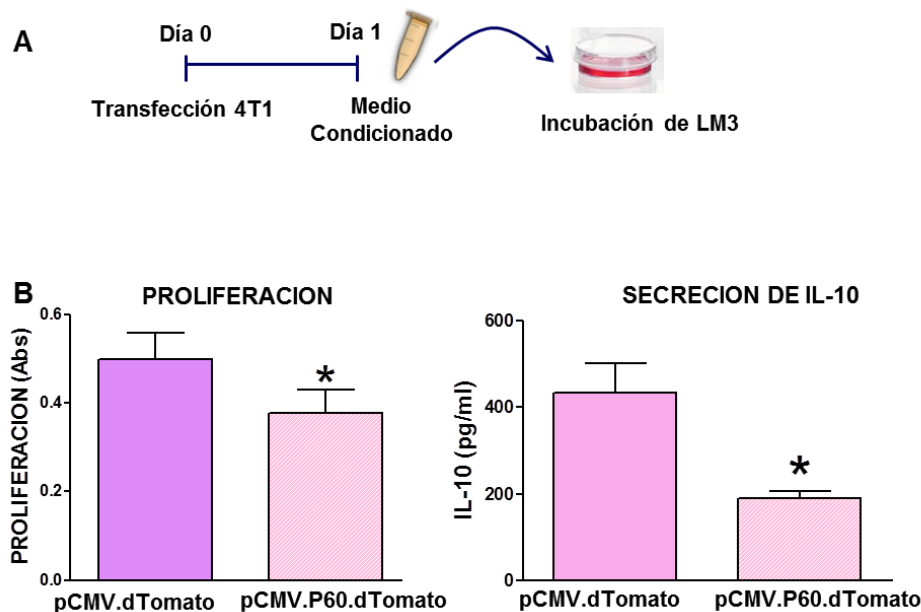
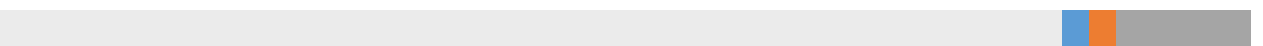


Figura 47. Evaluación de la función del plásmido que codifica para el péptido P60. **A**, Esquema del diseño experimental: células 4T1 fueron transfectadas con pCMV.dTomato (control) o pCMV.P60.dTomato durante 24 hs. Luego, el medio condicionado fue utilizado para la incubación de células LM3 por 24 hs. **B**, La proliferación (panel izquierdo) y la secreción de IL-10 (panel derecho) fueron evaluadas mediante ELISA. * $p < 0.05$ (Test t de Student), $n = 3-4$.

(Figura 47 A). Evaluamos la proliferación, medida por incorporación de BrdU y la secreción de IL-10 mediante ELISA. El medio condicionado de las células 4T1 transfectadas con p.P60.dTomato redujo el índice de proliferación de las células LM3 con respecto al medio condicionado control (Figura 47 B). Cuando evaluamos la secreción de IL-10, observamos que el sobrenadante de p.P60.dTomato también inhibió la secreción de esta citoquina (Figura 47 B), un efecto similar al observado con el péptido P60. Estos resultados indican que el plásmido permite la correcta expresión del péptido P60, y más importante aún, que este péptido es liberado desde las células transfectadas con el vector y es capaz de penetrar en células vecinas e inhibir la función de Foxp3.

Nuestros resultados sugieren que el desarrollo de un vector de terapia génica que codifique para P60 redundará en un efecto *by-stander* sustancial, ya que este péptido podría inhibir Foxp3 en células tumorales vecinas, así como en las Tregs que infiltran continuamente el tumor.

DISCUSION Y CONCLUSIONES



DISCUSION

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la eficacia antitumoral de una modalidad inmunoterapéutica que combina vacunas de CDs con el bloqueo de Tregs. Para alcanzar este objetivo, en una primera instancia, es necesario obtener un número considerable de CDs maduras, capaces de desencadenar una respuesta inmune antitumoral primaria y de memoria. Han sido descriptos diferentes métodos para la generación *ex vivo* de CDs a partir de MO, sangre periférica o células precursoras esplénicas. Varios estudios demuestran que GM-CSF induce la expansión de CDs *in vivo* e *in vitro* y que pueden ser aún más enriquecidas con la adición de IL-4 [125]. Otra metodología para generar CDs a partir de cultivos de MO ha sido uso de las citoquinas Flt3 ligando (Flt3-L)+IL-6, que genera CDs con características fenotípicas más heterogéneas [101, 136] Además, en este estudio observamos que los cultivos de precursores de MO murinos con GMCSF+IL-4 resultan en un mayor número de CDs por animal y en una mayor proporción de células CD11c+ en comparación con el cultivo con Flt3-L+IL-6. Las ventajas de GM-CSF+IL-4 hacen que sea la combinación más utilizada para generar CDs a partir de células progenitoras tanto murinas como humanas [125].

Es importante mencionar, que las CDs producidas a partir de pacientes sanos, puede responder de manera diferencial a las provenientes de pacientes con cáncer. Las CDs endógenas de los pacientes con cáncer no logran ejercer sus funciones efectoras debido a los potentes efectos inmunosupresores de los factores producidos en el microambiente tumoral [128]. La disfunción de las CDs endógenas ha sido observada en pacientes con cáncer de mama y ovario, próstata y renal, entre otros. Sin embargo, las CDs de los pacientes pueden ser amplificadas y maduradas *ex vivo*, en ausencia de los factores inmunosupresores derivados del tumor [128]. Aunque las CDs autólogas han sido utilizadas en numerosos ensayos clínicos para la preparación de vacunas antitumorales, no es claro aún si los PBMCs obtenidos de pacientes con cáncer son progenitores óptimos para la producción de estas vacunas. Las DCs obtenidas de PBMCs de pacientes con cáncer avanzado demostraron *in vitro* una actividad citotóxica antitumoral similar a las obtenidas de pacientes sanos [137]. Sin embargo, ha sido reportado que el rendimiento de cultivos de PBMCs de pacientes con cáncer de mama es hasta 3 veces menor que el obtenido de dadores sanos [138]. Asimismo, la expresión de coactivadores luego de la

DISCUSION

incubación con distintos cocktails de maduración es menor en CDs obtenidas de pacientes que en CDs de dadores sanos [138]. De todos modos, también han sido desarrolladas vacunas alogeneicas que permiten la preparación de grandes cantidades de vacunas estandarizadas con respecto a fenotipo y estadio madurativo y que han sido evaluadas en distintos ensayos clínicos [139, 140].

Teniendo en cuenta que durante la respuesta inmune frente a patógenos o tumores ocurre la activación simultánea de múltiples TLRs, la combinación de agonistas de TLRs es una estrategia terapéutica atractiva para ser utilizada en la clínica en pacientes con cáncer. Considerando que ha sido demostrado que agonistas de TLRs MyD88-dependientes pueden actuar sinérgicamente [109], buscamos mejorar la eficacia terapéutica de vacunas de CDs activadas con CpG (CpG-CDs), usando un coadyuvante adicional, el agonista de TLR7, Resiquimod o R848. Nuestros resultados *in vitro* muestran, a tiempos cortos, que la estimulación con CpG o CpG+R848 aumentó la habilidad de las CDs de estimular la proliferación de esplenocitos alogeneicos. Sin embargo, los experimentos *in vivo* demostraron que la adición de R848 inhibe el efecto antitumoral de las vacunas de CDs activadas con CpG, así como su capacidad de inducir memoria inmunológica.

Nuestros experimentos indican que en CDs de ratones, R848 estimuló la expresión de TNF- α , IL-10 y CD86, pero no aumentó la producción de IFN- γ o IL-12. R848 solo disminuyó la capacidad fagocitaria a las 48 hs. y las CDs activadas con este agonista no estimularon la proliferación de esplenocitos alogeneicos, sugiriendo que a pesar de que R848 tiene algunos efectos sobre las CDs murinas, no logra inducir la completa activación de estas células. De hecho, R848 no indujo una activación robusta de NF- κ B en las CDs, que inyectadas *in vivo* no tuvieron efecto antitumoral. Weeratna y col. también compararon CpG y R848 como adyuvantes de vacunas en un modelo murino de inmunización con HBsAG. En dicho estudio CpG también fue superior a R848 en su capacidad de aumentar la respuesta inmune humoral y celular [141].

Observamos que las vacunas profilácticas de CDs activadas con CpG tuvieron un efecto antitumoral robusto, inhibiendo el crecimiento tumoral y el desarrollo de metástasis, con el concomitante desarrollo de memoria inmunológica. Si bien la eficacia de las vacunas de CDs ha sido demostrada previamente en varios modelos profilácticos, su

DISCUSION

efecto anti-metastático ha sido menos estudiado [142]. Las vacunas profilácticas antitumorales pueden tener utilidad en el desarrollo de inmunidad antitumoral en pacientes con riesgo de desarrollar cáncer [143], por lo cual la evaluación de estrategias profilácticas de vacunación tiene valor traslacional. Los experimentos *in vivo* también indicaron que la activación dual con R848 revierte los efectos anti-metastásicos de las vacunas CpG-CDs y además, actúa en detrimento del desarrollo de la memoria inmunológica. Una característica imprescindible de los adyuvantes de vacunas es su habilidad para inducir el proceso de maduración y activación de las CDs [142], que es determinante en la magnitud y duración de la respuesta inmune [144]. La adición de R848 a la vacuna de CpG-CDs podría inhibir la capacidad de las CDs para estimular la memoria inmunológica debido a una incompleta activación de la CDs o a una disminución en la capacidad migratoria de estas células [145].

Si bien hay trabajos que demuestran que la combinación de agonistas de TLRs resulta en efectos sinérgicos sobre la activación del sistema inmune, la activación combinada de estos receptores puede también resultar en una disminución de los efectos antitumorales, de modo que el beneficio terapéutico depende de la correcta elección de los ligandos de TLRs a combinar. Por ejemplo, mientras que la combinación del agente terapéutico Taxol, agonista de TLR4, con R848 inhibe el crecimiento tumoral *in vivo*, LPS, agonista también de TLR4 y Taxol, acelera el crecimiento tumoral [79]. Por otro lado, la combinación de LPS con R848 aumenta la secreción de IL-12 desde CDs murinas y humanas [78]. Asimismo, la combinación agonistas de TLR9 y TLR7/8 administrados intratumoralmente actúan sinérgicamente, reduciendo el tamaño de tumores establecidos en modelos murinos [146]. Sin embargo, es importante mencionar, que no solo las células inmunes intratumorales son capaces de expresar los TLRs, sino que las células tumorales también pueden hacerlo y el efecto resultante parece depender del tipo celular y del subtipo de TLR expresado [147]. Mientras los agonistas de TLR3, Poly I:C y TLR 7, Imiquimod, mostraron efectos antitumorales directos en diversas líneas de cáncer humano [148, 149], evidencia adicional sugiere que también los TLRs pueden contribuir a la resistencia de la célula tumoral a la apoptosis y al aumento de la invasividad [150]. En el presente trabajo, evaluamos el efecto de CpG y R848 en una población discreta de

DISCUSION

células inmunes. Nuestros resultados indican que la activación simultánea de TLR9 y TLR7/8 resulta en una activación incompleta de CDs murinas y humanas.

Si bien existe consenso sobre el patrón de expresión de TLRs en las pCD humanas, existe controversia sobre la expresión y función de TLR7 y TLR9 en las CDs mieloides humanas. Sin embargo, CDs humanas derivadas de monocitos mostraron niveles de expresión moderados [151] a altos [152] de TLR7 y TLR9, los cuales pueden ser incrementados en respuesta a infecciones virales y bacterianas [153] y, además, son capaces de responder a sus ligandos [154]. Observamos que los agonistas de TLR9 específicos de humano, CpG2006 e IMT504, ejercieron un efecto estimulatorio débil en las preparaciones de CDs humanas. Por el contrario, R848 indujo una estimulación robusta de los marcadores de co-activación, por lo cual constituye un adyuvante atractivo para vacunas de CDs humanas. La estimulación simultánea de ambos TLRs nuevamente actuó en detrimento de la activación mostrada con R848. Esos resultados sugieren que los mecanismos subyacentes a ambas vías de TLR están conservados entre ratones y humanos. Nuestros resultados indican que CpG+R848 no es una combinación recomendable para utilizar en la inmunoterapia de pacientes con cáncer. Es importante remarcar que la diferencia en el perfil de expresión de TLRs entre CDs humanas y murinas puede explicar las diferencias observadas en el efecto de CpG entre ambos grupos celulares, ya mientras que CpG resultó ser un fuerte inductor de la activación de CDs murinas, mientras que en CDs humanas no tuvo este efecto. Spranger y col han demostrado que CDs humanas estimuladas con agonistas de TLR7/8 como R848 o CL075, más agonistas de TLR3 exhibieron un perfil de CDs maduras, secretando altos niveles de IL-12 y polarizando a las células T CD4⁺ y CD8⁺ para secretar IFN- γ [155].

En concordancia con nuestros resultados, la inhibición de la activación de TLR9 inducida por agonistas de TLR7 ha sido observada también en pCDs, células B [156], PBMCs [157], microglia y astrocitos [158], aunque en estos trabajos no se realizaron ensayos funcionales *in vivo*. Si bien el *crosstalk* inhibitorio de TLR9 y TLR7 ha sido involucrado en la patogenia de las infecciones crónicas y el cáncer [159], todavía se desconocen los mecanismos subyacentes. Este efecto no parece estar relacionado con los fenómenos de competencia en la captación celular o en la unión de los ligandos al receptor [157, 160]. Aquí mostramos que en las CDs murinas la activación simultánea de

DISCUSION

TLR9 y TLR7 inhibe la activación de la vía del factor NF- κ B, el cual es necesario para la completa maduración de la CD [161]. Es bien conocido que la activación de NF- κ B resulta en la producción de IFNs, citoquinas proinflamatorias y quemoquinas que llevan la maduración de la CD, y que generan finalmente respuestas inmunes mediadas por linfocitos T citotóxicos, comunicando de este modo a la inmunidad innata con la adaptativa [162]. En concordancia, nuestros resultados muestran que en las CDs murinas, CpG aumenta la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-12 e IFN- γ , proceso que es dependiente de la vía de NF- κ B y en donde, la activación simultánea de TLR9 y TLR7 inhibe la inducción de p65-NF- κ B. Este fenómeno puede contribuir a que el fenotipo de la CD sea más inmaduro, caracterizado por menor producción de citoquinas proinflamatorias y menor expresión de marcadores de maduración como lo son la falta de inhibición de la capacidad fagocítica y la expresión reducida de CD86. Por otra parte, la falta de activación de la vía de NF- κ B puede ser la responsable de la reducción de la viabilidad de las CDs luego de la estimulación simultánea de TLR9 y TLR7. Es importante notar, que algunas de las citoquinas proinflamatorias inducidas por la activación de la vía de TLR pueden, a su vez, activar la vía de NF- κ B, lo cual promueve aún más la producción de citoquinas y quemoquinas a tiempos mayores luego de la estimulación con TLR, es decir, desencadena un sistema de retroalimentación positiva [163]. Por ejemplo, el co-tratamiento de células endoteliales con TNF- α e IFN- γ conduce a la activación persistente de NF- κ B y de la expresión génica de la subunidad κ B perteneciente al complejo NF- κ B [164].

Los mecanismos subyacentes a la inhibición de la activación de la vía de NF- κ B pueden ser varios. La proteína adaptadora MyD88 es una proteína utilizada por TLR7 y TLR9, como por la mayoría de los TLRs, para activar a NF- κ B. Ha sido propuesto que esta proteína adaptadora es un componente limitante en la vía de TLR [165]. Bagchi y col mostraron que la estimulación de vías de TLR dependientes de MyD88 pueden resultar en un detrimento de la activación de NF- κ B en macrófagos murinos derivados de MO [166]. De este modo, si se aumenta la disponibilidad de MyD88, podría mejorar la maduración de las DC tras la activación de TLR. De hecho, la transferencia de MyD88 mediante el uso de vectores lentivirales en CDs derivadas de MO, aumenta la producción de IL-6 e IL-12 así como la capacidad de estimular la proliferación de linfocitos alogeneicos [167].

DISCUSION

Otra posible explicación del efecto inhibitorio que R848 ejerce sobre la acción de CpG reside en un fenómeno de competencia que se da entre los receptores TLRs por su interacción con la proteína UNC93B1. La proteína UNC93B1 reside principalmente en el retículo endoplásmico y se asocia con TLR3, TLR7, TLR9 y TLR13, interactuando directamente con sus dominios transmembrana y mediando la translocación de los TLRs del retículo endoplásmico a los endolisosomas. Dado que TLR7 y TLR9 compiten por la asociación con UNC931, es posible que la activación simultánea de ambos receptores afecte la función de esta proteína [168].

Distintos autores han mostrado que el NO está involucrado en la regulación de la inmunidad adaptativa, afectando el balance entre las respuestas Th1/Th2 u otros procesos inmunes asociados a células T [169]. Sin embargo, el rol autocrino del NO en la función de la CD es controversial. Por un lado, los dadores de NO pueden aumentar la habilidad de las CDs para activar linfocitos T estimulados con antígenos bacterianos [170]. Por otro lado, el NO ha sido involucrado en la actividad moduladora de las CDs tolerogénicas. CDs derivadas de MO de ratones *knock out* para *iNOS2/2* no logran estimular el desarrollo de células T regulatorias [171]. Además, el agregado de NO previo a la maduración inducida por LPS en CDs humanas inhibe la secreción de IL-12 mientras aumenta la expresión y secreción de IL-23, IL-1 β e IL-6 [172]. En concordancia con estos trabajos, nosotros observamos que el bloqueo de NOS mejora la maduración *in vitro* de las CDs estimuladas con CpG, sugiriendo que la producción de NO contrarresta la maduración inducida por la activación de TLR9.

También evaluamos el papel de la enzimaIDO en la maduración de las CDs derivadas de MO. La enzimaIDO es clave en la conversión del triptófano a metabolitos de kinureninas (KYN). La deprivación de triptófano, como sus productos metabólicos, las KYN, han sido postulados como reguladores claves en la inmunidad innata y adaptativa [173]. Sin embargo, el papel de la enzimaIDO en la fisiología de la CDs aún no es bien comprendido. Ha sido propuesto que la inhibición deIDO es un mecanismo utilizado por las CDs para suprimir respuestas T efectoras [174]. En línea con estos resultados, nosotros observamos que el bloqueo deIDO mejora la maduración de la CDs mediada por CpG *in vitro*, de modo que la inhibición de esta enzima podría resultar en una vacuna antitumoral de CDs más eficiente. De hecho, el silenciamiento deIDO utilizando siARN mejoró el

DISCUSION

efecto antitumoral de vacunas de CDs en modelos murinos de cáncer [175] y en pacientes con cáncer ginecológico [176]. Es importante destacar que el bloqueo de NOS e IDO no logró revertir el bloqueo en la maduración de las CDs inducido por la estimulación dual de TLR7 y TLR9. Teniendo en cuenta que ambas enzimas pueden estar reguladas por la vía de NF- κ B [177, 178], es posible que NOS e IDO no estén apropiadamente inducidas cuando NF- κ B es inadecuadamente activado durante la activación dual de TLRs. Una representación esquemática de esta hipótesis se muestra en la **Figura 48**. Nuestros resultados indican que el bloqueo de NOS e IDO podrían ser un potencial blanco terapéutico para mejorar la maduración de CDs antitumorales.

El perfil toxicológico favorable de las vacunas de CDs y su capacidad para inducir inmunidad antitumoral en pacientes oncológicos hacen de las vacunas

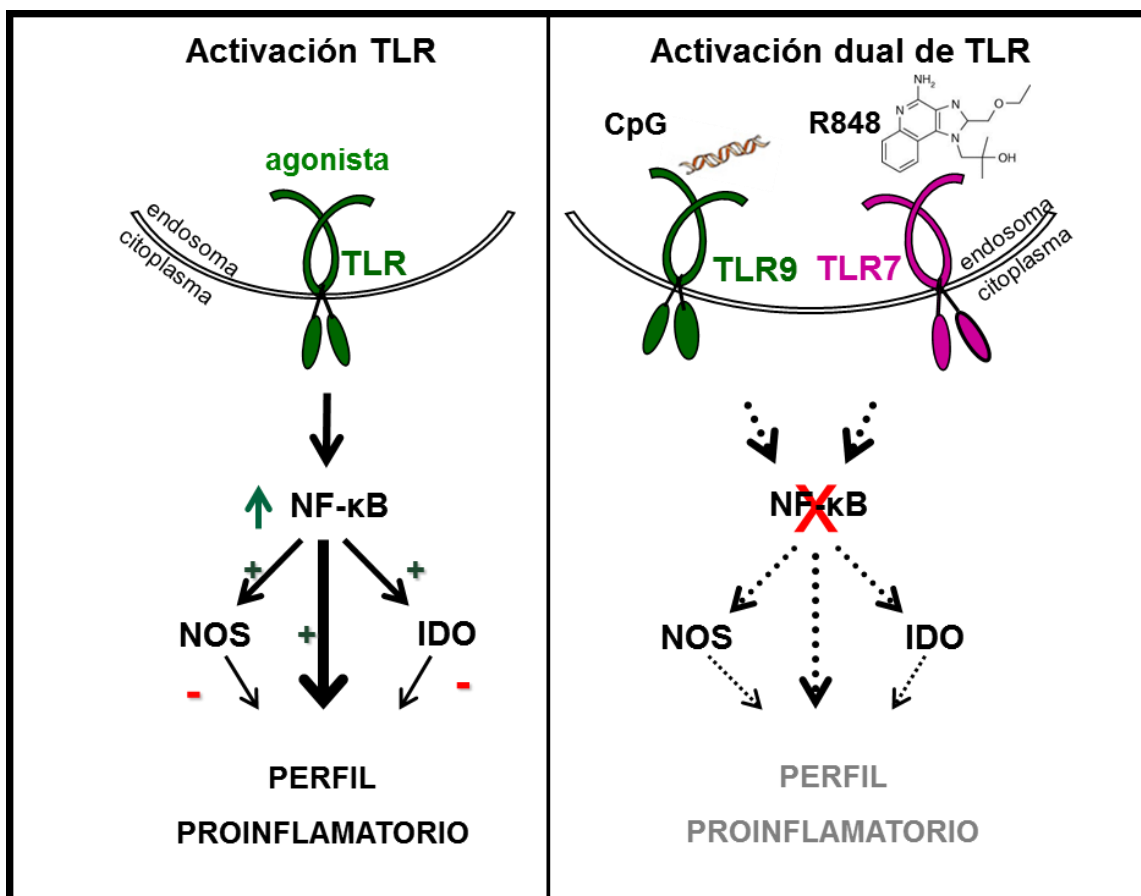


Figura 48. Esquema de los mecanismos hipotéticos involucrados en la activación simple o dual de TLR7 y 9. La estimulación de individual de los TLR7 o TLR9 activa NF- κ B (panel izquierdo), resultando en la maduración de las CDs humanas o murinas, respectivamente. La inducción concomitante de las vías de NOS e IDO reduce la activación de las CDs, por lo que estas enzimas son posibles blancos terapéuticos para aumentar la eficacia de las vacunas antitumorales de CDs. La estimulación concomitante de ambos TLRs reduce la maduración de las CDs (panel derecho), probablemente mediante un mecanismo que bloquea la correcta activación de la vía de NF- κ B. Por ello, es probable que el bloqueo de NOS e IDO no logra restaurar la maduración de las CDs luego de la activación dual de los TLR7 y 9.

DISCUSION

antitumorales una modalidad terapéutica prometedora [143]. Los ensayos clínicos con vacunas de CDs indican que las mismas inducen inmunidad antitumoral en los pacientes con cáncer, aunque esta respuesta es insuficiente para lograr un beneficio clínico significativo. Ha sido descrito que el microambiente tumoral inmunosupresor, caracterizado por un alto contenido de citoquinas anti-inflamatorias y expresión de ligandos de checkpoints inmunológicos y otras proteínas inmunosupresoras, induce la expansión e infiltración intratumoral de Tregs y otras células supresoras [179, 180]. Actualmente existe evidencia de que la relativamente baja eficacia clínica de las vacunas antitumorales está relacionada al hecho de que las mismas promueven no sólo la expansión de linfocitos T efectores antitumorales, sino también la expansión de Tregs y otras células [181]. De hecho, nuestros resultados indican que si bien la vacunación profiláctica con CDs activadas con CpG inhibe el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis, la administración de las vacunas terapéuticas a ratones con tumores establecidos no generó un beneficio clínico. Por ello es importante combinar las vacunas con estrategias que mejoren la respuesta inmune antitumoral.

Uno de los principales desafíos de las inmunoterapias actuales es lograr la especificidad de la terapia. A diferencia de los marcadores de superficie de las Tregs, como lo es CD25 (IL-2R α), que puede ser expresado también por linfocitos T efectores durante su activación [45], Foxp3 se expresa específicamente en las Tregs dentro del sistema inmune. La administración del péptido penetrante de membranas, P60, que bloquea la traslocación de Foxp3 al núcleo inhibió la expansión de Tregs esplénicas y tumorales inducida por la vacunación con CDs en nuestro modelo de carcinoma mamario murino LM3 [53]. De hecho, la administración de P60 aumentó significativamente la eficacia antitumoral de las vacunas de CDs en ambos modelos de cáncer de mama.

Una ventaja adicional del bloqueo específico de Tregs utilizando P60 es que este péptido bloquea la función de las células en lugar de depletarlas [53]. Ha sido observado que la depleción de Tregs es neutralizada por la conversión de células CD4⁺ a CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ al cabo de 2 semanas, sugiriendo un mecanismo homeostático, donde rápidamente se recupera el estado de tolerancia inmune [97]. La producción TGF- β en el microambiente tumoral por parte de las células tumorales o células inmunosupresoras y la estimulación antigénica subóptima en el tumor favorecen la conversión periférica de

DISCUSION

linfocitos T hacia Tregs. Estos dos fenómenos ocurren de manera simultánea en el tumor: la presentación antigénica es pobre, debido a que los antígenos son poco inmunogénicos, y el TGF- β se encuentra disponible todo el tiempo [182]. Han sido propuestas otras terapias para bloquear la función de Tregs, como el bloqueo deIDO o TGF- β , que aún necesitan ser exploradas en profundidad.

Además de favorecer la eficacia de las vacunas antitumorales, observamos que la monoterapia con P60 tuvo efectos antitumorales en todos los modelos evaluados. En los modelos inmunocompetentes este efecto podría ser explicado por el bloqueo de Tregs basales, Sin embargo, también observamos un efecto antitumoral de P60 en los ratones *nude*, que carecen de Tregs [133]. Nuestros resultados indican que el bloqueo de Foxp3 presente en las células tumorales tiene efectos inhibitorios sobre la proliferación y la viabilidad de estas células, resultando en una reducción del crecimiento tumoral *in vivo*. Sin embargo, a pesar de que el bloqueo de Foxp3 tiene efectos antitumorales directos, inhibiendo el crecimiento tumoral en todos los modelos evaluados, P60 sólo mejoró la supervivencia de los animales inmunocompetentes portadores de tumores, sugiriendo que para una mayor eficacia de la terapia es necesaria la intervención del sistema inmune.

En los últimos años la expresión de Foxp3 ha sido reportada en distintos tipos de células tumorales y especímenes de cáncer. Aunque existe bastante consenso con respecto al papel de Foxp3 en la glándula mamaria normal, adonde Foxp3 parece actuar como supresor de los oncogenes Her-2, SPK2 y BRAC1 [183, 184], la función de Foxp3 en células tumorales es motivo de gran controversia. Distintos autores han propuesto roles opuestos para Foxp3 en la célula tumoral. Por un lado, estudios *in vitro* y en modelos murinos sugieren que Foxp3 cumple un papel crítico como supresor tumoral en carcinomas de mama, próstata y ovario [131]. Sin embargo, la expresión de Foxp3 en células tumorales también ha sido postulada como un mecanismo que favorece la progresión de diversos tipos de tumores. La expresión de Foxp3 correlaciona con el crecimiento tumoral en modelos preclínicos de melanoma [184]. Además, la inhibición transcripcional de Foxp3 en células de melanoma reduce el crecimiento tumoral e inhibe la formación del microambiente inmunosupresor [185]. Asimismo, la expresión de Foxp3 en células de carcinoma de páncreas ha sido involucrada en el efecto inmunosupresor de estas células sobre los linfocitos T efectores [186]. Por otra parte, los estudios

DISCUSION

inmunohistoquímicos de biopsias de carcinoma humano, sugieren una fuerte asociación entre la expresión de Foxp3 en las células tumorales con menor supervivencia de los pacientes [187]. Cuando evaluamos la expresión de Foxp3 en las células tumorales murinas detectamos que las líneas LM3 y 4T1 expresan Foxp3, siendo la intensidad de expresión mayor en LM3 que en 4T1. La relevancia de la expresión de Foxp3 en estas líneas quedó demostrada cuando observamos que el bloqueo con P60 disminuye la viabilidad y la proliferación en las células LM3, pero no afecta a las células 4T1. Otros autores, mostraron que la expresión de Foxp3 en biopsias de tumores de mama está asociada con una peor probabilidad de supervivencia global, además, a mayor intensidad de expresión de Foxp3 en células tumorales, mayor el riesgo de mortalidad [188]. Los mismos autores sugieren que existe una correlación entre la expresión de Foxp3 y el desarrollo de metástasis, de modo que la expresión de Foxp3 podría estar relacionada con el potencial metastásico del tumor y no a la supresión de una respuesta inmune específica [188]. Además, la expresión de Foxp3 en células tumorales se asoció significativamente a un menor tiempo libre de recurrencia en pacientes con carcinoma mamario triple negativo [189]. Por otro lado, otros autores sugieren que la localización de Foxp3, nuclear o citoplasmática, determina en última instancia si este factor de transcripción es indicador de buen o mal pronóstico de supervivencia en los pacientes [130]. La localización diferencial de este factor de transcripción en las diferentes líneas podría estar involucrada en la respuesta diferencial que tienen las mismas cuando se incuban con el péptido bloqueante P60. En contraposición a nuestros resultados, en biopsias de tumores de mama primarios, la localización subcelular de Foxp3 resultó heterogénea en las células tumorales (31% citoplasmática; 26% nuclear; 6% ambas) y si bien la localización citoplasmática fue asociada a peor supervivencia global, Foxp3 nuclear demostró una asociación significativa con una mejor supervivencia [130].

Las células tumorales parecen asemejarse a las Tregs en cuanto a su expresión de Foxp3 y su capacidad de secretar IL-10, una de las principales citoquinas inmunosupresoras. En las células LM3 la secreción de IL-10 fue inhibida cuando Foxp3 fue bloqueado por P60. En líneas tumorales humanas de cáncer de colon, mama, melanoma, leucemia eritroide aguda ha sido descrita la expresión de Foxp3 en niveles que correlacionaron con los niveles de expresión de la citoquina inmunosupresora IL-10 y TGF- β 1 [131]. Es interesante mencionar que Hinz y col mostraron que líneas celulares

DISCUSION

de páncreas humanas no sólo expresan Foxp3, sino que son capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T anti-CD3/anti-CD28-activados [186]. Todos estos resultados sugieren que las células tumorales pueden actuar en forma similar a Tregs.

TGF- β es un potente inductor de Foxp3 en Tregs [182]. Nuestros resultados indican que este factor de crecimiento también induce la expresión de Foxp3 en células tumorales. Efectos similares fueron observados en células de carcinoma de páncreas, en las cuales la expresión de Foxp3 es estimulada por TGF- β 1 [186]. Dado que TGF- β es producido en altos niveles en el microambiente tumoral, es probable que favorezca la expresión de Foxp3 *in vivo* no sólo en Tregs, sino también en células tumorales. La rapamicina, el inhibidor de la vía de mTOR, es un agente inmunosupresor que ha sido utilizado para prevenir el rechazo a trasplantes en humanos. En células T CD4+ incubadas con anti-CD3/CD28 en presencia de rapamicina, ha sido observada la expansión de Treg tanto murinas como humanas, por un mecanismo que aún no es comprendido por completo [190]. En concordancia, nuestros resultados muestran que la incubación de las células LM3 con rapamicina también induce la expresión de Foxp3+. Algo similar ocurre con las prostaglandinas (PGE2), que han sido postuladas como mecanismo de diferenciación de células Tregs. El tratamiento con PGE2 aumenta la expresión de Foxp3 en células CD4+CD25+ en reposo [191]. La enzima ciclooxigenasa inducible (Cox 2) tiene como función procesar al ácido araquidónico a prostaglandinas. La inhibición de la vía de Cox con indometacina, disminuyó la expresión de Foxp3 en la línea celular LM3. Es interesante que los mecanismos de regulación de Foxp3 parecen estar conservados en la línea celular LM3 respecto a las células T regulatorias.

Con el objeto de evaluar el valor traslacional de estas observaciones evaluamos la expresión de Foxp3 en tres líneas humanas, las células de tumor de mama MCF7 y MDA-MB-231 y la línea no tumoral de epitelio mamario MCF10. Sólo la línea MCF7 resultó positiva para Foxp3. Karanikas y col también demostraron expresión de Foxp3 en esta línea, y más aún, mostraron que los niveles de ARNm para Foxp3 correlacionan con la expresión del ARNm de TGF- β 1y de IL-10 [131]. La incubación de MCF7 con el péptido bloqueante P60 disminuyó la viabilidad de las células MCF7, sin afectar a las células MDA-MB-231, negativas para Foxp3. Es importante destacar, aunque la expresión

DISCUSION

de Foxp3 ha sido reportada en glándula mamaria normal [184], no observamos expresión de Foxp3 en la línea de epitelio mamario no tumoral MCF10.

Aunque se necesitan más estudios acerca del rol de Foxp3 en las células tumorales para dilucidar los motivos de las discrepancias actuales, el hecho de que la célula tumoral pueda expresar Foxp3 tiene al menos dos implicancias importantes. La primera, es que es necesario tener precaución cuando se analiza la expresión de Foxp3 en los tumores. El aumento de los niveles ARNm de Foxp3 puede no deberse a un influjo de Tregs, sino también a un aumento en la expresión de Foxp3 por la célula tumoral. La segunda es que las terapias dirigidas a modular la función o expresión de Foxp3 no sólo involucran a las Tregs, sino que también pueden afectar a las células tumorales que expresen Foxp3, cuyo efecto parece depender del tipo tumoral [192]. Además, las drogas diseñadas para bloquear Foxp3 deben ser capaces de penetrar el microambiente tumoral, lo cual es un desafío aun mayor que bloquear sólo las Tregs de la periferia [192].

Existe un consenso general de que las vacunas de CDs inducen respuestas inmunes antitumorales de larga duración. Estas vacunas han mostrado modestos beneficios clínicos, por ejemplo la vacuna Sipuleucel-T aumenta la media de supervivencia en 4 meses en pacientes con cáncer de próstata [145]. Muchos factores pueden estar limitando la eficacia terapéutica de estas vacunas, uno de ellos es la presencia de células Tregs. En el presente trabajo demostramos que el bloqueo de Foxp3 aumenta la eficacia de la terapia en modelos murinos de carcinoma de mama. Queda por evaluar las posibles lesiones autoinmunes que pueden desarrollarse cuando se realiza el bloqueo sistémico de Tregs.

Si bien nuestros resultados revelan la eficacia preclínica de P60 sistémico, la utilización de péptidos en la clínica resulta, muchas veces, dificultosa por la cantidad de péptido necesario para lograr un efecto sistémico, debido a la rápida degradación de los mismos. Un modo posible para mejorar el tratamiento con el péptido P60 y evitar el bloqueo sistémico de todas las células regulatorias es el uso de vectores de terapia génica, los cuales permitirían el bloqueo local de Foxp3 en el microambiente tumoral. Nosotros demostramos que pueden desarrollarse vectores para lograr la expresión intracelular del péptido en la célula trasducida, y que esta estrategia tendría un efecto *bystander* en células vecinas, tumorales o Tregs, que expresen Foxp3. La terapia de bloqueo de Foxp3 con P60

DISCUSION

tiene un beneficio dual para aquellos tumores que expresen Foxp3. Es importante mencionar que los protocolos convencionales de los tratamientos oncológicos actuales incluyen la resección quirúrgica del tumor, lo cual abre una ventana posible para la administración local de los vectores terapéuticos.

CONCLUSIONES

- Los modelos murinos LM3 y 4T1 son modelos apropiados para la evaluación preclínica de inmunoterapias que involucren la modulación de Tregs.
- La activación simultánea de TLR7 y TLR9 inhibe la activación de NF- κ B, reduciendo la maduración y el efecto antitumoral de las CDs.
- Dado que la viabilidad de las CDs maduras se reduce con el tiempo de incubación, es importante que las vacunas antitumorales de CDs sean activadas al momento de su administración *in vivo*.
- Nuestras observaciones sugieren que aunque exista efecto antitumoral, la memoria inmunológica puede no inducirse si la maduración de las vacunas de CDs es insuficiente.
- Estos resultados sugieren que NOS e IDO son blancos terapéuticos potenciales para mejorar la maduración de las vacunas antitumorales de CDs.
- La expresión de Foxp3 en células tumorales favorecería la supervivencia de estas células y el mantenimiento del microambiente tumoral inmunosupresor.
- El bloqueo de Foxp3 reduce la expansión de Tregs, mejora la eficacia de la vacunación antitumoral y tiene efecto antitumoral directo en células tumorales murinas y humanas que expresan Foxp3.
- La utilización de vectores de terapia génica podría mejorar la disponibilidad local de P60 y aumentar la eficacia de la terapia.
- El bloqueo de Foxp3 podría tener un efecto antitumoral dual útil para el tratamiento del carcinoma de mama Foxp3 positivo.

REFERENCIAS

1. Tao, J.J., K. Visvanathan, and A.C. Wolff, *Long term side effects of adjuvant chemotherapy in patients with early breast cancer*. *Breast*, 2015. **24 Suppl 2**: p. S149-53.
2. Colleoni, M., et al., *Annual Hazard Rates of Recurrence for Breast Cancer During 24 Years of Follow-Up: Results From the International Breast Cancer Study Group Trials I to V*. *J Clin Oncol*, 2016. **34(9)**: p. 927-35.
3. Kayl, A.E. and C.A. Meyers, *Side-effects of chemotherapy and quality of life in ovarian and breast cancer patients*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2006. **18(1)**: p. 24-8.
4. Couzin-Frankel, J., *Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy*. *Science*, 2013. **342(6165)**: p. 1432-3.
5. Schenten, D. and R. Medzhitov, *The control of adaptive immune responses by the innate immune system*. *Adv Immunol*, 2011. **109**: p. 87-124.
6. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4(7)**: p. 499-511.
7. Jurk, M., et al., *Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848*. *Nat Immunol*, 2002. **3(6)**: p. 499.
8. Hemmi, H., et al., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. *Nat Immunol*, 2002. **3(2)**: p. 196-200.
9. Demaria, O., et al., *TLR8 deficiency leads to autoimmunity in mice*. *J Clin Invest*, 2010. **120(10)**: p. 3651-62.
10. Tran, N.L., C. Manzin-Lorenzi, and M.L. Santiago-Raber, *Toll-like receptor 8 deletion accelerates autoimmunity in a mouse model of lupus through a Toll-like receptor 7-dependent mechanism*. *Immunology*, 2015. **145(1)**: p. 60-70.
11. Gorden, K.K., et al., *Cutting edge: activation of murine TLR8 by a combination of imidazoquinoline immune response modifiers and polyT oligodeoxynucleotides*. *J Immunol*, 2006. **177(10)**: p. 6584-7.
12. Desnues, B., et al., *TLR8 on dendritic cells and TLR9 on B cells restrain TLR7-mediated spontaneous autoimmunity in C57BL/6 mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111(4)**: p. 1497-502.

13. Klinman, D.M., K.M. Barnhart, and J. Conover, *CpG motifs as immune adjuvants*. *Vaccine*, 1999. **17**(1): p. 19-25.
14. Bode, C., et al., *CpG DNA as a vaccine adjuvant*. *Expert Rev Vaccines*, 2011. **10**(4): p. 499-511.
15. Hernandez, A., et al., *Inhibition of NF-kappa B during human dendritic cell differentiation generates anergy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches*. *Hum Immunol*, 2007. **68**(9): p. 715-29.
16. Dempsey, P.W., S.A. Vaidya, and G. Cheng, *The art of war: Innate and adaptive immune responses*. *Cell Mol Life Sci*, 2003. **60**(12): p. 2604-21.
17. Chaplin, D.D., 1. *Overview of the human immune response*. *J Allergy Clin Immunol*, 2006. **117**(2 Suppl Mini-Primer): p. S430-5.
18. Nurieva, R., J. Wang, and A. Sahoo, *T-cell tolerance in cancer*. *Immunotherapy*, 2013. **5**(5): p. 513-31.
19. Merad, M., et al., *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**: p. 563-604.
20. Satthaporn, S. and O. Eremin, *Dendritic cells (I): Biological functions*. *J R Coll Surg Edinb*, 2001. **46**(1): p. 9-19.
21. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 271-96.
22. Chung, C.Y., et al., *Dendritic cells: cellular mediators for immunological tolerance*. *Clin Dev Immunol*, 2013. **2013**: p. 972865.
23. Schijns, V., et al., *Immune adjuvants as critical guides directing immunity triggered by therapeutic cancer vaccines*. *Cytotherapy*, 2014. **16**(4): p. 427-39.
24. Thompson, A.G. and R. Thomas, *Induction of immune tolerance by dendritic cells: implications for preventative and therapeutic immunotherapy of autoimmune disease*. *Immunol Cell Biol*, 2002. **80**(6): p. 509-19.
25. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. *Science*, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
26. Monjazeb, A.M., et al., *Immunoediting and antigen loss: overcoming the achilles heel of immunotherapy with antigen non-specific therapies*. *Front Oncol*, 2013. **3**: p. 197.

27. Oleinika, K., et al., *Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression*. Clin Exp Immunol, 2013. **171**(1): p. 36-45.
28. Medler, T.R., T. Cotechini, and L.M. Coussens, *Immune response to cancer therapy: mounting an effective antitumor response and mechanisms of resistance*. Trends Cancer, 2015. **1**(1): p. 66-75.
29. Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman, *How regulatory T cells work*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(7): p. 523-32.
30. Zhang, H.Y., et al., *Mechanisms underlying the activity-dependent regulation of locomotor network performance by the Na⁺ pump*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16188.
31. Adeegbe, D.O. and H. Nishikawa, *Natural and induced T regulatory cells in cancer*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 190.
32. Rudensky, A.Y., *Regulatory T cells and Foxp3*. Immunol Rev, 2011. **241**(1): p. 260-8.
33. Kitoh, A., et al., *Indispensable role of the Runx1-Cbfbeta transcription complex for in vivo suppressive function of FoxP3⁺ regulatory T cells*. Immunity, 2009. **31**(4): p. 609-20.
34. Xie, X., et al., *The Regulatory T Cell Lineage Factor Foxp3 Regulates Gene Expression through Several Distinct Mechanisms Mostly Independent of Direct DNA Binding*. PLoS Genet, 2015. **11**(6): p. e1005251.
35. Shen, Z., et al., *Transcriptional regulation of Foxp3 gene: multiple signal pathways on the road*. Med Res Rev, 2009. **29**(5): p. 742-66.
36. Li, Z., et al., *FOXP3⁺ regulatory T cells and their functional regulation*. Cell Mol Immunol, 2015. **12**(5): p. 558-65.
37. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in cancer immunotherapy*. Curr Opin Immunol, 2014. **27**: p. 1-7.
38. Rech, A.J. and R.H. Vonderheide, *Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1174**: p. 99-106.
39. Morse, M.A., et al., *Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines*. Blood, 2008. **112**(3): p. 610-8.
40. Dannull, J., et al., *Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(12): p. 3623-33.

41. Mahnke, K., et al., *Depletion of CD4+CD25+ human regulatory T cells in vivo: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro*. International journal of cancer. Journal international du cancer, 2007. **120**(12): p. 2723-33.
42. Candolfi, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells in the tumor microenvironment: immune targets for glioma therapeutics*. Neoplasia, 2012. **14**(8): p. 757-70.
43. Jacobs, J.F., et al., *Dendritic cell vaccination in combination with anti-CD25 monoclonal antibody treatment: a phase I/II study in metastatic melanoma patients*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2010. **16**(20): p. 5067-78.
44. Yi, H., et al., *The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells*. Cell Mol Immunol, 2006. **3**(3): p. 189-95.
45. Curtin, J.F., et al., *Treg depletion inhibits efficacy of cancer immunotherapy: implications for clinical trials*. PLoS One, 2008. **3**(4): p. e1983.
46. Wing, K., et al., *Characterization of human CD25+ CD4+ T cells in thymus, cord and adult blood*. Immunology, 2002. **106**(2): p. 190-9.
47. Jacob, J.B., et al., *Tumor regression following DNA vaccination and regulatory T cell depletion in neu transgenic mice leads to an increased risk for autoimmunity*. Journal of immunology, 2009. **182**(9): p. 5873-81.
48. Jacob, J.B., et al., *Control of Her-2 tumor immunity and thyroid autoimmunity by MHC and regulatory T cells*. Cancer research, 2007. **67**(14): p. 7020-7.
49. Mougiakakos, D., et al., *Regulatory T cells in cancer*. Adv Cancer Res, 2010. **107**: p. 57-117.
50. King, G.D., et al., *Combined Flt3L/TK gene therapy induces immunological surveillance which mediates an immune response against a surrogate brain tumor neoantigen*. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 2011. **19**(10): p. 1793-801.
51. Mineharu, Y., et al., *Gene Therapy-Mediated Reprogramming Tumor Infiltrating T Cells Using IL-2 and Inhibiting NF-kappaB Signaling Improves the Efficacy of Immunotherapy in a Brain Cancer Model*. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2012.

52. Morris, M.C., et al., *Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics*. Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization, 2008. **100**(4): p. 201-17.
53. Casares, N., et al., *A peptide inhibitor of FOXP3 impairs regulatory T cell activity and improves vaccine efficacy in mice*. Journal of immunology, 2010. **185**(9): p. 5150-9.
54. Schuster, M., A. Nechansky, and R. Kircheis, *Cancer immunotherapy*. Biotechnol J, 2006. **1**(2): p. 138-47.
55. DV, Y., et al., *Immunotherapy of Cancer*. Sovremennye Tehnologii v Medicine, 2016. **8**(1).
56. Sadelain, M., *Chimeric antigen receptors: driving immunology towards synthetic biology*. Curr Opin Immunol, 2016. **41**: p. 68-76.
57. Ramos, C.A., B. Savoldo, and G. Dotti, *CD19-CAR trials*. Cancer J, 2014. **20**(2): p. 112-8.
58. Almasbak, H., T. Aarvak, and M.C. Vemuri, *CAR T Cell Therapy: A Game Changer in Cancer Treatment*. J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 5474602.
59. Morgan, R.A., et al., *Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ERBB2*. Mol Ther, 2010. **18**(4): p. 843-51.
60. Zhu, Y., S.H. Choi, and K. Shah, *Multifunctional receptor-targeting antibodies for cancer therapy*. Lancet Oncol, 2015. **16**(15): p. e543-54.
61. Hansel, T.T., et al., *The safety and side effects of monoclonal antibodies*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(4): p. 325-38.
62. Bertrand, A., et al., *Immune related adverse events associated with anti-CTLA-4 antibodies: systematic review and meta-analysis*. BMC Med, 2015. **13**: p. 211.
63. Scott, A.M., J.D. Wolchok, and L.J. Old, *Antibody therapy of cancer*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 278-87.
64. Hemmerle, T. and D. Neri, *The antibody-based targeted delivery of interleukin-4 and 12 to the tumor neovasculature eradicates tumors in three mouse models of cancer*. Int J Cancer, 2014. **134**(2): p. 467-77.
65. Baldo, B.A., *Side effects of cytokines approved for therapy*. Drug Saf, 2014. **37**(11): p. 921-43.

- 66.Sharma, P. and J.P. Allison, *Immune checkpoint targeting in cancer therapy: toward combination strategies with curative potential*. Cell, 2015. **161**(2): p. 205-14.
- 67.Lazoura, E. and V. Apostolopoulos, *Insights into peptide-based vaccine design for cancer immunotherapy*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(13): p. 1481-94.
- 68.Lazoura, E. and V. Apostolopoulos, *Rational Peptide-based vaccine design for cancer immunotherapeutic applications*. Current medicinal chemistry, 2005. **12**(6): p. 629-39.
- 69.Toh, H.C., et al., *Clinical Benefit of Allogeneic Melanoma Cell Lysate-Pulsed Autologous Dendritic Cell Vaccine in MAGE-Positive Colorectal Cancer Patients*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2009. **15**(24): p. 7726-7736.
- 70.Avigan, D., et al., *Fusion cell vaccination of patients with metastatic breast and renal cancer induces immunological and clinical responses*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2004. **10**(14): p. 4699-708.
- 71.Asavaroengchai, W., Y. Kotera, and J.J. Mule, *Tumor lysate-pulsed dendritic cells can elicit an effective antitumor immune response during early lymphoid recovery*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(2): p. 931-6.
- 72.Ashley, D.M., et al., *Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors*. The Journal of experimental medicine, 1997. **186**(7): p. 1177-82.
- 73.Park, J.W., et al., *Treatment with autologous antigen-presenting cells activated with the HER-2 based antigen Lapuleucel-T: results of a phase I study in immunologic and clinical activity in HER-2 overexpressing breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2007. **25**(24): p. 3680-7.
- 74.Liau, L.M., et al., *Treatment of a patient by vaccination with autologous dendritic cells pulsed with allogeneic major histocompatibility complex class I-matched tumor peptides*. Case Report. Neurosurgical focus, 2000. **9**(6): p. e8.
- 75.Cheever, M.A. and C.S. Higano, *PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(11): p. 3520-6.
- 76.Pedersen, A.E. and F. Ronchese, *CTLA-4 blockade during dendritic cell based booster vaccination influences dendritic cell survival and CTL expansion*. Journal of immune based therapies and vaccines, 2007. **5**: p. 9.

77. Vasir, B., et al., *Fusions of dendritic cells with breast carcinoma stimulate the expansion of regulatory T cells while concomitant exposure to IL-12, CpG oligodeoxynucleotides, and anti-CD3/CD28 promotes the expansion of activated tumor reactive cells.* Journal of immunology, 2008. **181**(1): p. 808-21.
78. Napolitani, G., et al., *Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells.* Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 769-76.
79. Stier, S., et al., *Combinations of TLR ligands: a promising approach in cancer immunotherapy.* Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 271246.
80. Soliman, H., *Immunotherapy strategies in the treatment of breast cancer.* Cancer Control, 2013. **20**(1): p. 17-21.
81. Dushyanthen, S., et al., *Relevance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer.* BMC Med, 2015. **13**: p. 202.
82. Disis, M.L. and S.E. Stanton, *Triple-negative breast cancer: immune modulation as the new treatment paradigm.* Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2015: p. e25-30.
83. Tsavaris, N., et al., *Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes.* Br J Cancer, 2002. **87**(1): p. 21-7.
84. Demaria, S., et al., *Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2001. **7**(10): p. 3025-30.
85. Perez, E.A., et al., *Sequential versus concurrent trastuzumab in adjuvant chemotherapy for breast cancer.* J Clin Oncol, 2011. **29**(34): p. 4491-7.
86. EA, M. and H. KK, *Breast Cancer Immunotherapy: Is It ready for prime time?* American Journal of Hematology / Oncology, 2015. **11**(0).
87. Urtreger, A., et al., *Modulation of fibronectin expression and proteolytic activity associated with the invasive and metastatic phenotype in two new murine mammary tumor cell lines.* Int J Oncol, 1997. **11**(3): p. 489-96.
88. Daroqui, C.M., et al., *Regulation of galectin-1 expression by transforming growth factor beta1 in metastatic mammary adenocarcinoma cells: implications for tumor-immune escape.* Cancer Immunol Immunother, 2007. **56**(4): p. 491-9.
89. de Matos, D.C., et al., *Immunological response in mice bearing LM3 breast tumor undergoing pulchellin treatment.* BMC Complement Altern Med, 2012. **12**: p. 107.

90. Denkert, C., *The immunogenicity of breast cancer--molecular subtypes matter*. *Ann Oncol*, 2014. **25**(8): p. 1453-5.
91. Kalathil, S.G. and Y. Thanavala, *High immunosuppressive burden in cancer patients: a major hurdle for cancer immunotherapy*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(7): p. 813-9.
92. He, Y., et al., *The roles of regulatory B cells in cancer*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 215471.
93. Papatriantafyllou, M., *Tumour immunology: Pro-metastatic T(Reg) cells get RANKed*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(4): p. 236-7.
94. Xu, L., et al., *Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer*. *Clin Immunol*, 2010. **135**(3): p. 466-75.
95. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. *Cancer Res*, 1992. **52**(6): p. 1399-405.
96. Pulaski, B.A. and S. Ostrand-Rosenberg, *Mouse 4T1 breast tumor model*. *Curr Protoc Immunol*, 2001. **Chapter 20**: p. Unit 20 2.
97. Valzasina, B., et al., *Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent*. *Cancer Res*, 2006. **66**(8): p. 4488-95.
98. Butterfield, L.H., *Dendritic Cells in Cancer Immunotherapy Clinical Trials: Are We Making Progress?* *Frontiers in immunology*, 2013. **4**: p. 454.
99. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. *J Immunol Methods*, 1999. **223**(1): p. 77-92.
100. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *The Journal of experimental medicine*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
101. Brasel, K., et al., *Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures*. *Blood*, 2000. **96**(9): p. 3029-39.

102. Kaczanowska, S., A.M. Joseph, and E. Davila, *TLR agonists: our best frenemy in cancer immunotherapy*. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(6): p. 847-63.
103. Shirota, H., D. Tross, and D.M. Klinman, *CpG Oligonucleotides as Cancer Vaccine Adjuvants*. *Vaccines (Basel)*, 2015. **3**(2): p. 390-407.
104. Vasilakos, J.P. and M.A. Tomai, *The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants*. *Expert Rev Vaccines*, 2013. **12**(7): p. 809-19.
105. Pozzi, L.A., J.W. Maciaszek, and K.L. Rock, *Both dendritic cells and macrophages can stimulate naive CD8 T cells in vivo to proliferate, develop effector function, and differentiate into memory cells*. *Journal of immunology*, 2005. **175**(4): p. 2071-81.
106. Lang, T.J., et al., *In vivo CD86 blockade inhibits CD4+ T cell activation, whereas CD80 blockade potentiates CD8+ T cell activation and CTL effector function*. *Journal of immunology*, 2002. **168**(8): p. 3786-92.
107. Athie-Morales, V., et al., *Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development*. *Journal of immunology*, 2004. **172**(1): p. 61-9.
108. Bradley, L.M., D.K. Dalton, and M. Croft, *A direct role for IFN-gamma in regulation of Th1 cell development*. *Journal of immunology*, 1996. **157**(4): p. 1350-8.
109. Mitchell, L.M., et al., *Distinct responses of splenic dendritic cell subsets to infection with *Listeria monocytogenes*: maturation phenotype, level of infection, and T cell priming capacity ex vivo*. *Cell Immunol*, 2011. **268**(2): p. 79-86.
110. Itakura, E., et al., *IL-10 expression by primary tumor cells correlates with melanoma progression from radial to vertical growth phase and development of metastatic competence*. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 2011. **24**(6): p. 801-9.
111. Wang, R., et al., *Increased IL-10 mRNA expression in tumor-associated macrophage correlated with late stage of lung cancer*. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 2011. **30**: p. 62.
112. Platt, C.D., et al., *Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(9): p. 4287-92.
113. Adler, H.S., et al., *Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells*. *Journal of immunology*, 2010. **184**(11): p. 6025-34.

114. Paolucci, C., et al., *Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway*. *Journal of leukocyte biology*, 2003. **73**(2): p. 253-62.
115. Powell, T.J., et al., *Rat bone marrow-derived dendritic cells, but not ex vivo dendritic cells, secrete nitric oxide and can inhibit T-cell proliferation*. *Immunology*, 2003. **109**(2): p. 197-208.
116. Soliman, H., M. Mediavilla-Varela, and S. Antonia, *Indoleamine 2,3-dioxygenase: is it an immune suppressor?* *Cancer J*, 2010. **16**(4): p. 354-9.
117. Park, M.J., et al., *A distinct tolerogenic subset of splenic IDO(+)CD11b(+) dendritic cells from orally tolerized mice is responsible for induction of systemic immune tolerance and suppression of collagen-induced arthritis*. *Cell Immunol*, 2012. **278**(1-2): p. 45-54.
118. Yang, J., et al., *Tolerogenic splenic IDO (+) dendritic cells from the mice treated with induced-Treg cells suppress collagen-induced arthritis*. *J Immunol Res*, 2014. **2014**: p. 831054.
119. Mellor, A.L., et al., *Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling*. *J Immunol*, 2005. **175**(9): p. 5601-5.
120. Hou, D.Y., et al., *Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells by stereoisomers of 1-methyl-tryptophan correlates with antitumor responses*. *Cancer Res*, 2007. **67**(2): p. 792-801.
121. Karin, M. and A. Lin, *NF-kappaB at the crossroads of life and death*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(3): p. 221-7.
122. Mori, N., et al., *Bay 11-7082 inhibits transcription factor NF-kappaB and induces apoptosis of HTLV-I-infected T-cell lines and primary adult T-cell leukemia cells*. *Blood*, 2002. **100**(5): p. 1828-34.
123. Gupta, S.C., et al., *Inhibiting NF-kappaB activation by small molecules as a therapeutic strategy*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1799**(10-12): p. 775-87.
124. Hoesel, B. and J.A. Schmid, *The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer*. *Mol Cancer*, 2013. **12**: p. 86.
125. Mac Keon, S., et al., *Dendritic cell-based vaccination in cancer: therapeutic implications emerging from murine models*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 243.

126. Rodriguez, J.M., et al., *PyNTTTTGT and CpG immunostimulatory oligonucleotides: effect on granulocyte/monocyte colony-stimulating factor (GM-CSF) secretion by human CD56+ (NK and NKT) cells*. PLoS One, 2015. **10**(2): p. e0117484.
127. Palucka, K. and J. Banchereau, *Cancer immunotherapy via dendritic cells*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 265-77.
128. Kalinski, P., et al., *Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need*. Future Oncol, 2009. **5**(3): p. 379-90.
129. Devaud, C., P.K. Darcy, and M.H. Kershaw, *Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages*. Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(9): p. 869-76.
130. Takenaka, M., et al., *FOXP3 expression in tumor cells and tumor-infiltrating lymphocytes is associated with breast cancer prognosis*. Mol Clin Oncol, 2013. **1**(4): p. 625-632.
131. Karanikas, V., et al., *Foxp3 expression in human cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 19.
132. Sato, T., et al., *Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy*. Immunol Res, 2011. **51**(2-3): p. 170-82.
133. Sun, Z., et al., *Presence of functional mouse regulatory CD4+CD25+T cells in xenogeneic neonatal porcine thymus-grafted athymic mice*. Am J Transplant, 2006. **6**(12): p. 2841-50.
134. Subik, K., et al., *The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines*. Breast Cancer (Auckl), 2010. **4**: p. 35-41.
135. Bessette, D.C., et al., *Using the MCF10A/MCF10CA1a Breast Cancer Progression Cell Line Model to Investigate the Effect of Active, Mutant Forms of EGFR in Breast Cancer Development and Treatment Using Gefitinib*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125232.
136. N'Diaye, M., et al., *Rat bone marrow-derived dendritic cells generated with GM-CSF/IL-4 or FLT3L exhibit distinct phenotypical and functional characteristics*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(3): p. 437-46.
137. Lakomy, D., et al., *Cytotoxic dendritic cells generated from cancer patients*. J Immunol, 2011. **187**(5): p. 2775-82.

138. Gervais, A., et al., *Dendritic cells are defective in breast cancer patients: a potential role for polyamine in this immunodeficiency*. *Breast Cancer Res*, 2005. **7**(3): p. R326-35.
139. de Gruijl, T.D., et al., *Whole-cell cancer vaccination: from autologous to allogeneic tumor- and dendritic cell-based vaccines*. *Cancer Immunol Immunother*, 2008. **57**(10): p. 1569-77.
140. Hus, I., et al., *Allogeneic dendritic cells pulsed with tumor lysates or apoptotic bodies as immunotherapy for patients with early-stage B-cell chronic lymphocytic leukemia*. *Leukemia*, 2005. **19**(9): p. 1621-7.
141. Weeratna, R.D., et al., *TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848)*. *Vaccine*, 2005. **23**(45): p. 5263-70.
142. Markov, O.V., et al., *Prophylactic Dendritic Cell-Based Vaccines Efficiently Inhibit Metastases in Murine Metastatic Melanoma*. *PLoS One*, 2015. **10**(9): p. e0136911.
143. Finn, O.J., *Vaccines for cancer prevention: a practical and feasible approach to the cancer epidemic*. *Cancer Immunol Res*, 2014. **2**(8): p. 708-13.
144. Pulendran, B. and R. Ahmed, *Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 849-63.
145. Sabado, R.L. and N. Bhardwaj, *Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move*. *Nature*, 2015. **519**(7543): p. 300-1.
146. Zhao, B.G., et al., *Combination therapy targeting toll like receptors 7, 8 and 9 eliminates large established tumors*. *J Immunother Cancer*, 2014. **2**: p. 12.
147. Huang, B., et al., *TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword*. *Oncogene*, 2008. **27**(2): p. 218-24.
148. Paone, A., et al., *Toll-like receptor 3 triggers apoptosis of human prostate cancer cells through a PKC-alpha-dependent mechanism*. *Carcinogenesis*, 2008. **29**(7): p. 1334-42.
149. Ahn, M.Y., et al., *Toll-like receptor 7 agonist, imiquimod, inhibits oral squamous carcinoma cells through apoptosis and necrosis*. *J Oral Pathol Med*, 2012. **41**(7): p. 540-6.
150. Ridnour, L.A., et al., *Molecular pathways: toll-like receptors in the tumor microenvironment--poor prognosis or new therapeutic opportunity*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(6): p. 1340-6.

151. Meixlsperger, S., et al., *CD141+ dendritic cells produce prominent amounts of IFN-alpha after dsRNA recognition and can be targeted via DEC-205 in humanized mice*. *Blood*, 2013. **121**(25): p. 5034-44.
152. Hoene, V., M. Peiser, and R. Wanner, *Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19*. *J Leukoc Biol*, 2006. **80**(6): p. 1328-36.
153. Saikh, K.U., et al., *Human monocytes infected with Yersinia pestis express cell surface TLR9 and differentiate into dendritic cells*. *J Immunol*, 2004. **173**(12): p. 7426-34.
154. Montoya, C.J., et al., *Activation of plasmacytoid dendritic cells with TLR9 agonists initiates invariant NKT cell-mediated cross-talk with myeloid dendritic cells*. *J Immunol*, 2006. **177**(2): p. 1028-39.
155. Spranger, S., et al., *Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075*. *J Immunol*, 2010. **185**(1): p. 738-47.
156. Berghofer, B., et al., *Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production*. *J Immunol*, 2007. **178**(7): p. 4072-9.
157. Booth, J.S., et al., *Co-stimulation with TLR7/8 and TLR9 agonists induce down-regulation of innate immune responses in sheep blood mononuclear and B cells*. *Dev Comp Immunol*, 2010. **34**(5): p. 572-8.
158. Rosenberger, K., et al., *The impact of single and pairwise Toll-like receptor activation on neuroinflammation and neurodegeneration*. *J Neuroinflammation*, 2014. **11**: p. 166.
159. Brichacek, B., et al., *Contrasting roles for TLR ligands in HIV-1 pathogenesis*. *PLoS One*, 2010. **5**(9).
160. Butchi, N.B., M. Du, and K.E. Peterson, *Interactions between TLR7 and TLR9 agonists and receptors regulate innate immune responses by astrocytes and microglia*. *Glia*, 2010. **58**(6): p. 650-64.
161. Kawasaki, N., et al., *Targeted delivery of mycobacterial antigens to human dendritic cells via Siglec-7 induces robust T cell activation*. *J Immunol*, 2014. **193**(4): p. 1560-6.
162. Ligtenberg, M.A., et al., *NF-kappaB activation during intradermal DNA vaccination is essential for eliciting tumor protective antigen-specific CTL responses*. *Hum Vaccin Immunother*, 2013. **9**(10): p. 2189-95.

163. Wan, Y., et al., *The dual functions of IL-1 receptor-associated kinase 2 in TLR9-mediated IFN and proinflammatory cytokine production.* J Immunol, 2011. **186**(5): p. 3006-14.
164. Cheshire, J.L. and A.S. Baldwin, Jr., *Synergistic activation of NF-kappaB by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon via enhanced I kappaB alpha degradation and de novo I kappaBbeta degradation.* Mol Cell Biol, 1997. **17**(11): p. 6746-54.
165. Narayanan, P., et al., *A composite MyD88/CD40 switch synergistically activates mouse and human dendritic cells for enhanced antitumor efficacy.* J Clin Invest, 2011. **121**(4): p. 1524-34.
166. Bagchi, A., et al., *MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists.* J Immunol, 2007. **178**(2): p. 1164-71.
167. Akazawa, T., et al., *Tumor immunotherapy using bone marrow-derived dendritic cells overexpressing Toll-like receptor adaptors.* FEBS Lett, 2007. **581**(18): p. 3334-40.
168. Blasius, A.L. and B. Beutler, *Intracellular toll-like receptors.* Immunity, 2010. **32**(3): p. 305-15.
169. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.
170. Paolucci, C., et al., *Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway.* J Leukoc Biol, 2003. **73**(2): p. 253-62.
171. Verinaud, L., et al., *Nitric oxide plays a key role in the suppressive activity of tolerogenic dendritic cells.* Cell Mol Immunol, 2015. **12**(3): p. 384-6.
172. Obregon, C., et al., *Nitric oxide sustains IL-1beta expression in human dendritic cells enhancing their capacity to induce IL-17-producing T-cells.* PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0120134.
173. Platten, M., et al., *Cancer Immunotherapy by Targeting IDO1/TDO and Their Downstream Effectors.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 673.
174. Gordon, J.R., et al., *Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 7.
175. Zheng, X., et al., *Silencing IDO in dendritic cells: a novel approach to enhance cancer immunotherapy in a murine breast cancer model.* Int J Cancer, 2013. **132**(4): p. 967-77.

176. Sioud, M., *Engineering better immunotherapies via RNA interference*. Hum Vaccin Immunother, 2014. **10**(11): p. 3165-74.
177. Aktan, F., *iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation*. Life Sci, 2004. **75**(6): p. 639-53.
178. Puccetti, P. and U. Grohmann, *IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(10): p. 817-23.
179. Rabinovich, G.A., D. Gabrilovich, and E.M. Sotomayor, *Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 267-96.
180. Almand, B., et al., *Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 678-89.
181. Vasir, B., et al., *Fusions of dendritic cells with breast carcinoma stimulate the expansion of regulatory T cells while concomitant exposure to IL-12, CpG oligodeoxynucleotides, and anti-CD3/CD28 promotes the expansion of activated tumor reactive cells*. J Immunol, 2008. **181**(1): p. 808-21.
182. Colombo, M.P. and S. Picconese, *Regulatory-T-cell inhibition versus depletion: the right choice in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(11): p. 880-7.
183. Recouvreux, M.S., et al., *RUNX1 and FOXP3 interplay regulates expression of breast cancer related genes*. Oncotarget, 2016. **7**(6): p. 6552-65.
184. Li, W., et al., *FOXP3 regulates sensitivity of cancer cells to irradiation by transcriptional repression of BRCA1*. Cancer Res, 2013. **73**(7): p. 2170-80.
185. Franco-Molina, M.A., et al., *Silencing of Foxp3 delays the growth of murine melanomas and modifies the tumor immunosuppressive environment*. Onco Targets Ther, 2016. **9**: p. 243-53.
186. Hinz, S., et al., *Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer*. Cancer Res, 2007. **67**(17): p. 8344-50.
187. Wolf, D., et al., *The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(23): p. 8326-31.
188. Merlo, A., et al., *FOXP3 expression and overall survival in breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(11): p. 1746-52.

189. Nair, S., et al., *Immunologic targeting of FOXP3 in inflammatory breast cancer cells*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53150.
190. Battaglia, M., et al., *Rapamycin promotes expansion of functional CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients*. J Immunol, 2006. **177**(12): p. 8338-47.
191. Mahic, M., et al., *FOXP3+CD4+CD25+ adaptive regulatory T cells express cyclooxygenase-2 and suppress effector T cells by a prostaglandin E2-dependent mechanism*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 246-54.
192. Lu, H., *FOXP3 expression and prognosis: role of both the tumor and T cells*. J Clin Oncol, 2009. **27**(11): p. 1735-6.