

Tesis Doctoral

Desarrollo de vacunas terapéuticas con células dendríticas humanas para melanoma: optimización de parámetros fenotípicos y funcionales in vitro e in vivo de la vacuna experimental CD/Apo-Nec

Pizzurro, Gabriela Andrea

2016-11-29

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:

Pizzurro, Gabriela Andrea. (2016-11-29). Desarrollo de vacunas terapéuticas con células dendríticas humanas para melanoma: optimización de parámetros fenotípicos y funcionales in vitro e in vivo de la vacuna experimental CD/Apo-Nec. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Pizzurro, Gabriela Andrea. "Desarrollo de vacunas terapéuticas con células dendríticas humanas para melanoma: optimización de parámetros fenotípicos y funcionales in vitro e in vivo de la vacuna experimental CD/Apo-Nec". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2016-11-29.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Desarrollo de vacunas terapéuticas con células dendríticas
humanas para melanoma:
Optimización de parámetros fenotípicos y funcionales *in vitro*
e *in vivo* de la vacuna experimental CD/Apo-Nec**

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

Gabriela Andrea Pizzurro

Director de Tesis: Dr. José Mordoh

Director Asistente: Dra. María Marcela Barrio

Consejero de Estudios: Dra. Edith Claudia Kordon

Lugar de Trabajo: Centro de Investigaciones Oncológicas – Fundación Cáncer

Buenos Aires, 2016

Desarrollo de vacunas terapéuticas con células dendríticas humanas para melanoma: Optimización de parámetros fenotípicos y funcionales *in vitro* e *in vivo* de la vacuna experimental CD/Apo-Nec

El presente trabajo de Tesis se centra principalmente en el estudio en profundidad y la optimización del diseño de la vacuna experimental CD/Apo-Nec para el melanoma cutáneo humano, desarrollada previamente en nuestro laboratorio.

En primer lugar, se caracterizó la interacción entre las células dendríticas y células de melanoma γ -irradiadas (Apo-Nec) durante su co-cultivo. Luego de la detección de un incremento en los cuerpos lipídicos citoplasmáticos de las células Apo-Nec post-irradiación, se determinaron sus características bioquímicas y la dinámica de su formación. El desempeño de las células dendríticas fue evaluado en presencia de distinto contenido lipídico, caracterizando la fagocitosis, el cargado antigénico y su capacidad estimuladora, en diferentes estados de maduración.

Luego, se compararon características migratorias de la vacuna *in vitro* e *in vivo* en diferentes estados de maduración. Se describió la llegada de la vacuna a los ganglios linfáticos en ratones *nude*. Junto a la respuesta quimotáctica, se determinaron los factores del sistema responsables de la motilidad y distribución de la vacuna luego de su administración por vía subcutánea.

Por último, se determinó el perfil inmunoestimulador de la vacuna, junto con su capacidad de activar clones de células T antígeno-específicos en el tiempo. Se caracterizó además la respuesta generada por la vacuna sobre linfocitos *naïve*, en cuanto a su activación y capacidad proliferativa y citotóxica frente a células de melanoma.

En resumen, el análisis de distintas variables presentes en las sucesivas etapas de la generación de la vacuna CD/Apo-Nec permitió determinar condiciones que influyen y mejoran sus características finales. Este diseño optimizado, el cual presenta claras evidencias de generar una respuesta inmunitaria anti-tumoral eficaz, podrá ser evaluado con futuros estudios en la clínica.

Palabras clave: inmunoterapia – células dendríticas – melanoma – irradiación gamma – cuerpos lipídicos – migración a ganglios linfáticos – respuesta inmunitaria anti-tumoral

Parte de los resultados presentados en esta Tesis fueron publicados en:

- **Pizzurro GA**, Madorsky Rowdo FP, Pujol-Lereis LM, Quesada-Allué LA, Copati AM, Roberti MP, Levy EM, Teillaud JL, Barrio MM, Mordoh J. High lipid content of irradiated human melanoma cells does not affect cytokine-matured dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother* (2013) 62:3–15.

- **Pizzurro GA**, Tapia IJ, Sganga L, Podhajcer OL, Mordoh J, Barrio MM. Cytokine-enhanced maturation and migration to the lymph nodes of a human dying melanoma cell-loaded dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* (2015) doi:10.1007/s00262-015-1743-z.

- Barrio MA, Abes R, Colombo M, **Pizzurro GA**, Boix C, Roberti MP, Gélizé E, Rodriguez-Zubieta M, Mordoh J, Teillaud J. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8⁺ T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS ONE* (2012). 7(7): e40311 doi: 10.1371/journal.pone.0040311.

Development of human dendritic-cell based therapeutic vaccines for melanoma: Optimization of *in vitro* and *in vivo* phenotypic and functional parameters of the experimental DC/Apo-Nec vaccine

The present PhD Thesis project is mainly focused on the thorough analysis of the experimental DC/Apo-Nec vaccine for human cutaneous melanoma, in order to obtain an optimized design of the vaccine previously developed in our laboratory.

First, the interaction between dendritic cells and γ -irradiated melanoma cells (Apo-Nec) was characterized during the co-culture. As an increase in the cytoplasmic lipid body formation was detected in Apo-Nec cells after irradiation, a biochemical analysis and a description of their formation was performed. Dendritic cell function was assessed in the presence of different lipid body content, analyzing phagocytosis, antigen loading and stimulating capacity, at different maturation status.

Then, the migratory pattern of the vaccine was analyzed and compared *in vitro* and *in vivo* at different maturation status. Vaccine lymph node homing was described in the *nude* mouse model. Besides the chemotactic response, the main components responsible of vaccine motility and distribution after subcutaneous administration were determined.

Finally, the immunostimulatory profile of the vaccine was determined, along with its capacity to activate antigen-specific T-cell clones at different times after co-culture. The vaccine-induced response on *naïve* lymphocytes was also evaluated, regarding cell activation, proliferative response and cytotoxic function against melanoma cells.

Altogether, the analysis of variables present during several stages of the DC/Apo-Nec vaccine production and administration resulted in a more detailed and improved vaccine design. This optimized model has provided strong evidence that suggests it could generate an efficient anti-tumor immune response that should be further evaluated in the clinic.

Keywords: immunotherapy – dendritic cells – melanoma – gamma irradiation – lipid bodies – lymph node homing – anti-tumor immune response

Results from this PhD Thesis were partly published in:

- **Pizzurro GA**, Madorsky Rowdo FP, Pujol-Lereis LM, Quesada-Allué LA, Copati AM, Roberti MP, Levy EM, Teillaud JL, Barrio MM, Mordoh J. High lipid content of irradiated human melanoma cells does not affect cytokine-matured dendritic cell function. *Cancer Immunol Immunother* (2013) 62:3–15.

- **Pizzurro GA**, Tapia IJ, Sganga L, Podhajcer OL, Mordoh J, Barrio MM. Cytokine-enhanced maturation and migration to the lymph nodes of a human dying melanoma cell-loaded dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* (2015) doi:10.1007/s00262-015-1743-z.

- Barrio MA, Abes R, Colombo M, **Pizzurro GA**, Boix C, Roberti MP, Gélizé E, Rodriguez-Zubieta M, Mordoh J, Teillaud J. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8⁺ T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS ONE* (2012). 7(7): e40311 doi: 10.1371/journal.pone.0040311.



AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de este proyecto doctoral no fue algo que se dio de un día para otro, sino que ha sido un largo, y por momentos difícil, camino transitado. A lo largo de todos estos años, afortunadamente, han pasado muchas personas y personajes que hicieron su aporte a la tesis, al trabajo diario, a lo que sucedía dentro y fuera del laboratorio, en fin, que hicieron posible resistir todo el proceso. A los que me conocen, sabrán que esto no me resulta tarea sencilla, pero trataré de poner en palabras mi agradecimiento por todo lo que hicieron por mí.

A mis directores. Gracias Dr. Mordoh, por transmitirme su experiencia y su mirada crítica en el desarrollo del trabajo y por estar siempre dispuesto a escuchar nuestras ideas y opiniones. Admiro profundamente su dedicación a la ciencia. Gracias Marcela, por tu constante guía y todo el tiempo dedicado. Entre presupuestos, informes y freezers rotos, siempre lograste hacerte un hueco para resolver dudas, planificar experimentos y dar consejos. Por acompañarme en estos años, por el apoyo y la confianza.

A las chicas del labo (incluido Michele). Gracias infinitas. Por todo, por lo esencial y los detalles. Por el apoyo científico y personal. Un placer haber podido compartir estos años con gente genuinamente dispuesta a ayudar, a contener y a hacer del lugar de trabajo un segundo hogar. Compartiendo días largos, fines de semana y feriados. Las quiero inmensamente a todas y me llevo lo mejor de cada una. Las que todavía están en el CIO: Yami, Ivi, Pau B, Sol, Estefi, Betu, Caro, Dani, Sil, Marian, Estre y Michele. Las que ya no están, pero dejaron su huella: Pau R, Chofi, Flor Chervo, Juan, Vero, Fini, Pau I, Solecico. Las chicas del 101: Flor M, Anto, Sole, Lau, Marie y Rosa. A Santa Ánima, por su fuerte influencia sobre los experimentos.

A los que facilitaron el desarrollo de mi trabajo. En el Instituto Alexander Fleming: al Servicio de Hemoterapia, al Servicio de Anatomía Patológica y a la Biblioteca de FUCA. En la Fundación Instituto Leloir: al personal del Bioterio y, en especial, a Leo Sganga, por su paciencia y buena predisposición para el análisis en el bioluminómetro.

A los que financiaron mi trabajo, mediante becas y subsidios. Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, al Instituto Nacional del Cáncer, a la Fundación Cáncer y a la Fundación Sales.

A la educación pública. Que me permitió formarme como Lic. en Ciencias Biológicas en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, y luego continuar en este camino de formación en la carrera de Doctorado, en un ámbito profesional de excelencia académica con financiación estatal.

A mis amigos. Los que surgieron durante el doctorado y aquellos que me acompañan desde la Facu: Pablito, Meri, Karinaaaa, Mati G, Fran, Nati García, Geru, Nati Vázquez, Pau Cossi, Mati Angerami, Yani Sica, Dieguito Grinman, Esteban ‘el Jipi’, Lu, Yani, Denu. Y a las que me acompañan desde siempre, Pame y Pau. Gracias por haberme acompañado emocionalmente en esta etapa, en las constantes terapias de grupo por las penas compartidas y las copas para olvidarlas.

A mi familia. Gracias por haberme brindado todo y más de lo que se puede pedir. Por haberme enseñado a perseguir lo quiero, en base al esfuerzo. A disfrutar de la vida y de las pequeñas cosas. Por el amor y el cariño que no cambia con los años. Por haberse alegrado con cada pequeño logro a lo largo de este camino, muchas veces sin entender mucho de qué se trataba. A los abuelitos, con los que tengo la suerte de seguir compartiendo mates y tardes en el patio, que siguen siendo testigos de los frutos del esfuerzo que ellos sembraron. A mi mamá, por su constante presencia y esfuerzos para permitirme cumplir mis sueños.

A Pablo. Gracias. Porque sin él, no estaría donde estoy hoy. Por acompañarme incondicionalmente. Por haberme escuchado, ayudado, consolado, criticado, por haberse enojado, por haberme soportado. Por el día a día. Por haber agrandado mi familia, sumando unos suegros y cuñados increíbles y una hija maravillosa. Y por estar editando la tesis mientras estoy escribiendo estos agradecimientos. Por este y muchos proyectos más juntos.

A Juli. Que me enseñó mucho más de lo que pensaba. Que me hizo querer mucho más lo que hago mientras puedo disfrutar de ella y acompañarla en sus pequeños grandes logros. Te amo hermosa.



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>La inmunidad humana y la dinámica de la respuesta inmunitaria.....</i>	2
1.1. La inmunidad innata.....	5
1.2. Células presentadoras de antígenos.....	8
1.3. La inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica.....	14
1.4. La inmunovigilancia: respuesta inmunitaria anti-tumoral y evasión inmune.....	17
2. <i>El desarrollo del cáncer.....</i>	21
2.1. El cáncer en números.....	24
2.2. El melanoma cutáneo: estadísticas, desarrollo y progresión.....	26
2.3. Características fenotípicas y antigénicas del melanoma.....	29
3. <i>Inmunoterapia en cáncer.....</i>	30
3.1. Uso de anticuerpos monoclonales.....	32
3.2. Transferencia adoptiva de células efectoras.....	33
3.3. Vacunas anti-tumorales terapéuticas.....	35
4. <i>Vacunas con células dendríticas.....</i>	37
4.1. Obtención de las células dendríticas y condiciones de cultivo.....	37
4.2. Alternativas de direccionamiento de las CD <i>in vivo</i> y utilización de adyuvantes.....	38
4.3. Ruta de administración de las vacunas con CD: la piel como sitio de inyección.....	39
4.4. Migración de las vacunas de células dendríticas a los ganglios linfáticos.....	41
5. <i>Antecedentes y resultados previos.....</i>	43
OBJETIVOS GENERALES.....	46
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
<i>Líneas celulares.....</i>	50
<i>Ratones.....</i>	50
<i>Citoquinas.....</i>	50
<i>Anticuerpos.....</i>	51
<i>Herramientas informáticas.....</i>	51
<i>Irradiación de células tumorales.....</i>	51
<i>Determinación de la viabilidad de las células post-irradiación.....</i>	52
<i>Ensayo clonogénico.....</i>	52
<i>Síntesis de ADN en las células tumorales.....</i>	52
<i>Determinación del contenido proteico.....</i>	52
<i>Western-blot.....</i>	53
<i>Coloración de lípidos neutros con Oil Red O.....</i>	53
<i>Coloración fluorescente de lípidos neutros con Bodipy 493/503.....</i>	53
<i>Marcación intracelular del antígeno MART-1.....</i>	54
<i>Aislamiento de los cuerpos lipídicos de células tumorales.....</i>	54
<i>Análisis de la composición bioquímica de los cuerpos lipídicos.....</i>	54
<i>Síntesis de ácidos grasos.....</i>	55
<i>Obtención de las células mononucleares de sangre periférica y generación de las células dendríticas humanas ex vivo.....</i>	56
<i>Preparación del cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec.....</i>	56
<i>Maduración de las células dendríticas y uso de adyuvantes in vitro.....</i>	57
<i>Fenotipo de las células dendríticas y la vacuna CD/Apo-Nec.....</i>	57
<i>Fagocitosis de Apo-Nec por marcación con el colorante PKH67.....</i>	58
<i>Ensayo de transferencia de cuerpos lipídicos.....</i>	58
<i>Reacción Mixta de Leucocitos.....</i>	58
<i>Zimograma.....</i>	59
<i>Migración in vitro en microcámara de quimiotaxis.....</i>	59
<i>Migración in vitro en Transwell recubiertos con Matrigel.....</i>	59
<i>Mapeo de los ganglios linfáticos de ratón con Azul de Evans.....</i>	60
<i>Purificación celular por separación inmunomagnética.....</i>	60
<i>Marcación con el trazador celular fluorescente DiR.....</i>	61

<i>Análisis de la migración de la vacuna por In vivo Imaging</i>	61
<i>Disgregación mecánica de los ganglios linfáticos de ratón</i>	62
<i>Marcación con el trazador celular fluorescente CM-DiI</i>	62
<i>Cortes por congelación de tejido de ratón</i>	62
<i>Administración del MMP-9 Inhibitor I en las migraciones in vivo</i>	63
<i>Administración de adyuvantes en las migraciones in vivo</i>	63
<i>ELISA</i>	63
<i>Ensayo de presentación cruzada de Ag in vitro</i>	64
<i>Estimulaciones in vitro de linfocitos naïve con vacunas autólogas</i>	64
<i>Fenotipo de los linfocitos estimulados</i>	65
<i>Ensayo de proliferación de linfocitos con CFSE</i>	66
<i>Ensayo de citotoxicidad</i>	66
<i>Diseño experimental y análisis estadístico</i>	67
RESULTADOS	68
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE ANTÍGENO (APO-NEC) Y LA INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL CO-CULTIVO DE LA VACUNA CD/APO-NEC	69
1. <i>Caracterización de la integridad de las células tumorales luego de ser irradiadas</i>	70
1.1. Determinación de la viabilidad y el proceso apoptótico/necrótico post-irradiación.....	70
1.2. Capacidad proliferativa de las células post-irradiación.....	71
1.3. Contenido proteico y antigénico de las células post-irradiación.....	72
2. <i>Caracterización del contenido lipídico de las células tumorales luego de ser irradiadas</i>	75
2.1. Aparición de grandes cuerpos lipídicos luego de la irradiación.....	75
2.2. Dinámica de formación de los cuerpos lipídicos inducidos por irradiación.....	77
2.3. Análisis bioquímico de los cuerpos lipídicos.....	78
2.4. Generación de los cuerpos lipídicos en las células irradiadas.....	79
3. <i>Co-cultivo de las células dendríticas con las células Apo-Nec</i>	80
3.1. Maduración de las células dendríticas.....	80
3.2. Uso del cóctel de citoquinas pro-inflamatorias en el co-cultivo CD/Apo-Nec.....	82
3.3. Fagocitosis de las células Apo-Nec y aumento de los cuerpos lipídicos en las células dendríticas.....	82
4. <i>Efecto del contenido lipídico de las células Apo-Nec sobre la función de las células dendríticas luego del co-cultivo</i>	85
4.1. Interacción entre las células Apo-Nec y las células dendríticas en cultivo.....	86
4.2. Fagocitosis de antígenos y presencia de lípidos en las células dendríticas.....	87
4.3. Capacidad estimuladora de las células dendríticas sobre linfocitos alogeneicos.....	88
CAPÍTULO II: CAPACIDAD MIGRATORIA IN VITRO DE LA VACUNA CD/APO-NEC Y DISTRIBUCIÓN A LOS GANGLIOS LINFÁTICOS IN VIVO EN EL MODELO DE RATÓN NUDE	90
1. <i>Respuesta quimiotáctica in vitro de la vacuna CD/Apo-Nec</i>	91
1.1. Capacidad de respuesta y motilidad de la vacuna frente a diferentes quimioquinas.....	91
1.2. Modulación de la maduración y la quimiotaxis de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con diferentes componentes del CC.....	92
1.3. Utilización in vitro de adyuvantes durante la preparación del co-cultivo de la vacuna y su impacto sobre su maduración y quimiotaxis.....	94
2. <i>Rol de la metaloproteasa 9 en la motilidad invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec</i>	95
2.1. Secreción de metaloproteasas y su modulación con la maduración de la vacuna.....	95
2.2. Capacidad invasiva de la vacuna en respuesta a quimioquinas.....	97
2.3. Modulación de la MMP-9 y su impacto sobre la migración invasiva in vitro de la vacuna CD/Apo-Nec.....	98
3. <i>Distribución de la vacuna CD/Apo-Nec a los ganglios linfáticos en ratones nude</i>	99
3.1. Evaluación de la arquitectura y mapeo de los ganglios linfáticos de ratones inmunodeficientes.....	100
3.2. Ensayo de migración de la vacuna CD/Apo-Nec por in vivo imaging en ratones nude.....	102
3.3. Cuantificación de la migración a corto plazo y distribución en los ganglios linfáticos de la vacuna CD/Apo-Nec.....	104
3.4. Detección de las células de la vacuna en los GL del ratón.....	105
4. <i>Factores que modulan la llegada y distribución de la vacuna CD/Apo-Nec a los ganglios linfáticos del ratón</i>	107
4.1. Rol de la MMP-9 en la migración in vivo de la vacuna CD/Apo-Nec.....	107

4.2. Impacto de la administración de adyuvantes <i>in vivo</i> sobre la migración de la vacuna	107
4.3. Seguimiento de la migración y distribución de la vacuna en el tiempo	108
CAPÍTULO III: INTERACCIÓN DE LA VACUNA CD/APO-NEC CON CÉLULAS T E INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA ANTI-TUMORAL <i>IN VITRO</i>.....	112
1. <i>Perfil inmunoestimulador de la vacuna CD/Apo-Nec</i>	113
1.1. Expresión de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica	113
1.2. Balance de la producción de las citoquinas IL-12 e IL-10 de la vacuna	115
2. <i>Capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de estimular células T CD8⁺ in vitro</i>	115
2.1. Activación del clon CD8 ⁺ específico para MART-1 de la vacuna CD/Apo-Nec.....	116
2.2. Presentación cruzada del antígeno MART-1 según el grado de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec.....	117
2.3. Evolución de la capacidad de presentación cruzada del antígeno MART-1 en el tiempo	119
3. <i>Estimulación in vitro de linfocitos naïve con vacunas CD/Apo-Nec autólogas</i>	120
3.1. Fenotipo y activación de linfocitos naïve sometidos a un esquema de vacunación con CD/Apo-Nec autólogas <i>in vitro</i>	120
3.2. Respuesta anti-tumoral de linfocitos T inducida por la vacuna CD/Apo-Nec <i>in vitro</i>	124
DISCUSIÓN	128
CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN DE LA FUENTE DE ANTÍGENO (APO-NEC) Y LA INTERACCIÓN CON LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN EL CO-CULTIVO DE LA VACUNA CD/APO-NEC	129
CAPÍTULO II: CAPACIDAD MIGRATORIA <i>IN VITRO</i> DE LA VACUNA CD/APO-NEC Y DISTRIBUCIÓN A LOS GANGLIOS LINFÁTICOS <i>IN VIVO</i> EN EL MODELO DE RATÓN <i>NUDE</i>	136
CAPÍTULO III: INTERACCIÓN DE LA VACUNA CD/APO-NEC CON CÉLULAS T E INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA ANTI-TUMORAL <i>IN VITRO</i>.....	143
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	150
BIBLIOGRAFÍA	158



ABREVIATURAS

Ag: antígeno

ADCC: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo

ANOVA: análisis de la varianza

BCG: Bacillus Calmette-Guérin

CAR: receptor antigénico quimérico

CC: cóctel de citoquinas pro-inflamatorias

CD: célula dendrítica

CDi: célula dendrítica inmadura

Clon M26: clon de células T CD8⁺ específico para el Ag MART-1 (AAGIGILTV) restringido al HLA-A*0201

CPA: célula presentadora de antígeno

DAMP: patrón molecular asociado a señales de peligro

EE: error estándar

GL: ganglio linfático

GM-CSF: factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos

HLA: antígeno leucocitario humano

HSP: proteínas de shock térmico

IC_{95%}: intervalo de confianza del 95%

IFN: interferón

IL: interleuquina

ILC: célula linfoide innata

LB: cuerpo lipídico

LPS: lipopolisacárido

MLR: reacción mixta de leucocitos

NK: asesina natural

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno

PBMC: células mononucleares de sangre periférica

PBS: buffer fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PGE2: prostaglandina E2

PHA: fitohemaglutinina

RI: respuesta inmunitaria

SFB: suero fetal bovino

SI: sistema inmunitario

TAA: antígeno asociado al tumor

TCR: receptor de célula T

Teff: linfocito T efector

TGF: factor de crecimiento tumoral

Th: *T helper*

TLR: receptores tipo Toll

TNF: factor de necrosis tumoral

Treg: linfocito T regulatorio



INTRODUCCIÓN

1. La inmunidad humana y la dinámica de la respuesta inmunitaria

El sistema inmunitario o inmune (SI) tiene como función principal reconocer y eliminar microorganismos potencialmente patogénicos, que pueden representar una amenaza para el organismo. Este sistema de defensa aprende, en una primera instancia, a identificar las señales endógenas ‘propias’, mediante la selección negativa de células autorreactivas (Giltiay et al., 2012; Kyewski and Klein, 2006). De esta manera, es capaz de reconocer elementos ‘no-propios’ expresados por los patógenos y, consecuentemente, montar una respuesta que permita eliminarlos. La respuesta inmunitaria (RI) está sujeta a estrictos mecanismos de control (Hildeman et al., 2007; Liston and Gray, 2014) para mantener la homeostasis inmune, ya que si se manifiesta de modo inadecuado puede desencadenar patologías inflamatorias o autoinmunes.

Los sistemas de defensa contra agentes infecciosos pueden ser encontrados tanto en organismos procariotas, como el recientemente descrito sistema CRISPR/Cas9 (Marraffini, 2015), así como también en eucariotas. Los invertebrados presentan algunos elementos incipientes del SI, que pueden ser encontrados también en los vertebrados. Éstos, a su vez, mantienen conservados diferentes mecanismos dentro de sus grupos filogenéticos que han co-evolucionado junto con las especies (Boehm, 2012; Du Pasquier and Litman, 1992).

El SI humano está conformado por una serie de órganos, tejidos y células, distribuidos en casi todo el cuerpo (Figura 1.A), a excepción de algunos sitios inmunoprivilegiados, donde el acceso de ciertos componentes inmunes se encuentra parcialmente restringido (Benhar et al., 2012). Este sistema complejo involucra además en muchos casos componentes celulares propios de los diferentes tejidos, además de los específicos del SI.

Como componentes principales del SI, podemos mencionar:

- la *médula ósea*: es un tejido ubicado en el interior de los huesos largos y planos del cuerpo y, en particular, la médula ósea roja constituye un órgano linfoide primario. Ésta contiene las células precursoras hematopoyéticas, que dan lugar a todos los linajes de las células sanguíneas, incluidos los leucocitos, células principales del SI (Figura 1.B). En el adulto, la médula ósea roja queda restringida a unos pocos huesos planos, como las costillas y los huesos pélvicos. En la médula ósea también se produce la primera etapa de diferenciación y selección de los linfocitos B (Cambier et al., 2007; Carsetti, 2000).

INTRODUCCIÓN

- el *timo*: es otro órgano linfático primario especializado, ubicado sobre el corazón y detrás del esternón. Se encuentra enteramente funcional en la niñez y, luego de la adolescencia, se va transformando en tejido adiposo. En el timo se produce la maduración y selección de los linfocitos T, cuyos progenitores llegan desde la médula ósea. Aquí se produce la llamada tolerancia central, proceso por el cual se eliminan aquellas células T autorreactivas, dejando activo sólo un repertorio que sea tolerante a lo propio (Kyewski and Klein, 2006).

- el *bazo*: este órgano, ubicado dentro de la cavidad abdominal, cumple varios roles entre los cuales se encuentran la eliminación de glóbulos rojos y reciclado de la hemoglobina y funciones como órgano linfático secundario. En este aspecto, es por un lado el reservorio de monocitos del organismo (Swirski et al., 2009) y por otro está involucrado en la maduración final de las células B. Aquí, los linfocitos T son capaces de reconocer antígenos (Ag) y los linfocitos B activados producen anticuerpos (Playfair et al., 1965) (Figura 1.C).

- el *sistema linfático*, conformado por los vasos y ganglios linfáticos: este sistema es compartido por el sistema circulatorio y el SI. Por un lado, se encarga de drenar fluidos de los diferentes órganos, que contienen células y diferentes moléculas, a través de los vasos linfáticos, que luego vuelven al torrente sanguíneo. Por otra parte, cumple un importante rol inmune al ‘filtrar’ esos fluidos, denominados linfa, a través de los ganglios linfáticos (GL), órganos linfáticos secundarios. Allí son sensados por células inmunes que pueden responder frente a la presencia de señales patogénicas o ‘no-propias’ (Figura 1.D).

- los *leucocitos*: son las células efectoras del SI, compuestas por las células de linaje mieloide y linfoide originadas a partir de progenitores hematopoyéticos (Figura 1.B). Éstas células están involucradas en los diferentes procesos de la RI, correspondientes a la inmunidad innata, la presentación de Ags, la inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica, de las cuales hablaremos en detalle más adelante. Los componentes del linaje mieloide son: basófilos, eosinófilos, neutrófilos, mastocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (CD) mieloides. Los del linaje linfoide son: células linfoides innatas (ILC, por sus siglas en inglés), linfocitos B, linfocitos T, linfocitos asesinos naturales (NK, por sus siglas en inglés), linfocitos NKT y CD plasmocitoides.

- las *citoquinas*: son una categoría amplia y diversa de proteínas de bajo peso molecular, que actúan como agentes de diferenciación e inmunomoduladores a través de señalización autócrina, parácrina o endócrina. Son producidas por una amplia variedad de tipos celulares y una misma citoquina puede ser producida por distintas células. Existen citoquinas que pueden

tener funciones redundantes. Las citoquinas incluyen, entre otras, a las interleuquinas (IL), los interferones (IFN), factores de necrosis tumoral (TNF), la superfamilia de los factores de crecimiento tumoral (TGF) y múltiples quimioquinas.

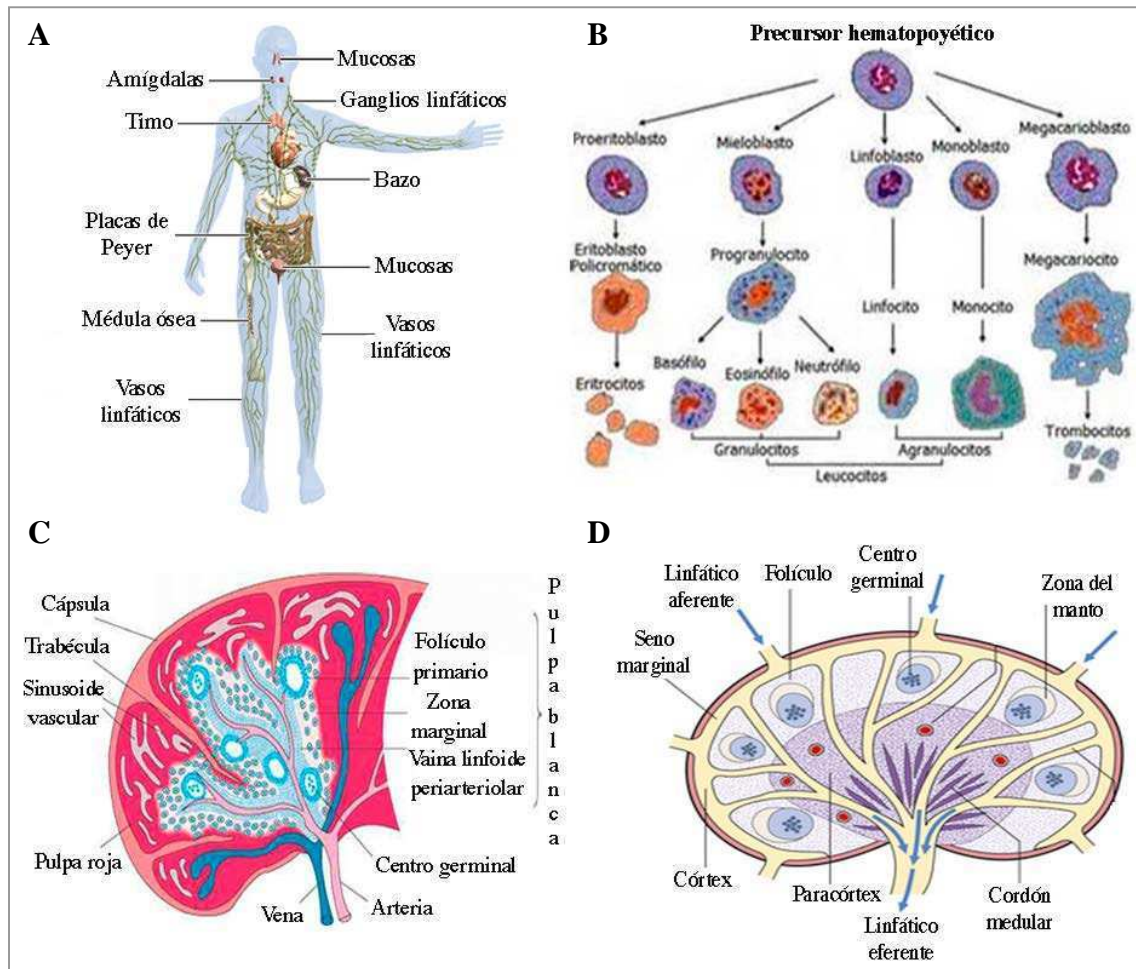


Figura 1. A. Diagrama de la ubicación de los órganos y tejidos principales del SI. Adaptado de *PubMed Health* www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth. B. Diferenciación de los distintos tipos celulares a partir de la célula progenitora hematopoyética. Adaptado de *Wikimedia* (<https://commons.wikimedia.org>). C. Esquema de la estructura del bazo, con referencia a los compartimentos principales. Adaptado de <http://faculty.ksu.edu.sa/>. D. Esquema de la estructura de un GL. Adaptado de www.clinicalgate.com.

Todos estos componentes se articulan para funcionar como sistema de vigilancia permanente del organismo y, en el caso de una lesión o infección, reaccionar rápidamente mediante una RI efectiva. Frente a estos eventos se desencadena una cascada de mecanismos, mediados por interacciones célula-célula y factores solubles, que detallaremos a continuación, para neutralizar los efectos nocivos y eliminar la amenaza del organismo.

1.1. La inmunidad innata

La piel y las mucosas son barreras naturales que constituyen la primera línea de defensa que impiden el ingreso de patógenos. Si esa barrera es superada, se activan mecanismos celulares y humorales de la inmunidad innata. Estos comprenden principalmente macrófagos, neutrófilos, basófilos, células NK, mastocitos y CD, por un lado, y citoquinas pro-inflamatorias, el sistema de complemento y proteínas de fase aguda, por otro. La conjunción de todos estos componentes puede llegar a resolver un proceso infeccioso naciente o, al menos, mantenerlo controlado hasta que se desarrolle la RI adaptativa. Una característica significativa de la inmunidad innata es la capacidad de condicionar el tipo de RI adaptativa que puede inducir, dado por los mecanismos activados durante la respuesta primaria (Medzhitov and Janeway Jr., 1998; Schnare et al., 2001).

La RI innata posee mecanismos de reconocimiento particulares que le confieren una especificidad que viene codificada en el genoma. Esta se produce a través de múltiples receptores que le permiten identificar la presencia de algún agente infeccioso, reconociendo patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) o asociados a señales de peligro (DAMP), entre otros (Figura 2.A). Existen otros mecanismos más recientemente descritos que incluyen a múltiples galectinas en el reconocimiento de glicanos y en la modulación de la inmunidad innata durante la interacción huésped-patógeno (Cerliani et al., 2011).

Una característica principal de la respuesta innata es la inflamación, representada por enrojecimiento y aumento de temperatura local, hinchazón, dolor y pérdida de función de la zona afectada. La activación de las células inmunes locales por medio de sus receptores induce la producción de citoquinas pro-inflamatorias y de especies reactivas del oxígeno, liberación de enzimas y quimioattractantes, junto con la activación de procesos que permiten eliminar los patógenos, como la activación de los fagocitos y el aumento de la permeabilidad vascular (Figura 2.A y .B).

Las principales citoquinas involucradas en la actividad de la respuesta innata son:

- *TNF* e *IL-1*, mediadores de la inflamación,
- *quimioquinas*, para reclutar células inmunes al sitio inflamatorio,
- *IFN- α* y *- β* , para combatir infecciones virales,
- *IFN- γ* , para la activación de macrófagos,

- *IL-12*, para inducir la producción de IFN- γ en linfocitos NK y T,
- *IL-15*, para inducir la proliferación de los linfocitos NK,
- *IL-10* y *TGF- β* , para el control de la inflamación.

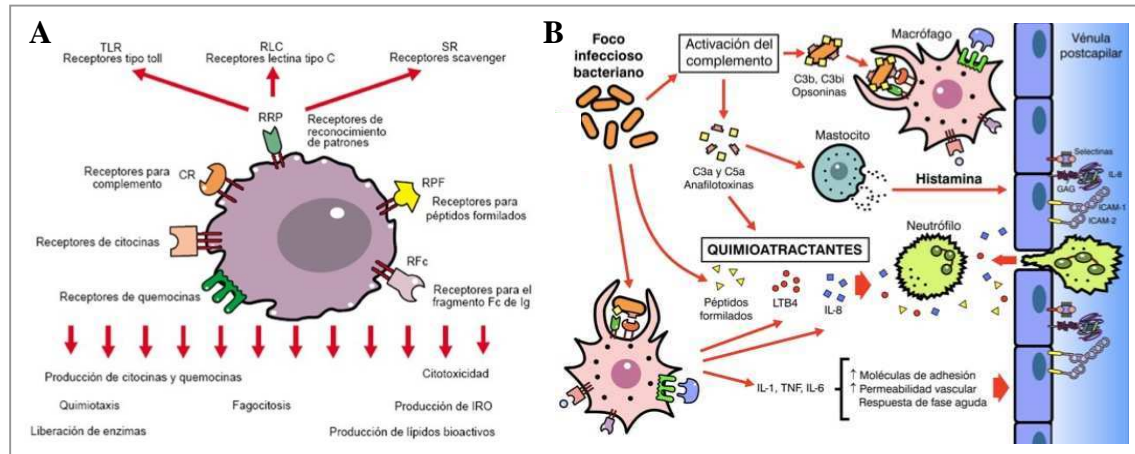


Figura 2. A. Receptores presentes en las células de la inmunidad innata, que le permiten llevar a cabo su función. Cuando se produce la activación de las mismas a través de esos receptores, se produce una cascada de respuestas que buscan eliminar la infección del sistema. B. Mecanismos de respuesta de la inmunidad innata frente a un foco infeccioso (Fainboim and Geffner, 2008).

En particular, podemos mencionar la familia de receptores tipo Toll (TLR, por sus siglas en inglés), ya que constituyen uno de los principales sensores de la inmunidad innata para reconocer patógenos microbianos, responsables de la activación de células efectoras innatas, y en particular de las CD. Estos receptores se encuentran en vertebrados y organismos invertebrados, mostrando una llamativa conservación de su función (Aderem and Ulevitch, 2000). En humanos, se han identificado 10 TLR funcionales, que poseen diferente localización celular, pero vías de activación cruzadas (Figura 3). Los TLR pueden ser expresados por miembros de la inmunidad innata y adaptativa (CD, macrófagos, granulocitos, linfocitos T y B y mastocitos), así como también por células epiteliales y endoteliales, e incluso se han encontrado en células tumorales. Además de reconocer patógenos, pueden ser activados también por ligandos endógenos, como proteínas de shock térmico (HSPs), fibronectina o fibrinógeno, o compuestos sintéticos (Gnjatic et al., 2010).

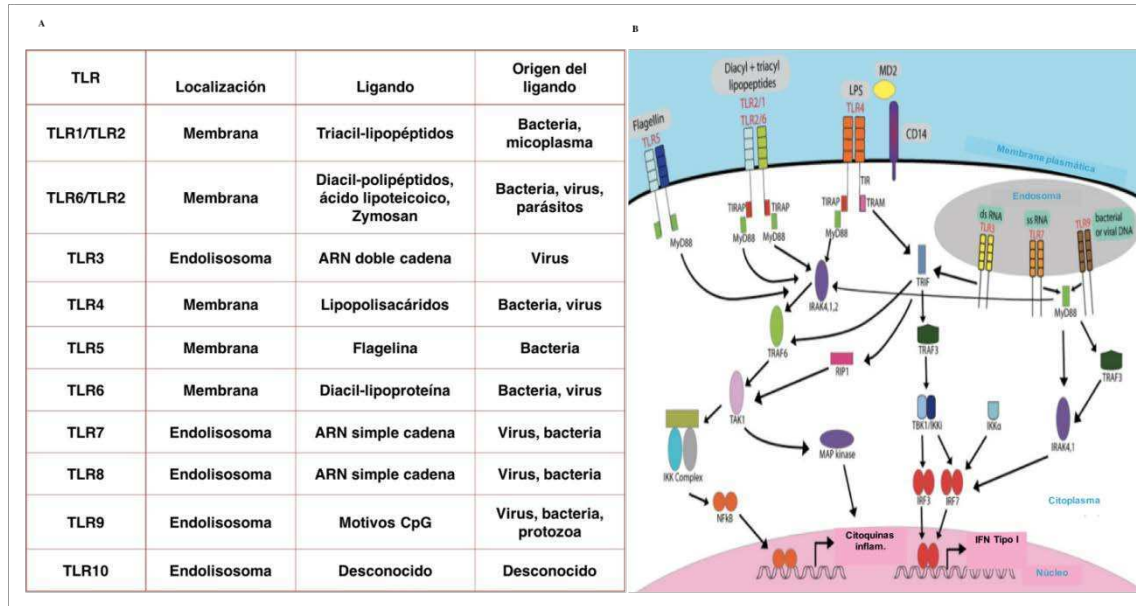


Figura 3. A. Lista de los TLR en humanos, descritos hasta el momento, junto con su localización y sus ligandos. Adaptado de Leone and Moreau, 2014. **B.** Interconexión de las vías de señalización de los diferentes TLR, que tienen como consecuencia la activación de genes de la respuesta inflamatoria. Adaptado de Gnjatic et al., 2010.

Cabe destacar otros actores de RI innata, pero de linaje linfoide. Las ILC son una familia creciente de células inmunes, todavía en estudio, que se asemejan en fenotipo y función a los linfocitos T. A diferencia de éstas, las ILC no tienen receptores específicos de Ag ni sufren selección y expansión clonal cuando son estimuladas. En cambio, reaccionan rápidamente a las señales de peligro secretando una amplia variedad de citoquinas que coordinan una RI adecuada frente al patógeno (Eberl et al., 2015).

Por otro lado, las células NK son consideradas las células efectoras de la inmunidad innata, debido a su capacidad citotóxica, por medio de la secreción de granzimas y perforinas, la expresión de receptores de muerte y la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés), así como la liberación de IFN- γ y la comunicación cruzada con CD. Sin embargo, llevan a cabo funciones biológicas más sofisticadas. Debido a la expresión adecuada de un repertorio de receptores activadores e inhibitorios aseguran, a la vez, la tolerancia a lo propio y una respuesta eficaz frente a amenazas como infecciones virales y el desarrollo tumoral, mostrando una reacción que se adapta a su ambiente (Vivier et al., 2011). Las células NK poseen atributos correspondientes a la inmunidad innata y adaptativa, desdibujando los límites entre estas dos ramas de la RI.

1.2. Células presentadoras de antígenos

Mientras se desarrolla la respuesta innata, hay un subgrupo de células que se activan con las señales provistas por los patógenos y son capaces de activar y orquestar la RI adaptativa, si la infección no se resuelve. Estas células son las células presentadoras de Ag (CPA) profesionales. En este grupo se encuentran principalmente las CD y, en menor medida, los macrófagos y las células B. Éstas se encargan de ‘mostrar’ los Ag, pequeñas porciones de moléculas expresadas por los patógenos, a linfocitos capaces de reconocerlos y, de esa manera, activar una respuesta específica contra esos Ag.

Las CD se encuentran principalmente distribuidas en la piel y mucosas, aunque pueden alojarse en otros tejidos y también pueden encontrarse circulando por la sangre y los GL. Las CD se encuentran en un estado basal inmaduro no activado, sensando continuamente el ambiente, gracias a su alta capacidad fagocítica. En presencia de las señales activadoras, se dispara un mecanismo de diferenciación, denominado maduración. Durante este proceso, pierden la capacidad fagocítica y adquieren capacidades migratorias mientras que, dependiendo del tipo de estímulo, aumentan la expresión de moléculas de membrana necesarias para la interacción con los linfocitos (Tabla 1). Esta función las convierte en un actor fundamental de la RI, ya que pueden traducir la respuesta innata en una respuesta altamente específica, sumado a su capacidad de perfilar el tipo de respuesta que generan (Banchereau and Steinman, 1998).



Célula Dendrítica	 Inmadura	 Madura
Ubicación	Tejidos periféricos	Órganos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	++	+/-
Capacidad de procesamiento de Ag	++	+/-
Expresión de moléculas co-estimuladoras y	+	++
Capacidad estimuladora de linfocitos <i>naïve</i>	+/-	++
Expresión de CCR7	+/-	++

Tabla 1. Comparación de las características principales de las CD en dos estados distintos de maduración, que definen su rol y capacidades de activación de la RI adaptativa durante una infección. ++=alta, +=baja, +/-=baja o nula. Adaptado de Fainboim and Geffner, 2008.

Como otras células de la inmunidad innata, las CD expresan receptores que le permiten reconocer PAMP y DAMP (Escamilla-Tilch et al., 2013), junto con otros que facilitan la fagocitosis (Figura 4.A). Existen múltiples *subsets* de CD que responden a diferentes estímulos a través de combinaciones particulares de receptores y que tienen patrones de respuesta específicos, más allá de sus funciones generales (Ueno et al., 2007). Las CD presentan una degradación lisosomal disminuida, lo que les confiere la capacidad de procesar Ag fagocitados sin degradarlos completamente y de esa manera poder asociarlos a las moléculas presentadoras de Ag para ser reconocidos por los linfocitos T (Savina and Amigorena, 2007). Esta característica en las CD está asociada también a la retención de Ag fagocitados, que, mediante un procesamiento lento, les permite presentar esos Ag una vez que alcanzan los GL (Delamarre et al., 2005a).

Para Ag proteicos existen dos grandes grupos de moléculas presentadoras de Ag, expresadas en la membrana plasmática: el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I, en humanos conocido como Ag leucocitario humano I (HLA-I, por sus siglas en inglés) y el de tipo II (HLA-II). Los complejos de HLA presentan tres características que les confieren una inmensa variabilidad: poligenismo, polimorfismo y codominancia. Al día de hoy hay descriptos más de 8000 alelos de HLA, cuyas combinaciones generan muy bajas probabilidades de compatibilidad entre individuos (Robinson et al., 2013). Los HLA muestran pequeñas fracciones moleculares de las proteínas fagocitadas, denominadas epitopes. Un determinado Ag puede producir múltiples epitopes que pueden ser presentados en el contexto de los diferentes HLA, generando una respuesta policlonal contra ese Ag.

Los complejos de HLA-I se encuentran expresados en la membrana plasmática de todas las células nucleadas del organismo. Las moléculas del HLA-I están asociadas a la subunidad β 2-microglobulina y alojan o ‘cargan’ polipéptidos de entre 8 y 10 aminoácidos. El complejo HLA-I interacciona con el receptor de los linfocitos T específico para ese epitope que expresen además el co-receptor CD8, (Figura 4.B). Los subtipos más frecuentes son los HLA-A, HLA-B y HLA-C, denominados moléculas clásicas. Aparte de éstas, existen otros complejos de HLA-I no-clásicos como el HLA-E, HLA-F o HLA-G, expresados por algunos subtipos celulares particulares. Los complejos de HLA-II están limitados a células del SI, principalmente a las CPA. Típicamente, las componen los complejos HLA-DP, HLA-DR y HLA-DQ. Estos complejos cargan polipéptidos de entre 12 y 18 aminoácidos, que son reconocidos en el contexto del HLA-II por linfocitos T específicos que expresen además el co-receptor CD4 (Figura 4.B). Además, existen otras moléculas presentadoras de Ag, como el

grupo CD1. Estos complejos poseen una estructura similar a los HLA-I, se asocian a la subunidad β_2 -microglobulina y presentan una amplia variedad de lípidos a linfocitos NKT y, en humanos, a linfocitos T con receptores de célula T (TCR, por sus siglas en inglés) $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, restringidos a complejos CD1 (Cao et al., 2002; Dowds et al., 2014).

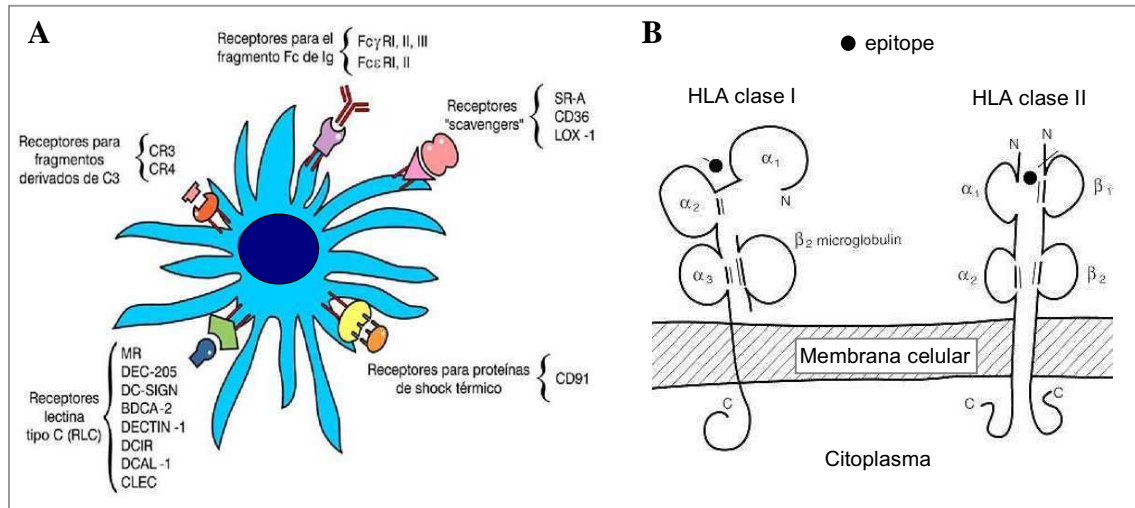


Figura 4. A. Receptores presentes en las CD, los cuales les permiten sentir el ambiente y activarse en caso de encontrar señales de una infección (Fainboim and Geffner, 2008). B. Esquema de la estructura molecular de los complejos HLA-I y HLA-II (Adaptado de Elementos de Inmunología, Patología Oral © 2016).

Los Ag procesados por las CD pueden provenir del medio extracelular o del citoplasma. Dependiendo de su origen, pueden ser procesados por dos vías: la endógena o la exógena (Figura 5.A). La vía endógena comprende la degradación de péptidos citoplasmáticos, endógenos propios de la célula o extraños (infección viral). Los péptidos son procesados por el inmunoproteasoma (Basler et al., 2013), que translocan al retículo endoplasmático por medio del complejo TAP. Allí se asocian a las moléculas del complejo HLA-I y luego son transportados a la membrana plasmática para ser presentados a linfocitos T $CD8^+$. Por otro lado, los Ag extracelulares pueden ser incorporados por diversos procesos, como la endocitosis o macropinocitosis, y permanecen en los endosomas. Éstos se fusionan con vesículas provenientes del aparato de Golgi con la forma inactiva del complejo HLA-II. En estos endosomas tardíos, se libera el complejo HLA-II y se unen los polipéptidos procesados que, al igual que con el HLA-I, son luego transportados a la membrana plasmática, para ser presentados a linfocitos T $CD4^+$.

A su vez, las CD son capaces de realizar una presentación cruzada de Ag (Figura 5.B) (Carbone and Bevan, 1990; Joffre et al., 2012). Este mecanismo, que cruza la vía exógena con la endógena, le permite a las CD activar linfocitos CD8⁺ a través de la presentación vía HLA-I de Ag provenientes de otras células, capturados desde el medio extracelular. Esto pasa a ser de importancia en la RI cuando hay infecciones virales que no infectan a la CPA o en la respuesta frente a tumores.

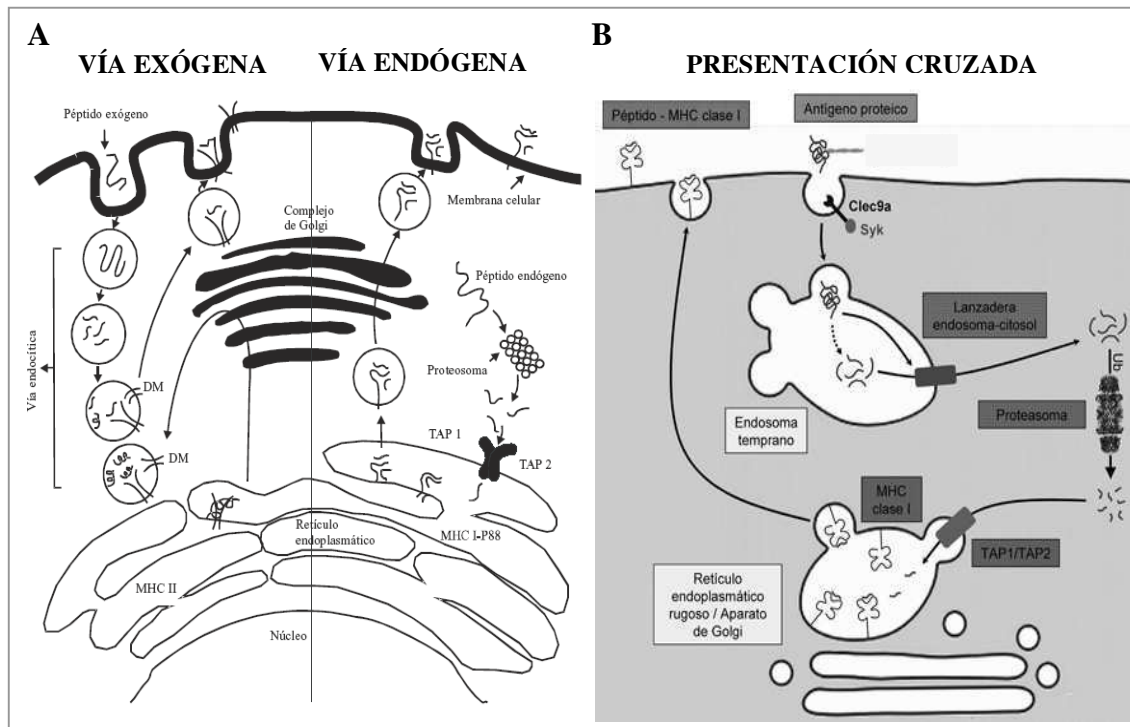


Figura 5. A. Vías canónicas de procesamiento antigénico (exógena y endógena) por parte de las CPA. B. Vía de presentación cruzada de Ag en las CD. Adaptado de *bvscuba*, Libros de Autores Cubanos.

Si durante el procesamiento antigénico aparecen señales que activen los receptores presentes en las CD, éstas se diferencian a un estado ‘maduro’. Este proceso implica la inducción de la expresión de moléculas de membrana y la liberación de factores solubles, que van a definir el resultado de la interacción con los linfocitos específicos. La maduración de las CD se caracteriza por el aumento de moléculas co-estimuladoras, involucradas en la sinapsis inmunológica con los linfocitos, que representan la *señal 2* necesaria para su activación, acompañando la presentación del Ag específico (*señal 1*) (Reichardt et al., 2010). Estas incluyen a los marcadores CD80 y CD86, CD40, CD70, ICOS-L, que interactúan con sus contrapartes CD28, CD40L, CD27 y ICOS, respectivamente, expresadas en los linfocitos. A

su vez, las CD también aumentan los niveles de expresión de las moléculas presentadoras de Ag. Las citoquinas secretadas por las CD durante su activación pueden definir el perfil de la RI y la magnitud de la activación de las células efectoras específicas, por lo que ya se la define como la *señal 3* (Kalinski et al., 2011; Linette and Carreno, 2013). Durante la maduración, las CD pierden la expresión de quimiorreceptores de localización periférica, como el CCR5, y adquieren el receptor CCR7, que permite el *homing* a los GL drenantes. Las CD pueden expresar tanto moléculas co-estimuladoras como co-inhibitorias (Chen and Flies, 2013), por lo que la maduración de las CD es un balance complejo de señales que determinan el fenotipo final de las CD al momento de encontrarse con los linfocitos.

Todo el proceso de maduración está acompañado de una capacidad migratoria aumentada, dirigida por quimioquinas. Para interactuar con los linfocitos y realizar la presentación de Ag, las CD migran desde el tejido periférico a los GL drenantes, a través de la vía linfática, dirigida principalmente por el eje CCR7-CCL19/CCL21 (Johnson and Jackson, 2014). La eficiencia de migración de las CD a los GL se relaciona con su estado de maduración (de Vries et al., 2003), así como con la expresión de CCR7, que le confiere atributos adicionales a las CD maduras, por ejemplo, controlando su velocidad de migración e inhibiendo su apoptosis (Sanchez-Sanchez et al., 2006). Además, la movilización de las CD requiere de la secreción de metaloproteasas (Ratzinger et al., 2002) así como un cambio en el perfil de las moléculas de adhesión. Esta migración sucede en diferentes etapas, que determinan la localización final de las células dentro del GL (Alvarez et al., 2008; Martín-Fontecha et al., 2003). El GL es un órgano compartimentalizado y multifuncional que ofrece, en su conjunto, una guía estructural para una óptima proximidad y *escaneo* de las CD cargadas con Ag sobre un alto número de células T, para poder activar la RI adaptativa (Figura 6) (Castellino et al., 2006; Munoz et al., 2014).

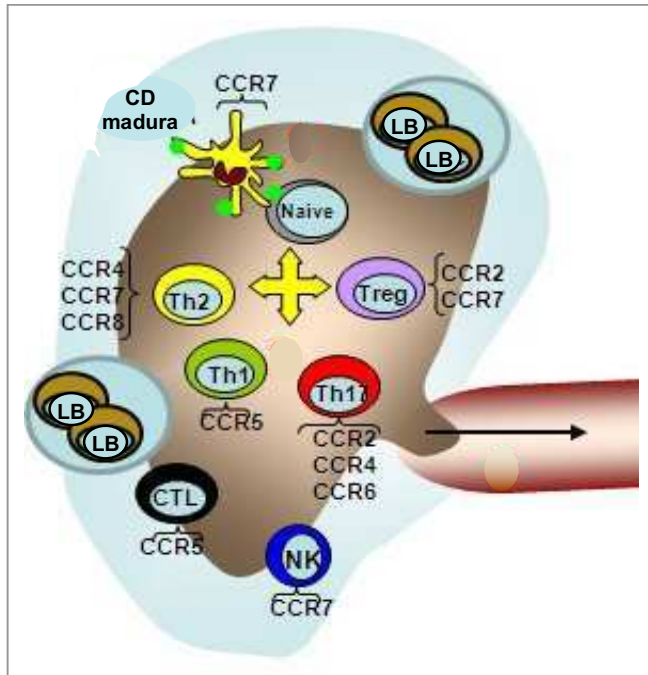


Figura 6. Esquema de la llegada y localización de las células inmunes en GL. Expresión de los quimiorreceptores que coordinan su ubicación en la estructura linfática durante la interacción con las CD y luego de su activación. Adaptado de Sánchez Madrid and Martín, 2011.

Mediante recientes avances en microscopía de toma de intervalos e intravital basada en técnicas multifotónicas de detección, se han podido observar en detalle los complejos comportamientos migratorios e interacciones de las CD y linfocitos T dentro del ambiente linfoide, principalmente en modelos murinos. Las CD llegan a los GL drenantes desde el tejido periférico típicamente entre las 24 y 72 horas desde su activación, aunque puede ocurrir tan pronto como 2 horas luego de encontrar el estímulo (Grayson et al., 2007). Las CD extienden vigorosamente largas y ágiles dendritas promoviendo el análisis y escaneo de un repertorio vasto de células T, que presentan movilidad autónoma. Los linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ poseen diferentes estrategias de vigilancia antigénica, con roles asimétricos en las interacciones con los HLA y sus tiempos de tránsito por los GL (Mandl et al., 2012; Miller et al., 2004). Las CD que cargan Ag son altamente eficientes reclutando a células T *naïve* específicas dentro del GL, en parte a través de la secreción de quimioquinas, que promueven su interacción con células T $CD4^+$ y $CD8^+$ cognatas (que reconocen el mismo epítopo) (Castellino et al., 2006; Hugues et al., 2007). La avidez general resultante de su interacción influye en la probabilidad de que las células T sean capturadas por las CD de manera estable (Bouso and Robey, 2003; Kaiser et al., 2005) y que, una vez activadas, dejen el GL para llevar a cabo su función.

1.3. La inmunidad adaptativa y la memoria inmunológica

Si la inmunidad innata no puede resolver la infección a tiempo, se dispara la respuesta de la inmunidad adaptativa. Previamente, fueron expuestos en detalle los mecanismos de las CPA para llevar a cabo este proceso. La inmunidad adaptativa está compuesta principalmente por los linfocitos T y B. A diferencia de la respuesta innata, reconocen a Ag específicos mediante receptores de membrana únicos. La frecuencia de las células específicas no estimuladas (*naïve* o vírgenes) para cada Ag en el organismo es muy baja. Al identificar al patógeno, los linfocitos proliferan rápidamente, proceso conocido como expansión clonal, mientras se diferencian en células efectoras específicas. Una vez que la infección es eliminada, se recupera la homeostasis inmune mediante la muerte de las células efectoras por apoptosis. Una subpoblación de las células específicas posee la capacidad de persistir en el sistema con la habilidad de ‘recordar’ al patógeno, de manera tal de responder más rápida y vigorosamente frente a una re-infección. Esta característica es la memoria inmunológica, estrategia utilizada en la vacunación profiláctica (Figura 7).

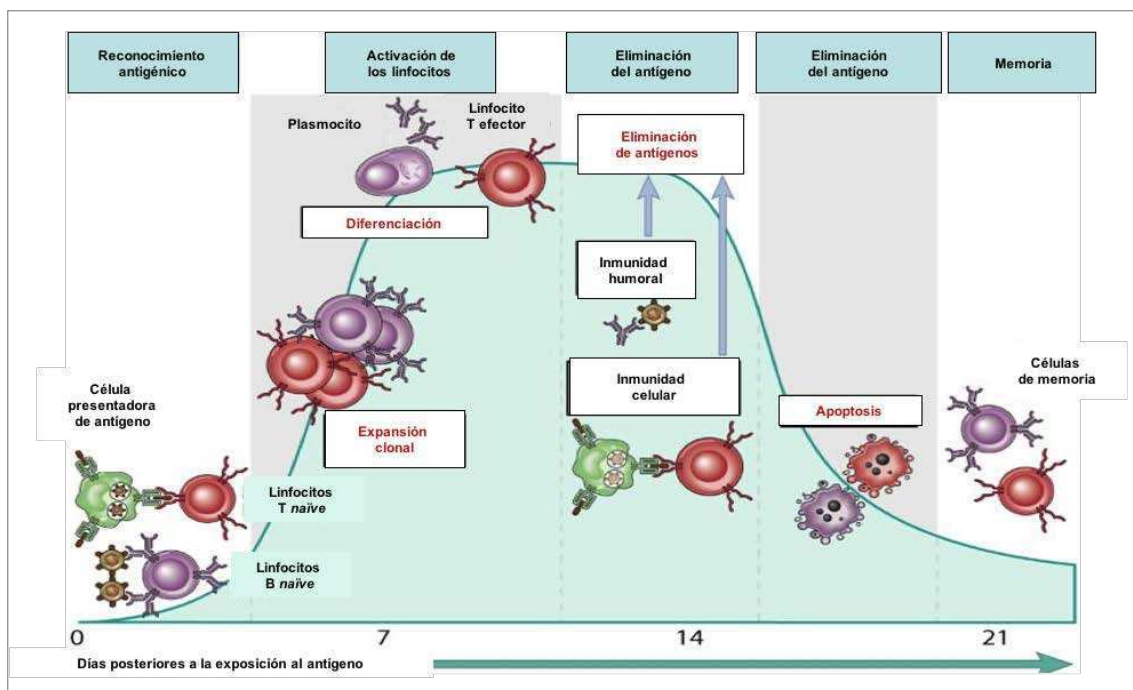


Figura 7. Esquema de dinámica de la RI adaptativa y la generación de memoria. Adaptado de (Abbas and Lichtman, 2011).

Los linfocitos B son los responsables principales de la denominada respuesta humoral. Su principal función es la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas) de alta afinidad por

los Ag. La acción de las inmunoglobulinas se lleva a cabo a distancia y pueden, entre otras cosas, opsonizar patógenos, favorecer su fagocitosis o desencadenar la citotoxicidad por ADCC. Las células B reconocen epitopes antigénicos en su forma nativa, por medio de inmunoglobulinas de membrana, que conforman el receptor de célula B. Si entran en contacto con su Ag específico, junto a la colaboración de señales de macrófagos y células T, se produce la selección y expansión clonal, diferenciando 2 subpoblaciones: los plasmocitos, que secretan los anticuerpos específicos y que al cabo de unos días mueren por apoptosis, y las células B de memoria, que permanecen en estado de reposo (G_0) durante largos períodos de tiempo (años).

Los linfocitos T son los responsables de la RI celular. Reconocen epitopes antigénicos procesados por las CPA, a través de su TCR, asociado a la molécula CD3, y llevan a cabo su función por medio de factores solubles e interacciones célula-célula. Las células T poseen múltiples *subsets* (Dong and Martinez, 2010), pero pueden ser divididas principalmente en dos grupos, linfocitos T *helper* (*Th*) y linfocitos T citotóxicos (CTL). Las células *Th* se distinguen por la expresión del co-receptor CD4 y promueven una inmunidad efectiva a través de la secreción de moléculas que inducen las respuestas humorales y celulares frente a la infección, incluyendo además los linfocitos T de memoria (Kaech et al., 2002). Se pueden diferenciar al menos seis subtipos, caracterizadas por la expresión de factores de transcripción y moléculas de superficie específicos (Figura 8.A), que determinan su función particular en la RI. Existe además un grado de plasticidad entre los distintos subsets de linfocitos *Th* (Figura 8.B) (Nakayamada et al., 2012). Los CTL se distinguen por la expresión del co-receptor CD8 y se encargan de localizar y destruir células *target* que presenten el Ag específico, limitando la infección y facilitando su eliminación. Su función citotóxica la llevan a cabo mediante diferentes mecanismos, como granzimas y perforinas y receptores de muerte (Russ et al., 2013).

Los linfocitos T de memoria poseen una variedad más amplia, y en mayor cantidad, de receptores inmunes que las células *naïve*. A diferencia de éstas, las células de memoria pueden responder a la infección sin la necesidad de una nueva diferenciación (Lalvani et al., 1997). Estas características, combinadas con una persistencia en mayor frecuencia, les permiten a las células T de memoria responder más rápidamente frente a una segunda infección para controlar y eliminar la infección (Veiga-Fernandes et al., 2000). En su conjunto, todas estas características de los linfocitos de memoria proveen la base de la inmunidad mediada por células T.

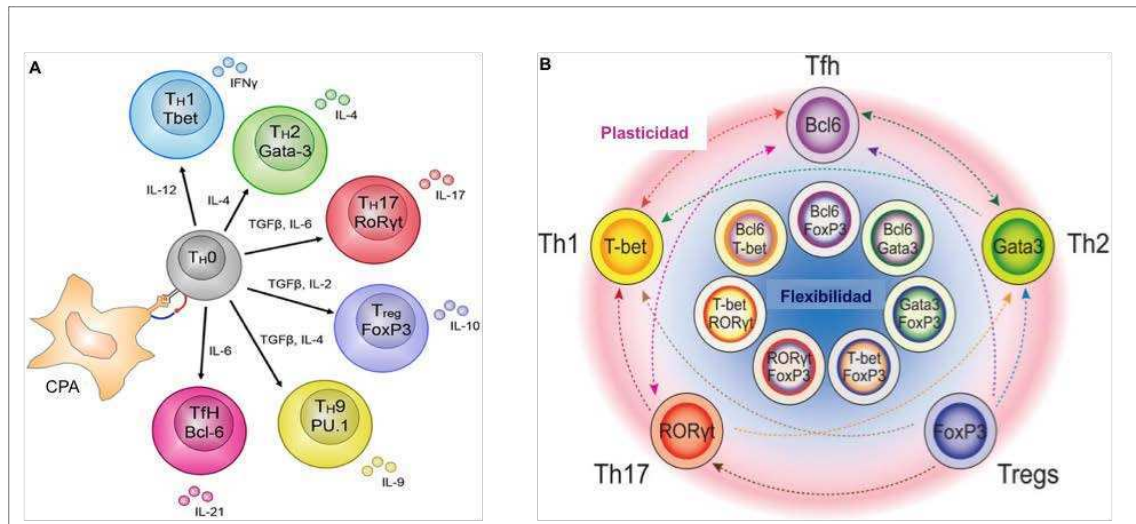


Figura 8. A. Diferenciación de las células Th CD4⁺ luego de la interacción con la CPA. Se muestran aquellas citoquinas que inducen la diferenciación a cada subtipo, los factores de transcripción que se activan y la citoquina característica secretada por cada subtipo. Adaptado de Russ et al., 2013. **B.** Plasticidad y flexibilidad entre células Th CD4⁺, que generan un panorama más complejo de los subtipos. Adaptado de Nakayama et al., 2012.

Otro fenómeno importante de la RI adaptativa es la tolerancia periférica. Además de los mecanismos de selección negativa de los linfocitos que ocurren en los órganos linfoides primarios, existen otros durante la circulación de los linfocitos por el organismo, para evitar las reacciones autoinmunes. La tolerancia periférica se lleva a cabo en los GL secundarios, tejido linfoide asociado a mucosas, tejidos linfoide terciario y en tejidos periféricos. Esta regulación se puede dar por:

- *ignorancia* antigénica: en esta situación, hay linfocitos T reactivos en el organismo pero que no han encontrado a su epítopo y permanecen en estado *naïve*. Esto puede deberse a que la expresión del Ag no supera el umbral necesario para la activación, por baja expresión del HLA-I para su presentación o presentación cruzada ineficiente en los GL (Ochsenbein, 2005).

- inducción de *anergia* funcional: a los linfocitos T se les presenta el Ag, pero en ausencia de señales co-estimuladoras (señal 2) o por fuerte señalización vía CTLA-4 o PD-1. Así, los linfocitos son incapaces de responder y permanecen en estado de inactividad (anergia) (Knoechel et al., 2006; Walker and Abbas, 2002).

- inducción de *apoptosis*: los linfocitos T que reconocen autoantígenos y por ende son activados repetidas veces, sufren muerte celular inducida por activación (Walker and Abbas, 2002).

- activación de *linfocitos T regulatorios (Treg)*: las células Treg CD4⁺ FoxP3⁺ controlan el desarrollo de la RI y protegen al organismo de desórdenes autoinmunes. Poseen un TCR específico, liberan factores inmunosupresores y tienen diferentes subpoblaciones alojadas en diferentes compartimentos (Liston and Gray, 2014).

- diferenciación a un *perfil regulatorio/inmunosupresor*: se diferencian células de linaje mieloide que contribuyen a la inmunosupresión, como las células supresoras derivadas de mieloides o macrófagos con perfil M2 (Gabrilovich et al., 2012).

1.4. La inmunovigilancia: respuesta inmunitaria anti-tumoral y evasión inmune

La idea de que el sistema de defensas pueda actuar reconociendo y eliminando tumores fue introducida por Paul Ehrlich en 1907, pero no fue hasta 1957 que Burnet y Thomas acuñaron el término de *inmunovigilancia en cáncer*. Esto implicaba que el SI era capaz de reconocer las células transformadas del organismo, dado que las mismas expresan Ag nuevos o modificados, y eventualmente eliminarlas, antes de que la enfermedad se manifieste clínicamente. Durante muchos años, debido a hallazgos contradictorios, esta teoría fue avalada y desestimada numerosas veces, pero al día de hoy es aceptada y se encuentra en continuo estudio. Actualmente, el proceso mediante el cual se llevan a cabo RI naturales frente a los tumores primarios en desarrollo fue renombrado *inmunoedición de tumores*, en gran medida para enfatizar el rol dual que juega el SI en este proceso. Específicamente, la hipótesis de la inmunoedición del cáncer sostiene que el SI no sólo protege al hospedador frente al desarrollo de tumores, sino que también puede promover el desarrollo tumoral mediante su eliminación selectiva, favoreciendo el escape de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida (Dunn et al., 2002). La inmunoedición del cáncer es un proceso que consta de 3 fases, conocidas como las 3 E: Eliminación, Equilibrio y Escape (Figura 9).

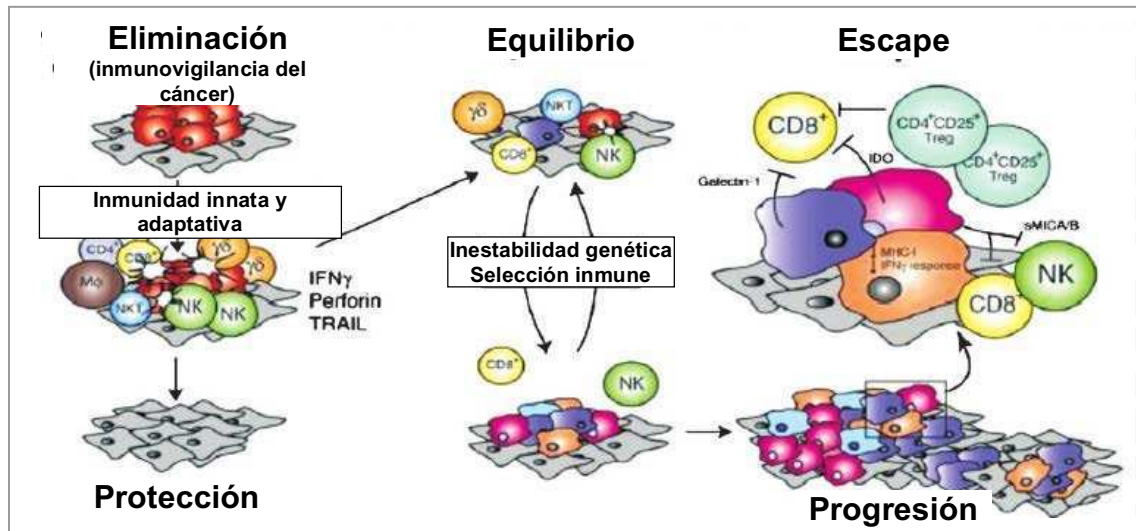


Figura 9. Fases de la inmunoedición de tumores. Adaptado de Schreiber, 2005.

La primera fase de Eliminación, lo que consideramos inmunovigilancia, es cuando las moléculas y células de la inmunidad innata y adaptativa reconocen y destruyen los tumores en desarrollo, confiriendo así protección al organismo frente al cáncer. La segunda fase es el Equilibrio, similar al concepto de latencia, que corresponde a un período extendido en el cual el tumor y el SI entran en un equilibrio dinámico de destrucción y escape tumoral. La tercera fase es el Escape, donde se desarrollan las variantes tumorales que emergen de un proceso de selección inmune de tipo Darwiniano durante la fase de equilibrio. Esas variantes se transforman en tumores detectables en la clínica, que crecen de manera irrestricta en un individuo inmunocompetente (Schreiber, 2005).

Cuando alguna célula no logra reparar sus mutaciones, pero sobrevive a la muerte celular programada, se activa el sistema de inmunovigilancia. Las células en estado inicial de transformación pueden ser detectadas y eliminadas por interacción directa de las células efectoras innatas. Esta función puede ser llevada a cabo por las células NK, mediante citotoxicidad vía perforinas y la producción de citoquinas como el IFN- γ , luego de la interacción con ligandos específicos (o la falta de ellos, como el HLA-I). También están involucradas las células NKT, que pueden reconocer glicolípidos y rápidamente secretar grandes cantidades de citoquinas de perfil *Th1* y *Th2*. De esta manera activan linfocitos T citotóxicos y NK, estableciendo un nexo entre la inmunidad innata y adaptativa. A su vez, las CD, como centinelas del daño tisular, son activadas a través de señales de peligro liberadas por células dañadas o que sufren muerte necrótica. Estas señales incluyen HSP, ATP, HMGB-1 y

otras alarminas, junto con citoquinas (Escamilla-Tilch et al., 2013). Una vez activadas, las CD inician y controlan la RI dirigida contra Ag específicos de tumor y Ag asociados a tumor (TAA, por sus siglas en inglés), activando a la vez células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas para esos Ag. Las células CD8⁺ se diferencian a linfocitos T citotóxicos, que finalmente van a destruir las células tumorales, y las CD4⁺ proveen ayuda, a través de la liberación de citoquinas. Las células T de memoria CD4⁺ y CD8⁺ juegan un rol crítico en el mantenimiento de una inmunidad protectora frente a las células transformadas. La respuesta de memoria dependerá de las señales moleculares derivadas del tumor, detectadas por la inmunidad innata. Estas señales resultan adyuvantes efectivos en las inmunoterapias en cáncer. Se ha observado que los TAA pueden generar hipersensibilidad de tipo retardada específica y que las respuestas de los CTL pueden llevar a la regresión tumoral.

Se sabe que las células tumorales, aunque posean gran cantidad de neo-antígenos inmunogénicos generados debido a su alta tasa de mutaciones, también expresan muchos Ag de diferenciación presentes en células normales (Pardoll, 2003). Esto llevó a pensar en la hipótesis de que los mayores obstáculos en la RI anti-tumoral efectiva fueran los complejos mecanismos para establecer la tolerancia por parte de las células T frente a los Ag tumorales propios (no mutados). Mientras se lleva a cabo la respuesta anti-tumoral, también se van generando mecanismos de control negativo sobre esa respuesta a través de la habilidad de los tumores de generar un microambiente tolerante, la activación de vías regulatorias negativas y la secreción de factores inhibitorios. Estas estrategias inmunosupresoras pueden ser pre-existentes, pueden surgir por mutaciones durante la proliferación tumoral o a través de la selección ejercida por el SI.

La presentación de Ag tumorales no se suele dar por vía directa desde el tumor, sino que se realiza a través de las CD. Son éstas quienes inclinan la respuesta de linfocitos T hacia la activación o la tolerancia, sujetas a las condiciones y contexto iniciales en las que encontraron el Ag. La captura antigénica realizada en un ambiente no-inflamatorio no induce respuestas de linfocitos T productivas, provocando el desarrollo de tolerancia de las células T (Steinman et al., 2003). A medida que el tumor progresa, el microambiente no sólo omite señales inflamatorias para la activación de las CD, sino que también comienza a generar mecanismos inmunosupresores adicionales, como la liberación de IL-10, TGF- β o VEGF, que profundizan el impacto negativo sobre las CD. De esta manera, las CD que capturan Ag tumorales adquieren propiedades tolerogénicas y por ende inducen tolerancia de los linfocitos

T frente a esos Ag. Muchas de las señales solubles tolerogénicas generadas por el tumor y las CD afectan directamente a los clones T reactivos contra el tumor (Figura 10.A).

Las células tumorales también presentan múltiples mecanismos inmunosupresores para evadir las respuestas efectoras de las células T, ya sea evitando el reconocimiento inmune, inhibiendo la apoptosis inducida o incluso contraatacando a los linfocitos efectores (Igney and Krammer, 2002; Mandai et al., 2016) (Figura 10.B). Al aumentar la frecuencia de mutaciones, se generan variantes tumorales con fallas en la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica (proteasoma, complejo TAP, β -2 microglobulina, cadenas α de los HLA-I), escapando así del reconocimiento directo de las células T. Se produce además un bloqueo o defecto en la señalización de los TCR proximales al microambiente tumoral, junto con la secreción de factores inmunosupresores y/o pro-apoptóticos, la activación de vías co-estimuladoras negativas (CTLA-4, PD-1), restricciones metabólicas (IDO) y el reclutamiento específico de poblaciones de células regulatorias (Treg, MDSC). Todos estos mecanismos cooperan para dar lugar a la progresión tumoral, limitando la capacidad del SI de controlar el tumor y disminuyendo la efectividad de las estrategias inmunoterapéuticas, diseñadas para erradicar exitosamente a las células tumorales (Rabinovich et al., 2007). El estudio y la comprensión de la regulación espacio-temporal de estos mecanismos son de especial interés para superar estas condiciones tolerizantes impuestas por el microambiente tumoral, en especial al momento de diseñar terapias anti-tumorales y poder obtener RI eficientes.

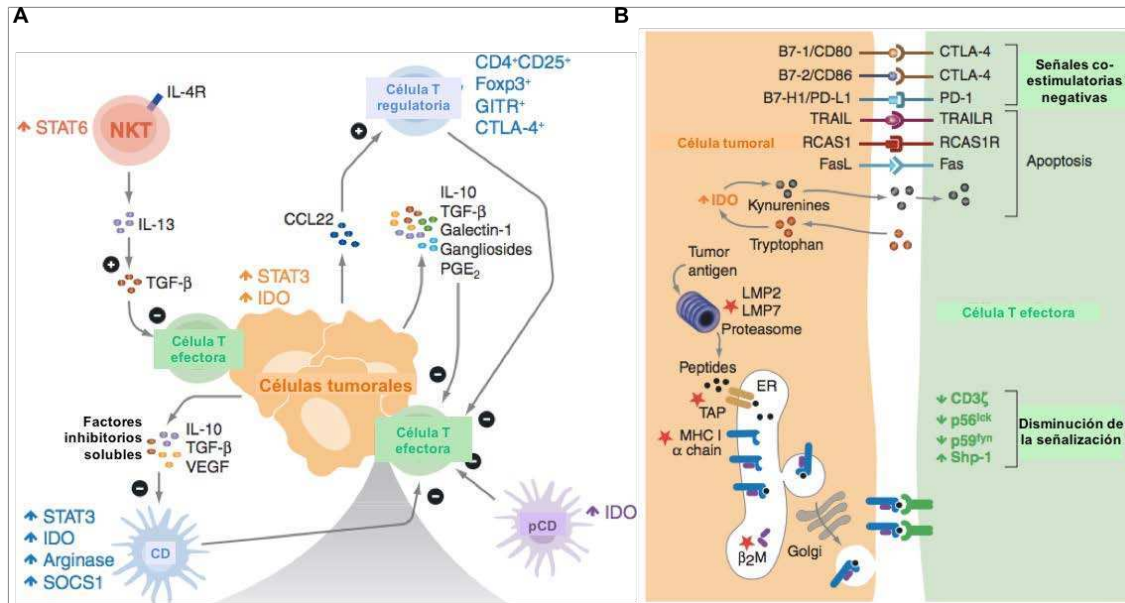


Figura 10. A. Esquema los factores solubles liberados por las células tumorales que condicionan el perfil de las CD que capturan Ag y sobre la función efectora en el microambiente tumoral. B. Esquema de los mecanismos de las células tumorales para evadir la respuesta efectora de las células T, a través de la disminución de la presentación antigénica y la señalización del TCR, inducción de señales co-estimuladoras negativas y la apoptosis en los linfocitos T. Adaptados de Rabinovich et al., 2007.

2. El desarrollo del cáncer

El término cáncer no se refiere a una, si no a un conjunto de enfermedades relacionadas. Corresponden a más de un centenar y medio de enfermedades de duración variable y de progresión fatal, de no mediar el adecuado tratamiento. En todos los tipos de cáncer, algunas células del cuerpo comienzan a dividirse de manera irrestricta y se diseminan por el tejido adyacente. Además, pueden eventualmente desarrollar colonias en órganos distantes, denominadas metástasis, por vía hemática y/o linfática (Pautas en Oncología 2015).

Normalmente, las células humanas crecen y se dividen para generar nuevas células, a medida que el cuerpo lo necesita. Cuando las células envejecen o están dañadas, entran en el proceso de muerte celular programada denominado apoptosis, y nuevas células toman su lugar. Cuando se desarrolla el cáncer, este ciclo se ve alterado. A medida que las células se vuelven más y más anormales, las células envejecidas o dañadas sobreviven en vez de morir y se generan nuevas células cuando éstas no son necesarias. Estas células extra se pueden dividir virtualmente de manera indefinida y, si no logran ser eliminadas por el SI a tiempo, se produce

el escape tumoral y pueden formar masas indiferenciadas de tejido, denominadas tumores, que pueden ser detectados en la clínica. La mayoría de los cánceres forman tumores sólidos, a excepción de los cánceres de la sangre, como las leucemias, que generalmente no lo hacen (NIH, 2016, www.cancer.gov).

Es importante aclarar que no todos los tumores corresponden a la manifestación clínica del cáncer. El cáncer es una enfermedad maligna y los tumores que desarrolla pueden diseminarse e invadir otros tejidos, adyacentes o distantes. Existen los tumores benignos, que a diferencia de los malignos, se mantienen encapsulados y no se diseminan, aunque a veces pueden ser de gran tamaño. En general, estos tumores pueden ser removidos y no vuelven a crecer, a diferencia de los malignos, que sí pueden hacerlo. En general, los tumores benignos no representan un riesgo para la vida, con excepción de aquellos ubicados en el cerebro.

El cáncer es una enfermedad de base genética, es decir, que es causada por los cambios producidos en los genes correspondientes a funciones de control celular. A diferencia de otras enfermedades genéticas, no hay una única mutación que genere el cáncer, si no que debe darse una combinación de ellas para que la enfermedad se desarrolle. Las alteraciones en tres tipos de genes contribuyen principalmente a la tumorigénesis: los proto-oncogenes, los genes supresores de tumor y los genes de estabilidad y reparación del ADN, conocidas como mutaciones *drivers* o conductoras. Los proto-oncogenes están involucrados en el normal crecimiento y división de las células. Cuando se ven alterados, se transforman en oncogenes, promoviendo un crecimiento y supervivencia anormal. Los genes supresores de tumor se encargan del control del ciclo celular. Los cambios en estos genes producen una división celular desregulada. Por último, los genes de reparación del ADN corrigen los daños producidos en el ADN. Cuando se producen mutaciones en estos genes, las células tienden a desarrollar mutaciones adicionales en otros genes (Vogelstein and Kinzler, 2004).

Estos cambios o mutaciones pueden ser pre-existentes, es decir heredadas de los padres, o pueden surgir a lo largo de la vida de la persona como resultado de errores durante la división celular o por exposición ambiental a sustancias que dañan el ADN, conocidos como carcinógenos. Cada cáncer presenta una combinación única de cambios genéticos. A medida que el cáncer progresa, se van produciendo nuevas modificaciones adicionales, lo que genera que incluso en el mismo tumor haya células con diferentes cambios genéticos (Greaves and Maley, 2012). En general, las células tumorales tienen más mutaciones que otras células somáticas normales, hecho más relacionado con las consecuencias del cáncer que con sus causas.

El cáncer es una enfermedad compleja que comprende múltiples mecanismos y capacidades adquiridas durante diferentes etapas del desarrollo de los tumores. En la actualidad, se han logrado determinar varios de estos hitos característicos o *hallmarks*, que constituyen los principios necesarios para comprender y abordar la complejidad de la patología (Hanahan and Weinberg, 2011). Éstos incluyen el mantenimiento de las señales proliferativas, la evasión de los supresores del crecimiento, la resistencia a la muerte celular, el potencial replicativo indefinido, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y la metástasis. De manera subyacente, se encuentra la inestabilidad genómica y las mutaciones, que generan la diversidad genética que facilita su adquisición, y la inflamación, que fomenta la acción de muchas de estas características. En los últimos años se han sumado otras dos características emergentes, que son la desregulación o reprogramación del metabolismo celular y la evasión de eliminación por parte del SI. Más allá de los procesos particulares de las células tumorales, los tumores exhiben otra dimensión de su complejidad: el microambiente tumoral, un repertorio de células aparentemente normales que contribuyen a la adquisición de los rasgos característicos del tumor (Figura 11).

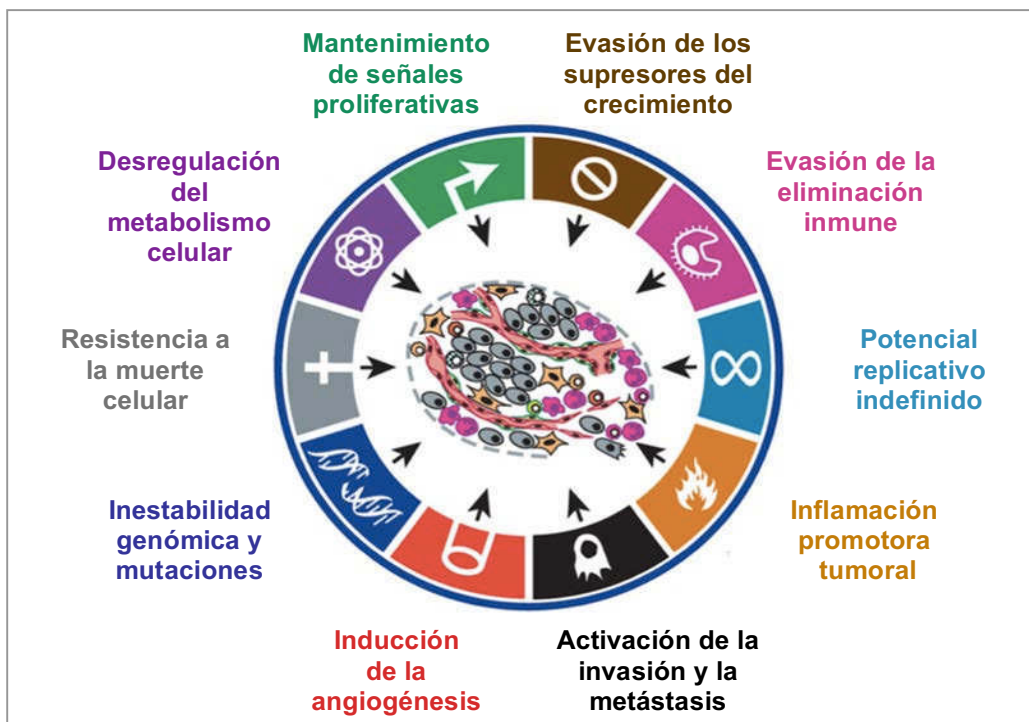


Figura 11. *Hallmarks* del cáncer. Adaptado de Hanahan and Weinberg, 2011.

2.1. El cáncer en números

El cáncer figura entre las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. En 2012 se registraron aproximadamente 14 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes relacionadas, afectando a poblaciones de todos los países y regiones. Estas estimaciones corresponden a tasas de incidencia y mortalidad, estandarizadas por edad, de 182 y 102 por cada 100.000 habitantes, respectivamente. La prevalencia estimada para 2012 indica que había 32,6 millones de personas que habían sido diagnosticadas con la enfermedad durante los 5 años previos. El número de nuevos casos se espera que incremente en alrededor de un 70% a lo largo de las siguientes dos décadas, escalando de 14 millones en 2012 a 22 millones para 2032 (Stewart and Wild, 2014).

Para todos los tipos de cáncer combinados (excluyendo el cáncer de piel no melanoma) las tasas de incidencia más altas están asociadas con los países de altos ingresos de América del Norte y Europa Occidental, junto con Japón, República de Corea, Australia y Nueva Zelanda. Sin embargo, más del 60% del total anual de nuevos casos ocurren en África, Asia y América Central y del Sur. Asimismo, estas regiones dan cuenta del 70% de las muertes mundiales por cáncer (Figura 12). La distribución del cáncer en las distintas regiones del mundo indica marcadas, y a veces extremas, diferencias con respecto a tipos particulares de tumores. Esta información es clave para entender las causas y por ende el desarrollo de medidas preventivas.

Para 2012, los 5 sitios más frecuentes de cáncer en los hombres fueron pulmón, próstata, colon-recto, estómago e hígado. Entre las mujeres, éstos fueron mama, colon-recto, pulmón, cuello de útero y estómago. Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer están relacionadas a 5 principales riesgos dietarios y de conducta: alto índice de masa corporal, bajo consumo de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante en cáncer, causando alrededor del 20% de las muertes globales por cáncer y cerca del 70% de las muertes por cáncer de pulmón. Las infecciones virales causantes de cáncer, como el virus de la hepatitis B o C y el virus del papiloma humano, son responsables de hasta el 20% de las muertes por cáncer en países de ingresos medios o bajos (Stewart and Wild, 2014).

La Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta (172,3-242,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes) (Ferlay et al., 2013). Esta estimación corresponde a más de 100.000 nuevos casos en ambos sexos por año, con porcentajes similares para hombres y mujeres. El cáncer de mama encabeza esta estadística, con más de 18.700 casos nuevos por año (18% del total general y 36% del total en mujeres), y coincide también en ser el cáncer con mayor tasa de incidencia en mujeres, con 71 casos nuevos por cada 100.000 mujeres. Lo sigue el cáncer de próstata, con 44 casos nuevos, y de pulmón, con 32,5 casos nuevos, ambos por cada 100.000 hombres. En la Argentina, los tumores causan el 20% del total de las muertes que se producen anualmente en el país. Esto representa aproximadamente 60.000 muertes por año, de las cuales más del 90% se produce en personas mayores de 44 años. El cáncer de pulmón ocasiona 9.000 muertes por año, 15% del total de las defunciones por cáncer, con diferencias marcadas entre ambos sexos ya que el 70% corresponden a los hombres. Le sigue en importancia el cáncer colorrectal (11%) y el de mama (9%) (Instituto Nacional del Cáncer, www.msal.gov.ar/inc/).

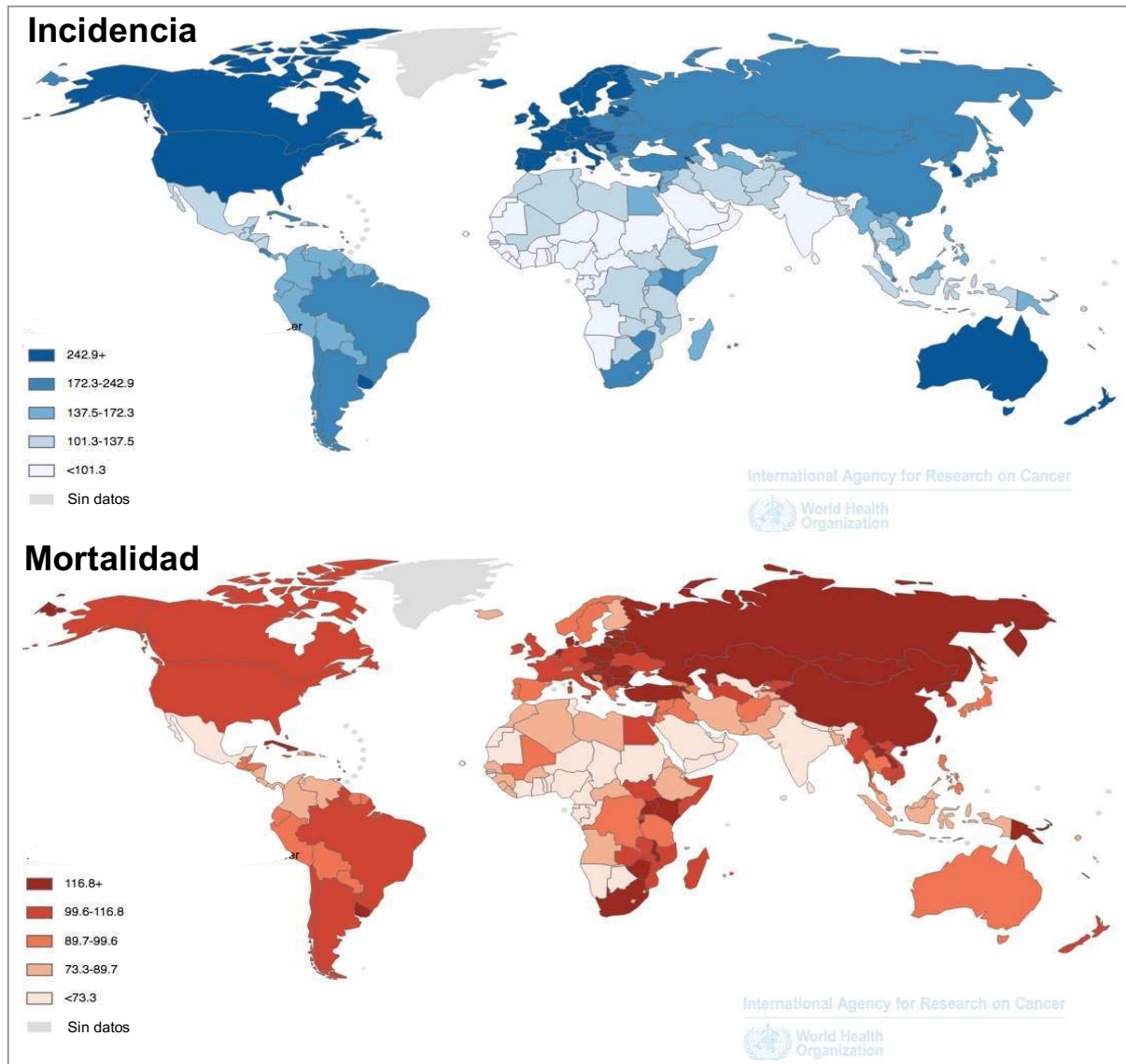


Figura 12. Tasas de incidencia y mortalidad por cáncer en ambos sexos en el mundo en 2012. Las tasas están calculadas por cada 100.000 habitantes. Adaptado de la *International Agency for Research on Cancer, World Health Organization* (Ferlay et al., 2013).

2.2. El melanoma cutáneo: estadísticas, desarrollo y progresión

El melanoma cutáneo constituye alrededor del 4% de los nuevos casos de neoplasias diagnosticados a nivel mundial, aunque con distribución diferencial marcada entre regiones geográficas, y presenta la tasa de incidencia con más rápido aumento en los últimos años. Según las estadísticas de los países con mayor incidencia, como los Estados Unidos, se calcula que un 2,1% de la población será diagnosticada con la enfermedad en el transcurso de su vida. En 2013, se estimaba que en Estados Unidos poco más de un millón de personas conviven con el melanoma cutáneo. Para 2016 se estiman 76.000 nuevos casos y más de 10.000 muertes a

causa de esta enfermedad (Brunssen et al., 2016, *www.cancer.gov*). La Argentina se encuentra en el rango de países con incidencia media/alta para el melanoma, con una tasa ajustada por edad de 2,9 nuevos casos por cada 100.000 habitantes. Se calcula una prevalencia a 5 años de 13 casos por cada 100.000 habitantes, en la población adulta. Si bien el melanoma detectado de manera precoz tiene buen pronóstico y se puede curar mediante cirugía, cuando la enfermedad se encuentra diseminada presenta bajas probabilidades de sobrevivida a largo plazo.

El melanoma presenta varios factores de riesgo conocidos:

- La exposición a la radiación ultravioleta
- La presencia de lunares (nevos benignos)
- La piel clara, el pelo claro y las pecas
- Historia familiar de melanoma
- Historia personal de melanoma u otro cáncer de piel
- Un SI debilitado
- El sexo masculino y la edad avanzada
- Xerodermia pigmentosa

A pesar de no ser la forma más común, el melanoma es el responsable de la mayoría de las muertes relacionadas al cáncer de piel. Su alta tasa de mortalidad se debe mayormente a la falta de opciones de tratamiento efectivo en estadios avanzados o de enfermedad diseminada. De esta manera, los pacientes con melanoma avanzado tienen una expectativa de vida media menor a un año, con sólo un 17% de pacientes que sobreviven más allá de los 5 años luego del diagnóstico (NIH, *www.cancer.gov*). La predisposición para el desarrollo de melanoma es genéticamente heterogénea. Se han estudiado y descrito genes y vías relacionadas con el desarrollo de la enfermedad (Dutton-Regester and Hayward, 2012). La susceptibilidad en algunos melanomas familiares con grandes números de casos es consistente con la herencia autosómica dominante de un solo gen principal. Pero esto no responde a la mayoría de las familias con antecedentes, donde no se ve un único gen responsable de la transmisión del melanoma, si no una herencia de modo poligénico (De Snoo and Hayward, 2005).

Los estadios de desarrollo de la enfermedad y las mutaciones asociadas a cada etapa se han estudiado ampliamente, aunque siguen en constante estudio para buscar y definir nuevos posibles *targets* terapéuticos contra el melanoma (Akbari et al., 2015; Vultur and Herlyn, 2013). En el melanoma, la señalización por la vía de las MAPK puede estar constitutivamente activada a través de alteraciones en los receptores de membrana o a través de mutaciones en

RAS o BRAF. BRAF está mutado en aproximadamente el 60% de los melanomas y el 90% de esas mutaciones presentan la mutación V600E, generando la activación constitutiva de la quinasa. A pesar de que las mutaciones de PI3K no son frecuentes, la vía se encuentra generalmente aumentada, probablemente por pérdida de PTEN, con consecuencias sobre efectores *río abajo* como AKT, mTOR, NF- κ B, p53 y otros, que probablemente contribuyen a un fenotipo más agresivo del melanoma (Akbari et al., 2015; Dutton-Regester and Hayward, 2012; Vultur and Herlyn, 2013).

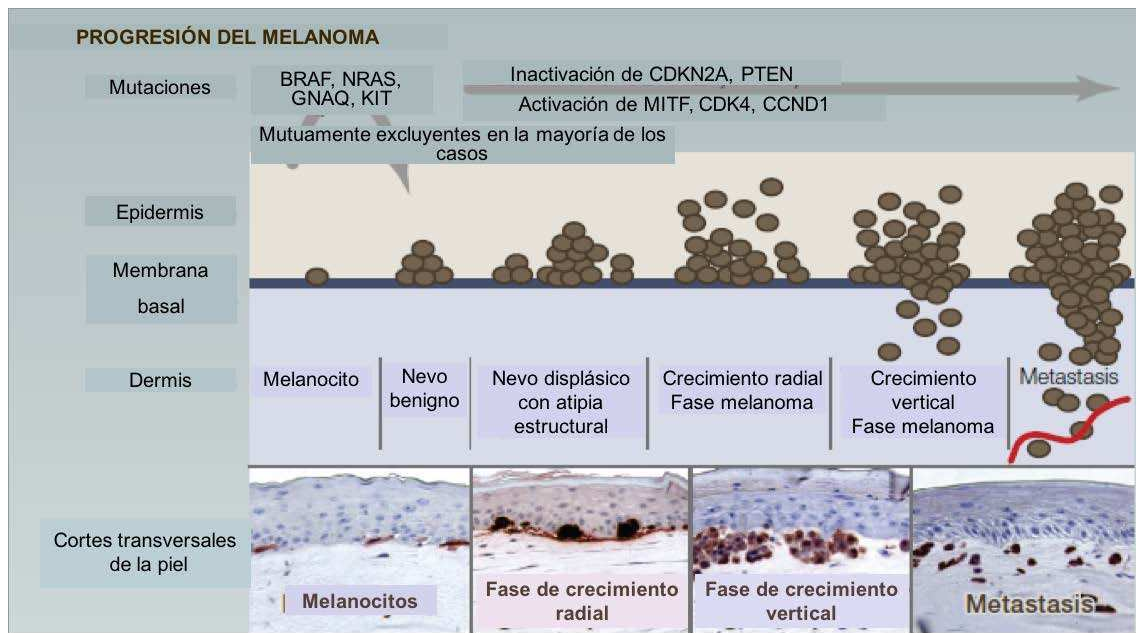


Figura 13. Progresión del melanoma en función de las mutaciones adquiridas. Descripción de su localización en la piel y aspecto histológico de cada fase de progresión. Adaptado de Vultur and Herlyn, 2013.

Se conocen las mutaciones en genes *drivers* que dan origen a una transformación de los melanocitos. Éstas se producen en los genes BRAF, NRAS, GNAQ o KIT, y suelen ser mutuamente excluyentes. Durante la progresión del melanoma, se van adquiriendo otros cambios genéticos progresivamente, como la inactivación de CDKN2A y PTEN, junto con la activación de MITF, CDK4 y CCND1, que llevan a la transformación de un nevo benigno o displásico en melanoma. Durante la adquisición de estos cambios, el melanoma transita desde una fase de crecimiento radial en la epidermis, a una fase de crecimiento vertical, con ruptura de la membrana basal e invasión de la dermis, hasta el melanoma metastásico (Figura 13).

2.3. Características fenotípicas y antigénicas del melanoma

El melanoma se muestra sumamente resistente a terapias tradicionales como la quimioterapia. Sin embargo, ofrece posibilidades de intervención inmune, ya que se caracteriza por expresar múltiples Ag que pueden ser reconocidos por el SI y generar una respuesta específica. Las células de melanoma expresan una amplia variedad de Ag de diferenciación melanocítica, que son principalmente proteínas que están asociadas a las membranas de los melanosomas e involucradas en la producción de la melanina. Entre éstos se encuentran los Ag Melan-A/MART-1, como Ag modelo profundamente estudiado en melanoma (De Mazière et al., 2002; Romero et al., 2002), gp100, tirosinasa, *tyrosinase-related protein*(Trp)-1 y Trp-2. También se sabe que expresan algunos Ag de la línea germinal masculina, conocidos como Ag cáncer-testis, que incluyen a las familias de proteínas BAGE, GAGE y MAGE y en particular la proteína NY-ESO-1. Otro grupo de Ag de interés estudiado en melanoma son unos glicoesfingolípidos denominados gangliósidos. Estos Ag pueden ser presentados por los complejos CD1, una familia de moléculas presentadoras de Ag lipídicos, no polimórficas y relacionadas estructuralmente a los complejos HLA-I (Cao et al., 2002; Wu et al., 2003). Los gangliósidos son expresados en todas las células de los mamíferos, pero presentan diferencias moleculares a nivel de sus cadenas carbonadas durante el desarrollo fetal y en tumores, considerándose así un Ag onco-fetal de blanco terapéutico (Krengel and Bousquet, 2014; Peguet-Navarro et al., 2003). Por último, las células de melanoma exhiben Ag tumorales derivados de mutaciones y productos génicos atípicos, cuya inmunogenicidad puede ser producto de una alteración en la estabilidad o tráfico de la proteína, así como por una visibilidad aumentada. Muchos de estos Ag han reportado ser capaces de despertar RI celular específica, con un perfil Th1 y la generación de linfocitos CD8⁺ reactivos contra el tumor (Guevara-Patiño et al., 2003; Heemskerk et al., 2013).

Mediante el análisis mutacional del genoma de 7.042 cánceres primarios de 30 tipos distintos, se determinaron 4.938.362 mutaciones somáticas, correspondientes a sustituciones e inserciones y deleciones, pudiendo identificar 20 firmas mutacionales en los tumores humanos. De este análisis se desprende que el melanoma es el tipo tumoral con mayor prevalencia de mutaciones somáticas, una mediana de 20 por Megabase, llegando a un máximo de 400 por Megabase (Alexandrov et al., 2013) (Figura 14).

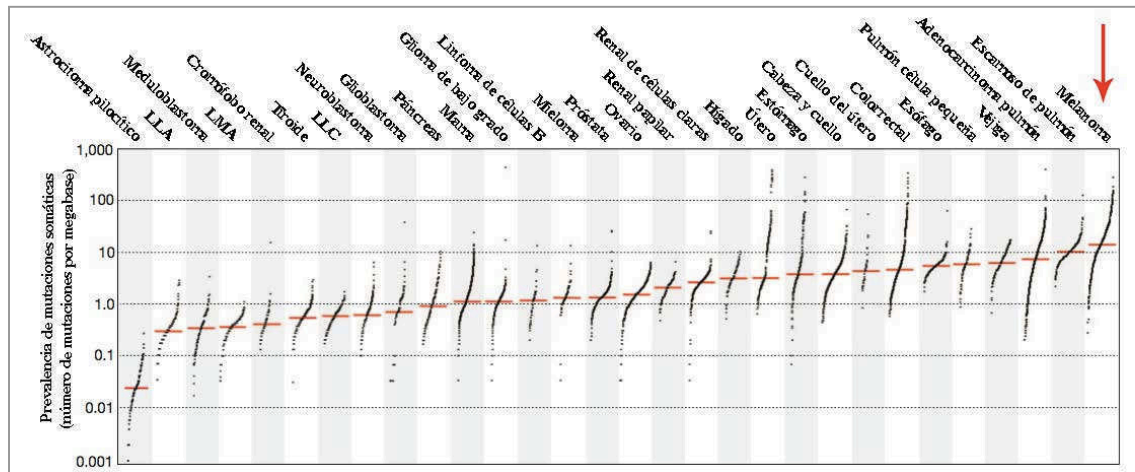


Figura 14. Prevalencia de mutaciones somáticas agrupada por tipo de cáncer. Los valores puntuales corresponden al número de mutaciones por Megabase y se expresa la mediana en cada caso. Adaptado de Alexandrov et al., 2013.

La aparición de neo-epitopes debido a estas mutaciones ha sido aprovechada a la hora de obtener nuevos posibles *targets* terapéuticos en melanoma. Una aproximación de los últimos años ha sido el análisis del *ligandoma* de las células tumorales de melanoma, es decir el conjunto de péptidos que son cargados en las moléculas de HLA-I. Se identifican las proteínas de origen de esos péptidos y se analiza la capacidad inmunogénica frente a linfocitos CD8⁺ (Jarmalavicius et al., 2012). Gracias a nuevas herramientas informáticas y de secuenciación, se pueden analizar las mutaciones de cada paciente, identificando neo-epitopes y su putativa capacidad inmunogénica, y así utilizarlo como una herramienta para el diseño de terapias personalizadas (Castle et al., 2012; Fritsch et al., 2014). Al día de hoy hay evidencias de la respuesta de linfocitos T específicos contra neo-antígenos en pacientes de melanoma, con una dinámica de interacción entre las células T y el tumor que induce la inmunoección de los neo-epitopes, pero con una generación de nuevos clones reactivos en los linfocitos infiltrantes del tumor (Verdegaal et al., 2016).

3. Inmunoterapia en cáncer

Tradicionalmente la terapia elegida por los oncólogos para el tratamiento del cáncer había sido la cirugía. Ésta podía ser combinada con métodos que resultaban efectivos, al menos durante un cierto período, en la reducción del tamaño tumoral, como la radioterapia y en última instancia la quimioterapia. Con la excepción del uso del *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), que

muestra muy buenos resultados en el tratamiento del cáncer de vejiga no invasor (Sylvester, 2011), la idea de estimular al SI para combatir los tumores fue relegada durante muchos años, con extremas fluctuaciones en la actitud frente al tema. Hasta que finalmente, para la década de los 90, se logró llegar a un consenso sobre la función de inmunovigilancia sobre los tumores y se avanzó en el campo de la inmunoterapia (Maio, 2012; Parish, 2003).

La inmunoterapia busca utilizar las herramientas y procesos propios del SI para idealmente eliminar, o al menos controlar el crecimiento de los tumores. A grandes rasgos, la inmunoterapia se puede dividir en terapias pasivas, principalmente con el uso de anticuerpos monoclonales, y terapias activas, que involucran la manipulación directa de células efectoras del paciente. Existen evidencias que indican que es posible inducir RI anti-tumorales específicas ya sea naturalmente (espontáneas) o en forma terapéutica (inducidas). Sin embargo, la inmunoterapia representa un gran desafío ya que al momento de la progresión tumoral ya se ha producido el escape de la inmunovigilancia (Pautas en Oncología 2015).

Los tratamientos citotóxicos tradicionales tienen en general un efecto directo rápido sobre el crecimiento y el tamaño tumoral, pero se mantiene poco tiempo luego de ser administrados. Por el contrario, al (re)activar la función efectora anti-tumoral o inhibir los mecanismos supresores, se obtiene una respuesta directa más lenta, pero se puede desarrollar memoria inmunológica y protección a largo plazo. La destrucción tumoral inducida por la inmunoterapia tiene efecto retardado o puede estar precedida de un período de crecimiento tumoral aparente, pero luego alcanza a controlarlo, e incluso a producir regresión tumoral (Figura 15). La paradoja inicial es explicada por la biología diferencial de la RI como tratamiento y ha llevado a revisar y flexibilizar los criterios de evaluación de la respuesta a la terapia, que tradicionalmente se hace por los criterios *RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)*, antes de declarar el fracaso del tratamiento (Madan et al., 2010; Wolchok et al., 2009)(Wolchok 2009, Madan 2010).

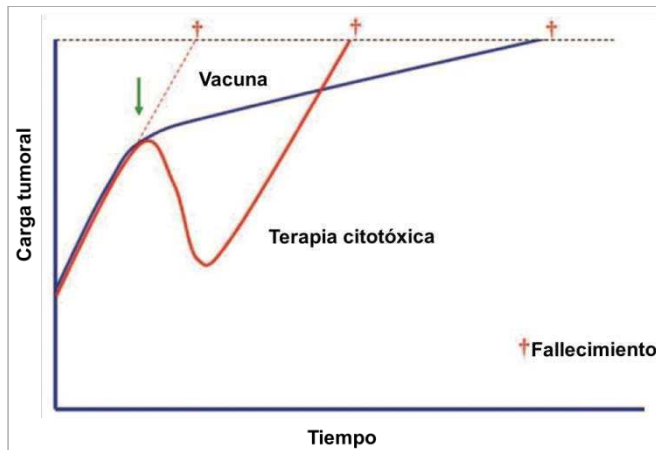


Figura 15. Paradoja del efecto de la inmunoterapia. Esquema comparativo del crecimiento tumoral en el tiempo, luego de la aplicación del tratamiento (flecha verde). La línea punteada roja corresponde al sin tratamiento, la línea entera roja a la terapia citotóxica y la línea entera azul al tratamiento con vacuna. Adaptado de Madan et al., 2010.

La eficacia de la terapia anti-tumoral depende principalmente de cuatro componentes críticos: la respuesta de células T CD8⁺ efectoras, la calidad de las células Th CD4⁺, la eliminación y/o desactivación de los linfocitos Treg y la disrupción del microambiente tumoral inmunosupresor. Al requerirse una respuesta compleja, se necesitan desarrollar protocolos y diseños de tratamiento complejos, que permitan abarcar todos esos aspectos. Muchos enfoques y estrategias de la inmunoterapia en cáncer han reportado perfiles de seguridad con efectos tóxicos sistémicos más suaves y tolerables comparados con otras terapias tradicionales o dirigidas. Más aún, se han visto efectos adyuvantes sobre la inmunoterapia al utilizar dosis bajas, de menor toxicidad, tanto de radioterapia (Takeshima et al., 2010) como de quimioterapia (Kang et al., 2013), al producir una muerte inmunogénica en el tumor, generando un microambiente más permisivo para la inmunoterapia, proveyendo señales pro-inflamatorias y disponibilidad antigénica.

3.1. Uso de anticuerpos monoclonales

Existen nueve anticuerpos monoclonales aprobados para el tratamiento de tumores sólidos y hematológicos, que tienen como blanco a las proteínas asociadas a tumor: Her2/neu, EGFR, VEGF, CD20, CD52 y CD33. Además de antagonizar las vías oncogénicas, estos compuestos bioterapéuticos pueden actuar como agentes opsonizantes de las células tumorales y disparar su muerte o eliminación por ADCC o fagocitosis. Estudios que se llevan a cabo en modelos murinos y en pacientes han demostrado la posibilidad de que en algunas circunstancias puedan estimular respuestas adaptativas (Taylor et al., 2007). Más recientemente, se han logrado conjugar toxinas de manera exitosa a estos anticuerpos e inducir

respuestas clínicas en pacientes que eran refractarios al anticuerpo desnudo (Lewis Phillips et al., 2008). La administración conjunta con citoquinas inmunoestimuladoras, como la IL-2 o el factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos (GM-CSF), pueden aumentar la eficacia de la terapia con anticuerpos.

Actualmente se encuentran en desarrollo estrategias para frenar o neutralizar los mecanismos inhibitorios del SI, presentes en el microambiente tumoral antes mencionados (Figura 10). Esto se puede lograr o bien disminuyendo la actividad de las moléculas supresoras y/o aumentando la actividad de las moléculas estimuladoras (Figura 16). Para esto se están generando, y probando en la clínica, anticuerpos monoclonales que se unen a los receptores co-estimuladores/co-inhibitorios y sus ligandos, de manera tal de antagonizar la inmunosupresión o activar la amplificación de la RI (Vasaturo et al., 2013). En cuanto a estas terapias, el foco en los últimos años ha estado sobre los llamados puntos de control inmune, centrados en las moléculas CTLA-4 y PD-1 (Madorsky Rowdo et al., 2015). Se han llevado a cabo múltiples ensayos clínicos en distintos tipos de tumores, con muchos buenos resultados, que hacen de estas terapias estén en el centro de atención actualmente.

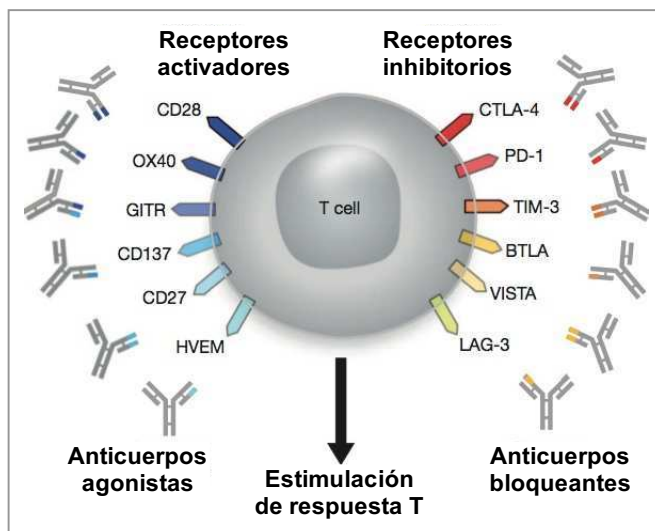


Figura 16. Receptores activadores e inhibitorios de las células T que presentan anticuerpos agonistas o bloqueantes, respectivamente. Adaptado de (Mellman et al., 2011).

3.2. Transferencia adoptiva de células efectoras

La transferencia adoptiva de linfocitos con propiedades tumorocidas puede, en teoría, evitar la abrumadora tarea de romper la tolerancia a los Ag tumorales y generar una alta frecuencia de células T de alta avidéz. El descubrimiento de procedimientos, como la linfodepleción, que facilitan la transferencia adoptiva de células T ha permitido la reinfusión

exitosa de linfocitos infiltrantes de tumor, expandidos *ex vivo*, en pacientes con melanoma. Los TIL resultan una población potencialmente exitosa, ya que son linfocitos potencialmente específicos contra Ag tumorales. Estas terapias han tenido buenas respuestas clínicas, algunas de las cuales resultaron completas y duraderas (Rosenberg et al., 2008). Los avances en los métodos de cultivo e ingeniería genética de las células T han permitido el desarrollo de una alternativa a los linfocitos infiltrantes de tumor. A través de vectores retrovirales, se pueden clonar receptores T específicos o receptores antigénicos quiméricos (CARs, por sus siglas en inglés) en células T (Figura 17). Esto permite extender la terapia a una población mucho más grande de pacientes, sin depender de la posibilidad de operar el tumor o de la cantidad de linfocitos infiltrantes que se puedan extraer del tumor operado. El uso de CARs también hace prescindible la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica intrínseca de los tumores, ya que reconocen las proteínas de superficie en su estado nativo a través del fragmento variable de las inmunoglobulinas. Los resultados preliminares en la clínica parecen muy prometedores, aunque hay varios parámetros del diseño que todavía requieren modificaciones adicionales para asegurar la seguridad de su uso y la obtención de respuestas duraderas en el tiempo. Principalmente, el foco está puesto en la elección del *target* molecular, así como su localización y nivel de expresión, para dirigir y activar las células T en el microambiente tumoral, junto con los costos y complicaciones para la producción de las células efectoras. Una aproximación más conveniente ha sido el desarrollo de anticuerpos biespecíficos, que conectan al TCR específico con el Ag en la superficie de la célula tumoral, aunque por ahora presenta serios efectos neurotóxicos y baja eficiencia por el rápido *clearance* del organismo del fragmento de anticuerpo (Mellman et al., 2011).

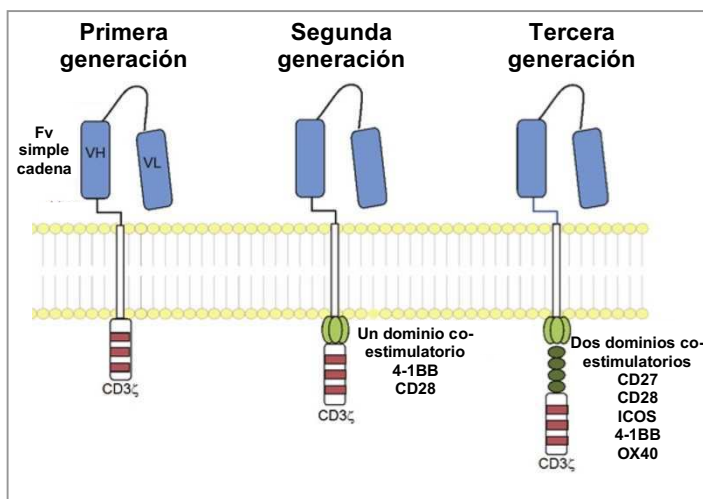


Figura 17. Diseño de los CAR para las terapias anti-tumorales. Adaptado de (Maude et al., 2016).

3.3. Vacunas anti-tumorales terapéuticas

Las vacunas terapéuticas en cáncer son un foco activo de investigación y evaluación activo, alimentadas por la promesa de ser una herramienta exitosa en el tratamiento de la enfermedad, con menores niveles de toxicidad sistémica. La vacunación terapéutica se utiliza como tratamiento adyuvante en pacientes con alto riesgo de recurrencia, para evitar o retrasar la recaída a través de la inducción de inmunidad específica contra el tumor para controlar la enfermedad microscópica diseminada. El diseño de vacunas anti-tumorales terapéuticas, al igual que las conocidas vacunas profilácticas (Moyer et al., 2016), implica el proceso activo de utilizar e inducir los mecanismos naturales de la iniciación de la RI dirigida, en este caso, a Ag tumorales. Las CD están directamente relacionadas con el diseño de las vacunas, ya sea por su manipulación directa en la preparación o mediante la entrega de Ag o adyuvantes *in vivo*. Ambas estrategias han sido explotadas ampliamente para el desarrollo de respuestas anti-tumorales (Apostolopoulos et al., 2013; Galluzzi et al., 2012; Senovilla et al., 2013; Vacchelli et al., 2012).

Actualmente los caminos llevan a: (a) la optimización de vacunas basadas en CD para inducir una fuerte inmunidad CD4⁺ y CD8⁺ específica que perdure en el tiempo para controlar la enfermedad en estadios tempranos y (b) el desarrollo de estrategias que combinen vacunas con CD inmunogénicas con el uso de anticuerpos monoclonales y otros agentes inmunomodulatorios, para los estadios avanzados de la enfermedad. Los esfuerzos en el desarrollo de las vacunas anti-tumorales se centran en la ruptura del estado de tolerancia sistémica del SI del paciente y redireccionar la respuesta hacia un estado de células T efectoras (Teff) activas, para llevar eventualmente a la regresión tumoral. Este punto continúa siendo un desafío importante al analizar las respuestas objetivas en los pacientes, con un constante debate sobre la relevancia clínica de las vacunas luego de años de investigación en el tema (Butterfield, 2013; Galluzzi et al., 2012; Kreutz et al., 2013). Incluso se han desarrollado metodologías para hacer simulaciones *in silico* y modelar protocolos de tratamiento con vacunas basadas en CD, intentando predecir su eficacia (Depillis et al., 2013). Sin embargo, más allá de los múltiples parámetros utilizados en el diseño de las vacunas, las variables intrínsecas presentes en cada paciente pueden influenciar de igual manera la RI que la vacuna pueda generar (Brodin et al., 2015).

Hay varios pasos fundamentales en la formulación de las vacunas que impactan colectivamente sobre la RI generada y finalmente en el resultado clínico. El diseño de una vacuna debe considerar la vía de administración (Bouvier et al., 2011), el formato y la cantidad

de Ag que se va a utilizar (Henrickson et al., 2013; Rosalia et al., 2013; Wang et al., 2012), el sistema de administración (Fox et al., 2013) y el agregado de diferentes inmunoestimulantes que lleven a una activación de linfocitos T CD8⁺ *in vivo* (Duewell et al., 2011; Perret et al., 2013) y la generación de memoria inmunológica a largo plazo (Goldinger et al., 2012). Las respuestas clínicas favorables requieren la activación de un perfil inmune Th1 y se ha reportado que una alta relación entre los linfocitos Teff Ag-específicos inducidos respecto de los Treg resulta un parámetro predictivo del beneficio clínico de las vacunas terapéuticas (Welters et al., 2010). La localización de los linfocitos Teff CD8⁺ impacta sobre su fenotipo y su función. Las células CD8⁺ infiltrantes en melanoma expresan mayores niveles de los receptores PD-1 y de CTLA-4, ambos asociados con el agotamiento funcional, que sus contrapartes en tejido normal y en circulación (Ahmadzadeh et al., 2009). Junto con los linfocitos Teff CD8⁺, las células T CD4⁺ tienen el poder de influenciar y dirigir la respuesta anti-tumoral generada. Las CD cargadas con Ag tumorales pueden inducir la proliferación de células T CD4⁺ que, combinada con señales activadoras fuertes, sobreponen la inmunosupresión a través de la diferenciación a un perfil Th17 (Valente et al., 2014). En ratones, las células CD4⁺ generan un aumento en el número de células Teff y de memoria CD8⁺ específicas contra el tumor. El rol de las células T CD4⁺ mostró ser crítico en las etapas iniciales de la RI, ayudando a reducir el agotamiento de las células T CD8⁺ al reducir la expresión de PD-1 (Church et al., 2014). Regulando el número de CD administradas en la vacunación se puede revertir la tolerancia selectiva de las células T CD4⁺, previamente generadas en los GL y redistribuidas de manera sistémica y que limitan la interacción de las células de la vacuna con linfocitos *naïve* (Schiering et al., 2010). Incorporar epitopes de HLA-II en la formulación de las vacunas puede recuperar la cooperación de la CD4⁺ específicas del tumor, reactivando la función latente de células T CD8⁺ y aumentando la respuesta CD8⁺ Ag-específicas (Aarntzen et al., 2013a; Snook et al., 2014).

Los efectos anti-tumorales de las vacunas se pueden mejorar sustancialmente con la terapia de combinación dado que permite un contraataque simultáneo sobre múltiples mecanismos de evasión tumoral. El uso de adyuvantes puede determinar el perfil de la respuesta Th CD4⁺ así como también la generación de células inmunosupresoras, como las MDSC y los Treg. En ratones, la depleción de Treg ayuda a inducir inmunidad anti-tumoral protectora y la generación de memoria inmunológica, cuando se los inmuniza de manera subcutánea con una vacuna a base de péptidos tumorales (Bright et al., 2013). Asimismo, el bloqueo de PD-1 aumenta la supervivencia libre de enfermedad generada por la inmunización a

través de la modificación de las CD y las células T CD8⁺ del microambiente tumoral (Karyampudi et al., 2014). El uso de péptidos combinados con una única dosis baja de ciclofosfamida reduce el número de Treg en pacientes con cáncer renal (Walter et al., 2012). Sin embargo, y a pesar de que muchos protocolos de combinación han mostrado buenos resultados, las terapias combinatorias deben ser diseñadas, revisadas y puestas a prueba muy cuidadosamente debido al posible incremento de la toxicidad, autoinmunidad o efectos opuestos no deseados.

4. Vacunas con células dendríticas

4.1. Obtención de las células dendríticas y condiciones de cultivo

La forma más comúnmente utilizada para generar CD para la producción de vacunas es la diferenciación *ex vivo* a partir de monocitos precursores CD14⁺, presentes en sangre periférica. Esta metodología tiene la ventaja de que la muestra es de fácil obtención y se logra un muy buen rendimiento, comparado con la purificación de las CD que naturalmente se encuentran en circulación, en muy baja proporción. La aplicación de CD educadas *ex vivo* surgió a su vez para evitar las posibles interferencias en la eficacia terapéutica debidas a la disfunción de las CD endógenas, comúnmente observada en los pacientes con cáncer (Herber et al., 2010; Pinzon-Charry et al., 2005). En primer lugar, las CD *ex vivo* se diferencian *in vitro* a partir de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), en presencia de GM-CSF e IL-4 o IL-13 durante cinco días hasta obtener las CD inmaduras (CDi) (Alters et al., 1999). Luego se realiza el cargado de las CD, para lo cual existe una amplia variedad de fuentes de Ag posibles para utilizar. Una forma directa es el cargado externo o pulsado con los oligopéptidos que pueden ser presentados en los complejos de HLA-I, pero esta metodología restringe la respuesta a el/los epitope/s elegido/s. Por otro lado, existen otras estrategias que involucran el uso de la maquinaria celular propia de la CD. Éstas van desde la transfección con material genético codificante específico de los epitopes o el Ag para que éstos sean expresados intracelularmente hasta la incubación con el Ag soluble purificado, como polipéptidos o la proteína nativa, que deben ser capturados, procesados y presentados a los linfocitos por la CD (Bürdek et al., 2010). Por último, también se ha explotado el uso de células tumorales inactivadas, como lisado o como Ag particulado, para ofrecer múltiples Ag a las CD (Neidhardt-Berard et al., 2004; Nestle et al., 1998). Las células tumorales utilizadas pueden ser autólogas, a partir del propio tumor del paciente, o alogeneicas, utilizando líneas celulares

caracterizadas *in vitro*. Para estos métodos es necesaria la inactivación o esterilización replicativa de las células a utilizar, por ejemplo, por irradiación ionizante (von Euw et al., 2007), para garantizar su seguridad y con el beneficio adicional de la inducción de señales de peligro por la muerte celular inducida.

Para activar una RI Ag-específica luego del encuentro con los linfocitos T, las vacunas anti-tumorales basadas en CD deben presentar un fenotipo maduro (Figura 18.A). Este estado de diferenciación se caracteriza por la expresión de moléculas co-estimuladoras necesarias para la interacción en la sinapsis inmunológica y la producción de factores solubles inmunoestimuladores, como ya se describió anteriormente. Este proceso está acompañado por un incremento en la capacidad migratoria de las CD en respuesta a quemoquinas y por la expresión del receptor CCR7, que favorece el *homing* a los GL. Allí, las CD se encuentran con las células T, donde se produce la presentación antigénica y la activación de los linfocitos T *naïve* (Figura 18.B). Lograr que las CD adquieran todas estas características *in vitro* ha llevado a explorar y desarrollar diferentes estrategias para la producción de estas vacunas (Frankenberger and Schendel, 2012). Un cóctel de maduración estándar, compuesto por las citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 y prostaglandina E2 (PGE2), se ha utilizado extensamente para generar las CD convencionales. Estas CD convencionales maduras adquieren un fenotipo activado, responden a las señales de *homing* a los GL y secretan moderadas cantidades de la citoquina de perfil Th1 IL-12p70, pero con baja producción de citoquinas inmunoreguladoras (Jonuleit et al., 1997). Utilizar o imitar las señales de patógenos y de peligro de la inmunidad innata ha demostrado mejorar la migración, el perfil de citoquinas y la RI (Boullart et al., 2008; Marongiu et al., 2013; Spranger et al., 2010). Existen otras vías alternativas en la diferenciación de CD, como por ejemplo las CD polarizadas tipo-1, generadas en presencia de IFN- γ . Las CD tipo-1 presentan un fenotipo maduro, con liberación de IL-12p70, respuesta quimiotáctica frente a CCL19 y generación de células Teff específicas (Hansen et al., 2012; Mailliard et al., 2004). Además, se ha estudiado el uso de las llamadas CD *rápidas*, que se cultivan en presencia de las citoquinas de diferenciación y luego se maduran, pero en un total de sólo 2 o 3 días de cultivo *in vitro*, y que presentan un desempeño similar (Bürdek et al., 2010; Dauer et al., 2003).

4.2. Alternativas de direccionamiento de las CD *in vivo* y utilización de adyuvantes

A pesar de todo el progreso realizado hasta el momento en cuanto a las condiciones de cultivo, el potencial impacto de la inmunoterapia con CD generadas *ex vivo* no está

completamente determinado y requiere de estudios adicionales. Además, la producción de vacunas personalizadas de CD tiene asociados algunos inconvenientes. Por un lado, todo el procesamiento de las células demanda mucho tiempo hasta que la vacuna está finalmente lista para ser administrada y, por otro, los elevados costos de producción, tanto para su obtención, su almacenamiento y el trabajo en cultivo. Esto ha llevado al estudio de estrategias alternativas relacionadas.

La activación y cargado antigénico de las CD *in vivo* es una aproximación interesante, dado que evita las complicaciones del cultivo *ex vivo* y combina los beneficios del ambiente fisiológico, al poder hacer un uso selectivo de los distintos *subsets* de CD presentes en la dermis y la epidermis (Cohn and Delamarre, 2014; Palucka et al., 2010a; Sparber et al., 2010). En general, las vacunas dirigidas y no dirigidas suelen ser pobremente inmunogénicas por sí solas, por lo que deben ser combinadas de manera coordinada con adyuvantes para evitar tolerancia frente a los Ag tumorales. El agregado de adyuvantes genera un ambiente más favorable, con células viables, móviles y disponibles para iniciar RI exitosas, representando más que un simple depósito inflamatorio de Ag (Hailemichael et al., 2013). Actualmente, muchos adyuvantes que se encuentran en estudio para formar parte de vacunas anti-tumorales han probado ser no sólo simples sistemas de administración. Los adyuvantes mal llamados inertes, como las sales minerales, las emulsiones y los liposomas, pueden disparar respuestas *Th1*, *Th2* o de células B. Los adyuvantes inmunoestimuladores, como los ligandos de TLR, citoquinas, saponinas y exotoxinas bacterianas son compuestos que, *per se*, interactúan directamente con el SI e intensifican la respuesta inducida (Dubensky and Reed, 2010).

4.3. Ruta de administración de las vacunas con CD: la piel como sitio de inyección

La ruta de administración de la vacuna tiene una gran influencia en la respuesta clínica, debido a los efectos sobre la migración de las CD y la distribución y localización de los linfocitos T activados. El mantenimiento de la viabilidad y el estado de maduración de las CD durante el desarrollo de la respuesta de los linfocitos T resulta todavía un desafío generado por limitaciones técnicas o experimentales (Lesterhuis et al., 2011; Mullins et al., 2003). Como vías de inoculación posibles, se pueden mencionar las vías intratumoral, la intranodal y la intradérmica/subcutánea. La inyección en el tumor resulta ser la más directa, pero es administrada en un microambiente inmunosupresor, que desfavorece la generación de inflamación y la activación inmune. Otra vía conveniente es la administración intranodal,

aunque tiene grandes limitaciones debido al requerimiento de personal técnico entrenado y de equipamiento de buena resolución para lograr una correcta inoculación (Lesterhuis et al., 2011). Las estrategias dirigidas a la piel tanto con CD cargadas *ex vivo* o con direccionamiento a CDs *in vivo* son de fácil acceso y han probado ser efectivas en cuanto a las RI generadas (Hangalapura et al., 2011; Lesterhuis et al., 2011).

La piel posee características que la convierten en un nicho ideal para la inoculación de vacunas basadas en CD. La piel ofrece una red inmune compleja comprendida por las células de Langerhans en el compartimiento epidérmico y las CD en la dermis. Las CPA locales están acompañadas de otras células especializadas con funciones inmunes, incluyendo a los macrófagos, los queratinocitos, las células NKT y los fibroblastos, y tienen acceso a los vasos sanguíneos y linfáticos (Fehres et al., 2013; Liu et al., 2005). La administración focalizada de TAA mostró una presentación cruzada tardía, pero capaz de generar una respuesta efectora polifuncional y robusta (Bouvier et al., 2011). De la misma manera, la administración intradérmica induce una respuesta T CD8⁺ funcional y específica, más potente y duradera, que rompe la tolerancia generalizada en modelos murinos (Hangalapura et al., 2011), y provee una reacción específica contra TAA, funcional y superior, en sitios de hipersensibilidad de tipo retardada en pacientes de melanoma vacunados con CD (Lesterhuis et al., 2011). Cuando se elige la inoculación intradérmica o subcutánea, no hay que subestimar el *micromilieu* de la piel, que puede presentar un sello pro-inflamatorio o inmunosupresor dado por los queratinocitos, a través de la producción de IL-1 β o de TGF- β , respectivamente. Estos factores, junto con la IL-10, pueden modificar la respuesta local de las células inmunes y por lo tanto la RI generada, en especial con respecto a la localización tumoral (Lindenberg et al., 2013; Ohlfest et al., 2013).

El pre-condicionamiento del sitio de inyección puede activar a las CPA residentes y generar un ambiente más inmunogénico y vasos linfáticos permeables con secreción aumentada de CCL19, ligando de CCR7 (Martín-Fontecha et al., 2003; Yin et al., 2014). El uso de quimioattractantes, como el GM-CSF y quimioquinas, como adyuvantes para el reclutamiento de CPA al sitio de inyección y una subsiguiente activación local, se ha probado ampliamente en la clínica (Bobanga et al., 2013; Herrlinger et al., 2004; Shih et al., 2009). Los ligandos de TLR son utilizados en las formulaciones de las vacunas para evitar la inducción de tolerancia Ag-específica y para estimular las células del SI, de manera de potenciar las respuestas generadas (Gnjatic et al., 2010). Algunos ligandos de TLR2/4, TLR3 y TLR9, como BCG, el ácido poliinosínico:policitidílico (poly(I:C)) y los oligodeoxinucleótidos CpG

respectivamente, se encuentran actualmente en estudio en inmunoterapias basadas en CD, solos o combinados, con resultados promisorios (Bright et al., 2013; Goldinger et al., 2012; Marongiu et al., 2013; Perret et al., 2013). En el caso del ligando de TLR7 Imiquimod y mediadores lipídicos como QuilA o ISCOM, han mostrado resultados más variados (Dang et al., 2012; Duewell et al., 2011; Fehres et al., 2014; Goldinger et al., 2012; Perret et al., 2013).

4.4. Migración de las vacunas de células dendríticas a los ganglios linfáticos

Luego de la administración de la vacuna, las CD deben interactuar de manera íntima con células T *naïve* que, luego de reconocer a su Ag, llevarán a cabo su función citotóxica, *helper* o regulatoria (Figura 18.C). Hoy en día, se desconoce el número necesario de CD cargadas con Ag que deben estar presentes en los GL para montar una RI anti-tumoral completa y eficaz. En modelos murinos, el incremento del número de CD inoculadas resulta en un aumento de la eficiencia de migración a los GL. Se observa un rápido incremento de la celularidad de los GL, previo al desarrollo de la proliferación de células T, y una respuesta de células T CD4⁺ proporcional al número de CD cargadas con Ag que llegan al GL (Martín-Fontecha et al., 2003). Sin embargo, en pacientes, el parámetro que mejora la proporción de células que llegan al GL es la reducción del número de CD inyectadas, aunque debe considerarse que todavía existen limitaciones con los métodos de detección por imágenes disponibles hoy en día (Aarntzen et al., 2013b).

Maximizar la llegada de las vacunas con CD a los GL puede aumentar las respuestas anti-tumorales (Verdijk et al., 2008). Pero aún más importante que la llegada a uno o múltiples tejidos linfáticos secundarios, es que las CD se localicen en las áreas ricas en células T de los GL, para permitir su interacción y la generación de una respuesta anti-tumoral CD8⁺ que se traduzca en el control de la enfermedad (Verdijk et al., 2009). El conocimiento acerca de los subsets de CD presentes en el GL y su rol en la activación de las células T (van de Ven et al., 2011) hace posible dirigir terapias específicas para romper el ambiente tolerogénico. La función inmunológica normal de los GL drenantes de tumor se ven comprometidas a través de múltiples mecanismos de inmunosupresión (Munn and Mellor, 2006), así como la presencia de metástasis, a pesar de la permanencia de una fuente de células T potencialmente sensibles (Jeanbart et al., 2014; Ohlfest et al., 2013). En el GL, las células T FoxP3⁺ inducen la muerte de las CD e impiden una normal movilización y presentación cruzada a las células T CD8⁺ (Boissonnas et al., 2010). La organización espacial de las CD dentro de los GL drenantes del

tumor impacta sobre la duración del período libre de enfermedad en pacientes con cáncer de mama. El número y el tamaño de los acúmulos de CD correlacionaban directamente con su estado de maduración y la co-localización e interacción con las células T (Chang et al., 2013). Las estrategias de combinación terapéutica para las vacunas con CD pueden incluir el uso de adyuvantes o citoquinas (Jeanbart et al., 2014; St John et al., 2012), así como la utilización de otras células que expresen moléculas co-estimulatorias que tengan función *helper*, como los NK (Bouwer et al., 2014; Higham et al., 2010; Wong et al., 2013).

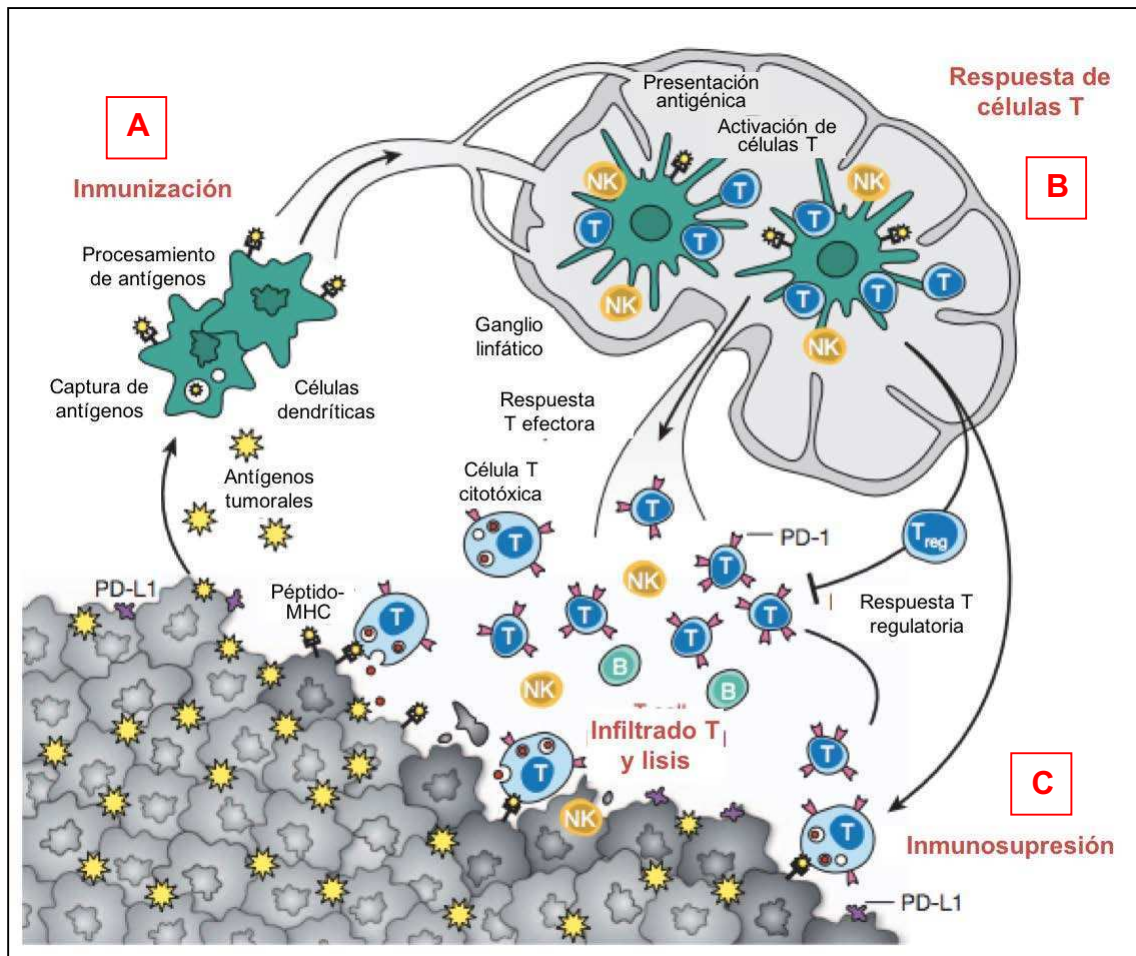


Figura 18. Esquema de la generación y regulación de la inmunidad anti-tumoral, modelo sobre el cual se diseñan las vacunas basadas en CD. **A.** Proceso de inmunización. Las CD deben captar, procesar y presentar los Ag tumorales. Las CD deben adoptar un fenotipo maduro para que, al encontrarse con los linfocitos, puedan activarlos e inducir una respuesta anti-tumoral. **B.** Las CD que llevan Ag tumorales migran a los GL donde les presentan los Ag a los linfocitos. La señalización involucrada durante la interacción, da como resultado la generación de una respuesta T efectora o T regulatoria. **C.** Los linfocitos activados salen del GL y se dirigen al sitio tumoral. La función efectora de los linfocitos se ve enfrentada a un microambiente hostil inmunosupresor. Adaptado de Mellman et al., 2011.

5. Antecedentes y resultados previos

Las vacunas terapéuticas basadas en CD obtenidas *ex vivo* han sido ensayadas en pacientes con cáncer por más de dos décadas (Galluzzi et al., 2012; Mukherji et al., 1995; Ridgway, 2003). Como se mencionó anteriormente, sólo en escasos pacientes y protocolos se lograron respuestas clínicas objetivas mediante el uso de estas vacunas (Palucka 2010). Sin embargo, en general las vacunas con CD han demostrado ser seguras, bien toleradas y capaces de generar la expansión de células CD4⁺ y CD8⁺ específicas contra TAA en circulación. La vacuna terapéutica Sipuleucel-T (Provenge[®]), para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico, refractario a la terapia hormonal, es la única vacuna basada en CD que cuenta con la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA, agencia estadounidense de salud pública) (Cheever and Higano, 2011; Kantoff et al., 2010).

Nuestro grupo de trabajo se ha dedicado al desarrollo de inmunoterapias para melanoma por más de 25 años, a través del estudio de la biología de la enfermedad y del desarrollo de tratamientos innovadores como las vacunas terapéuticas. Este trabajo ha sido realizado en el área de la medicina traduccional, vinculando fuertemente la investigación básica con la clínica. Se comenzó por la generación y aplicación de anticuerpos monoclonales (Mordoh et al., 1995) hasta el desarrollo de vacunas ya estudiadas en ensayos clínicos (Barrio et al., 2006; von Euw et al., 2008).

Hasta ahora se ha logrado un gran avance para lograr la inmunización de pacientes con melanoma, habiendo estudiado principalmente dos modelos de vacunas basadas en CD: una vacuna celular alogeneica, compuesta por una mezcla de líneas celulares de melanoma letalmente irradiadas (VACCIMEL y CSF-470), y una vacuna con CD autólogas, cargadas con las células alogeneicas irradiadas (CD/Apo-Nec). La vacuna celular se prepara utilizando una mezcla de líneas celulares de melanoma, establecidas en el laboratorio, que son inactivadas por radiación- γ y criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su uso. Esta estrategia de Ag particulados derivados de células en proceso de muerte celular expone a las CD a un repertorio amplio y complejo de Ag de melanoma, tanto conocidos como desconocidos. Para su elaboración, se aplica una dosis de 70 Gy de irradiación ionizante gamma, que asegura la inactivación de la habilidad replicativa de las células tumorales, generando una mezcla de poblaciones de células apoptóticas y necróticas. Esta formulación fue evaluada en un ensayo clínico de Fase I, en combinación con el adyuvante BCG y el agregado de GM-CSF, como quimioattractante de CPA residentes. El agregado de GM-CSF en dosis intermedias (300 μ g y

400 µg) no generó toxicidad y aumentó las respuestas celulares anti-melanoma (Barrio et al., 2006). Esta vacuna continúa en estudio en un protocolo clínico de Fase II/III CASVAC-0401, que actualmente se está llevando a cabo y que compara el efecto de la vacuna frente al tratamiento estándar con IFN- α 2a. Además, se han realizado avances sobre la metodología de congelación alternativa con trehalosa, reemplazando el dimetilsulfóxido, para mejorar la conservación y el almacenamiento de la vacuna, facilitando así su posible distribución y futura comercialización (Tapia et al., 2013).

Por otro lado, el desarrollo de vacunas con CD diferenciadas *ex vivo* en nuestro laboratorio comenzó con el estudio de un modelo murino. Utilizando ratones C57BL/6 y la línea de melanoma murino B16, se desarrolló una vacuna co-cultivando las CD derivadas de médula ósea con células B16 irradiadas a 70 Gy. Esta vacuna migraba a los GL en una proporción del 0,5% de las células inoculadas y confería protección contra el desafío tumoral con células B16 administradas por vía subcutánea, activando células T CD4⁺ y CD8⁺ efectoras, ambas necesarias para la protección, así como células de memoria (Goldszmid et al., 2003). Continuando el estudio del modelo murino, se demostró la formación de estructuras linfoides terciarias en el sitio de inyección, que acompaña el efecto protector de más del 80% (Mac Keon et al., 2010). Estos datos apoyan la hipótesis del sitio de inyección como un posible sitio no canónico de presentación antigénica y activación de linfocitos efectores, también observado en humanos (Harris et al., 2012).

Con base en los datos obtenidos del estudio clínico de la vacuna celular VACCIMEL/CSF-470 y del modelo murino con CD, se comenzó el estudio pre-clínico de un modelo de vacuna anti-melanoma con CD en el sistema humano. Se utilizó la mezcla apoptótica/necrótica de líneas de melanoma humano alogeneicas gamma-irradiadas (Apo-Nec) como fuente de Ag para el cargado de CD derivadas de monocitos de sangre periférica. Las CD fagocitaban las Apo-Nec, incrementaban la expresión de marcadores de maduración y presentaban respuesta quimiotáctica frente a CCL19. El resultado más importante fue la capacidad de presentación cruzada específica de la vacuna, que estimulaba clones de CTL CD8⁺ específicos para MART-1 y gp100 (von Euw et al., 2007). Esta fue la base para la evaluación clínica de la vacuna CD/Apo-Nec, en un ensayo clínico de Fase I. Allí, se administró la vacuna CD/Apo-Nec a grupos de 4 pacientes con melanoma cutáneo, de estadios IIC, III y IV, en diferentes dosis (5×10^6 , 10×10^6 , 15×10^6 y 20×10^6 CD). La vacuna terapéutica CD/Apo-Nec probó ser clínicamente segura, bien tolerada y con la capacidad de inducir inmunidad específica contra Ag de melanoma (von Euw et al., 2008). El seguimiento de los

pacientes vacunados indica que el 77,8% de aquellos que presentaban estadios II/III se mantienen con una sobrevida libre de enfermedad prolongada, por más de 8 años. Sin embargo, todos los pacientes de estadio IV progresaron con su enfermedad (comunicación personal del Dr. Mordoh). Por lo tanto, estos datos aportan evidencias para pensar que la protección inmune conferida por la vacuna CD/Apo-Nec podría lidiar con las metástasis microscópicas, pero no cuando hay una carga tumoral diseminada muy grande.



OBJETIVOS GENERALES

OBJETIVOS GENERALES

Todos los resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio presentaban un panorama interesante para el uso clínico de las vacunas en estudio como terapia para melanoma. Sin embargo, existían aspectos que faltaba ampliar o describir en profundidad en cuanto al desarrollo del modelo experimental, y que podrían tener impacto en el desempeño de las CD como presentadoras de Ag tumorales, para finalmente generar una RI anti-tumoral. El objetivo general planteado fue estudiar características de las diferentes etapas de la formulación de la vacuna CD/Apo-Nec y parámetros funcionales tanto *in vitro* como *in vivo*, de manera tal de conocer en más detalle el modelo y poder determinar condiciones óptimas para su preparación y así mejorar su desempeño como terapia anti-tumoral.

Por un lado, queríamos analizar en profundidad los cambios e interacciones que se producían durante el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec, con particular interés en los efectos de la radiación- γ sobre las células tumorales y las características de las CD al momento de ser inoculadas, en cuanto al cargado antigénico, su estado de maduración y capacidad estimuladora. Evidencias previas del análisis de las células Apo-Nec mostraban importantes cambios morfológicos luego de la irradiación a 70 Gy, como la formación de grandes vacuolas observadas por microscopía electrónica (von Euw et al., 2007). Esto sugería cambios en la composición lipídica, tanto en las Apo-Nec como en las CD del co-cultivo. Los cambios bioquímicos y citológicos producidos, luego de la radioterapia, sobre las células tumorales han sido estudiados principalmente en cuanto a los daños oxidativos que llevan a la muerte celular (Baskar et al., 2014). Sin embargo, otros cambios metabólicos y el destino antigénico post-irradiación han recibido poca atención. El análisis de estos cambios resultaba de importancia para entender las interacciones entre las CD y las células tumorales irradiadas *in vitro*, para mejorar la eficiencia de la vacuna CD/Apo-Nec, y de alguna manera, para comprender los posibles efectos sobre la interacción *in vivo* luego de la radioterapia. Se ha reportado que, en ratones portadores de tumor, las CD presentan mayor acumulación de lípidos citoplasmáticos, mayormente triglicéridos, y éstas tienen una capacidad reducida para procesar Ag, comparados con las CD de ratones sin tumor (Herber et al., 2010). Los lípidos oxidados derivados de células tumorales, que se acumulaban en las CD, tenían la capacidad de bloquear solamente la presentación cruzada de Ag, sin afectar la vía de presentación de Ag endógenos (Cao et al., 2014). A su vez, también fue reportado que los cuerpos lipídicos (LB, por sus siglas en inglés) citoplasmáticos están involucrados en el proceso de presentación cruzada de las CD. Una GTPasa p47, la Igtp, es necesaria para este proceso y se encuentra en retículo endoplasmático y asociada a los LB en las CD. En ausencia de alguno de esos dos componentes la vía de

presentación cruzada se ve impedida, no así las otras vías de procesamiento antigénico (Bougnères et al., 2009). Por lo tanto, era de importancia determinar qué sucedía con el contenido lipídico en nuestro sistema, en las Apo-Nec post-irradiación y su efecto sobre las CD durante el co-cultivo.

Luego, era necesario analizar condiciones de cultivo *in vitro* que incrementaran la maduración de la vacuna CD/Apo-Nec, manteniendo un balance con la capacidad fagocítica. Estos procesos pueden ser regulados por el reconocimiento de PAMP, la exposición a DAMP liberados por células dañadas o en proceso de muerte, o por mediadores pro-inflamatorios. Se investigó el efecto del agregado de un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias (Jonuleit et al., 1997) y el agregado de ligandos de TLR, como Imiquimod ligando del TLR7, o BCG ligando de TLR4. En estas condiciones de maduración, nos interesaba evaluar parámetros funcionales como la expresión de quimiorreceptores, la motilidad celular y la respuesta quimiotáctica, y otros factores que pudieran favorecer el *homing* a los GL. Utilizando un modelo murino, se buscó describir el perfil migratorio de la vacuna CD/Apo-Nec *in vivo*, incluyendo el porcentaje de llegada a los GL desde el sitio de inyección, la distribución entre GL y el efecto del grado de maduración de la vacuna sobre la migración. Se propuso analizar el agregado de adyuvantes *in vivo* para determinar cambios en el patrón migratorio.

Por último, se buscó caracterizar en profundidad el perfil inmunoestimulador de la vacuna y la capacidad de inducir una respuesta celular, específica contra células de melanoma. Para esto se analizó la expresión de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica y la secreción de citoquinas que pueden influir en el perfil de la respuesta inducida. Se describió en detalle la capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de activar un clon de células T CD8⁺, en función del cargado antigénico, el grado de maduración y la evolución a lo largo del tiempo. Finalmente, se describió la inducción de una respuesta anti-tumoral sobre linfocitos *naïve*, utilizando un sistema autólogo *in vitro*, describiendo la activación de los linfocitos estimulados, el perfil de respuesta en función de las citoquinas secretadas y su capacidad proliferativa y citotóxica frente a células de melanoma.



MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Las líneas celulares Mel-XY1, Mel-XY2, Mel-XY3 y Mel-XX4 fueron obtenidas a partir de biopsias tumorales de pacientes con melanoma metastático. Estas líneas son mantenidas en el Instituto Alexander Fleming y fueron utilizadas anteriormente en distintos estudios clínicos (Barrio et al., 2006; von Euw et al., 2008). Estas líneas se cultivaron en medio de cultivo para melanoma, compuesto por: DMEM/F12 1:1 (Sigma), 2 mM *L*-glutamina, 20 nM selenito de sodio, 100 µM ácido ascórbico, 0,3 mg/ml galactosa, 0,15 mg/ml piruvato de sodio, 5 µg/ml insulina, 100 UI/ml penicilina, 10 µg/ml streptomycin, con 10% suero fetal bovino (SFB) (Natocor, Argentina) y 2 µg/ml ciprofloxacina, en estufa a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ 5 %. Las células fueron criopreservadas en nitrógeno líquido hasta su uso. Estas líneas fueron utilizadas para caracterizar la expresión de Ag, la presencia de lípidos y el comportamiento celular post-irradiación. Como se indica en algunos ensayos, Mel-XX4 fue utilizada como un control ya que su haplotipo es HLA-A*0201⁻ y no expresa el Ag MART-1.

La línea celular IIB-BR-G fue previamente establecida en el laboratorio a partir de un carcinoma primario de mama (Bover et al., 1991). Esta línea se cultivó en medio de cultivo compuesto por: DMEM, 2 mM *L*-glutamina, 3,5 mg/ml NaHCO₃, 2 mg/ml insulina y 4,5 mg/ml glucosa con 10 % SFB, en estufa a 37 °C en atmósfera húmeda con CO₂ 5 %. Esta línea celular HLA-A*0201⁺ fue utilizada como control de especificidad en algunos ensayos de la función efectora de células T.

Ratones

Los ratones *nude* (*Mus musculus*), de cepa endocriada N:NIH (S)-nu, atímicos fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron luego mantenidos en el Bioterio de la Fundación Instituto Leloir de acuerdo a los lineamientos del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Para los experimentos se utilizaron ratones de entre 12 y 16 semanas de edad.

Citoquinas

Todas las citoquinas utilizadas son proteínas recombinantes humanas purificadas. Las interleuquinas IL-1β, IL-4, IL-6, IL-7 y TNF-α y las quemoquinas CCL3 y CCL-19 fueron adquiridas en Peprotech (México). Las citoquinas IL-2 y GM-CSF fueron provistas por

Laboratorio Pablo Cassará (Argentina). La PGE2 fue adquirida en Calbiochem (Estados Unidos) y la IL-10 en BD Biosciences (Estados Unidos).

Anticuerpos

Los anticuerpos utilizados para determinar características fenotípicas tanto de las células tumorales como de las CD fueron adquiridos en BD Biosciences (San José, Estados Unidos), a menos que se indique específicamente otro proveedor. Todos los anticuerpos fueron titulados para su uso y las marcaciones incluyeron los controles de isotipo correspondientes. Las marcaciones fueron analizadas por citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences, San José, Estados Unidos) o por microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus BX40F4, cámara Olympus DP72).

Herramientas informáticas

Para el procesamiento de datos se utilizó el paquete Office de Microsoft Windows y Macintosh. Para el análisis de los archivos de citometría de flujo se utilizaron los programas CellQuestPro (Beckton-Dickinson, Estados Unidos) y FlowJo (Tree Star Inc., Estados Unidos). Las imágenes de microscopía de fluorescencia y las imágenes digitalizadas correspondientes a geles, membranas y placas fueron analizadas y cuantificadas con el programa ImageJ (NIH, Estados Unidos). Las imágenes de microscopía confocal fueron procesadas y analizadas con el programa Zeiss LSM Image Browser (Carl Zeiss, Alemania). Las imágenes de *In vivo Imaging* fueron procesadas, analizadas y cuantificadas con el programa IVIS Living Image 3.0 (Caliper Life Sciences, Estados Unidos). El análisis estadístico de los datos fue realizado con los programas InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina) y GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., Estados Unidos).

Irradiación de células tumorales

Las líneas celulares fueron descongeladas y resuspendidas en DMEM. Las células recibieron una dosis de radiación gamma en el equipo de Aceleración Lineal Siemens del Instituto Alexander Fleming. La dosis utilizada para la generación de células Apo-Nec fue de 70 Gy. Para la formulación de la vacuna CD/Apo-Nec en los experimentos de esta Tesis, se utilizó solamente la línea Mel-XY3 HLA-A2⁺ MART-1⁺ irradiada como fuente de Ag Apo-Nec.

Alternativamente, se utilizó además una dosis de 25 Gy para la caracterización de la cinética de apoptosis/necrosis de las células y el análisis del contenido lipídico post-irradiación.

Determinación de la viabilidad de las células post-irradiación

Las células fueron descongeladas, plaqueadas en placas p35 en medio AIM-V y evaluadas a diferentes tiempos post-irradiación. Primero se realizaron recuentos de integridad celular por exclusión del colorante vital Azul de Tripano (Gibco, Estados Unidos). La apoptosis y necrosis de las células se determinó con la marcación conjunta de Anexina-V e Ioduro de Propidio (Annexin-V Apoptosis Detection kit, BD Biosciences, San José, Estados Unidos), según las recomendaciones del fabricante. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. También se evaluó viabilidad con la técnica de MTT, según las recomendaciones del fabricante. Brevemente, a las células sembradas en placas de 96 pocillos se les removió el medio y se les agregó 100 µl de una solución de 1 mg/ml del reactivo de MTT (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se incubó durante 90 min a 37 °C, se removió el reactivo y se lisaron las células con 200 µl de isopropanol. Luego de 90 min de incubación a 37 °C nuevamente se procedió su medición en un lector de microplacas (Bio-Rad 550, Japón) a 570 nm.

Ensayo clonogénico

Luego de la irradiación, las células fueron sembradas en agar blando para determinar la pérdida de la capacidad proliferativa libre de anclaje, respecto de las células viables (Hamburger, 1987). En placas de 24 pocillos se sembraron $1,5 \times 10^4$ células/well en medio melanoma con 0,35% agar y se dejaron en estufa a 37°C. El seguimiento del cultivo se realizó durante 3 semanas y se fotografiaron con una cámara adosada al microscopio óptico invertido (Olympus CKX41).

Síntesis de ADN en las células tumorales

Esta medición se realizó por cuantificación de la incorporación de [³H]-Timidina (Perkin-Elmer, Boston, Estados Unidos). En placas de 96 pocillos se sembraron 2×10^5 células viables o post-irradiación y se les agregó un pulso de 1 µCi/ml del nucleótido marcado radiactivo durante 2 horas. Luego las células fueron lavadas y cosechadas en un Nunc Cell Harvester 8 (Nalge Nunc International Corp., Estados Unidos). La radiactividad incorporada fue analizada en un contador de centelleo (Wallac 1214 Rackbeta, Pharmacia).

Determinación del contenido proteico

Se prepararon extractos proteicos totales utilizando un buffer de lisis compuesto por 10 mM Tris-HCl pH 8,1, 1 % Triton X-100, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA y 1/200 de cóctel de inhibidor de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se utilizaron 50 µl de buffer de lisis por

cada 1×10^6 de células procesadas. El contenido proteico fue determinado por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Western-blot

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 12 %, en presencia de SDS (SDS-PAGE). Se prepararon extractos proteicos de las muestras, partiendo de la misma cantidad de células iniciales. Se sembraron 10 μ l de extracto proteico de cada muestra y 5 μ l de un marcador de referencia de peso molecular conocido (SDS7B2, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Luego de la transferencia a una membrana de nitrocelulosa (Immobilion 0,45 μ m, Millipore, Estados Unidos) y el bloqueo con buffer fosfato salino (PBS) 3 % de proteínas de leche descremada, se incubó con 5 μ g/ml del anticuerpo anti-MART-1 2A9 (anticuerpo monoclonal de ratón IgG1 cedido gentilmente por el Dr. Jean-Luc Telliaud, Paris, Francia) (Barrio, 2012) y 0,8 μ g/ml anti- β -actina (monoclonal de ratón IgG2a, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), como control de carga proteica. La marcación fue revelada con 1/2500 F(ab')₂ hecho en cabra anti-IgG (H+L) de ratón AffiniPure conjugado a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch, Estados Unidos) y el reactivo NBT-BCIP (Promega, Estados Unidos).

Coloración de lípidos neutros con Oil Red O

Pellets de células tumorales viables o irradiadas se fijaron en PBS 3 % paraformaldehído (PFA) y una gota de la suspensión se montó sobre un portaobjetos de vidrio y se dejó secar al aire. Luego, los vidrios se lavaron dos veces en agua, una vez en polietilenglicol (PEG) y se colorearon por 10 min a 60 °C en PEG 0,5 % Oil Red O (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se realizó una contraincubación de las muestras con 20 % Hematoxilina de Harris (Biopack, Argentina) y, luego de un lavado con agua corriente, se montaron en glicerol para ser observadas al microscopio óptico.

Coloración fluorescente de lípidos neutros con Bodipy 493/503

Las células tumorales viables o irradiadas fueron incubadas con una solución de Bodipy 493/503 (Molecular probes, Invitrogen, Estados Unidos) en PBS por 15 min a temperatura ambiente, para luego ser lavadas y fijadas en PBS 1 % PFA, según lo recomendado por el fabricante. Las muestras procesadas para citometría de flujo fueron marcadas con 0,5 μ g/ml Bodipy mientras que en el caso de la preparación de las muestras para imágenes al microscopio se utilizó 10 μ g/ml de solución de colorante.

Marcación intracelular del antígeno MART-1

Este protocolo puede ser precedido por una marcación de Ag de superficie. Para la marcación intracelular, se separaron 1×10^6 células tumorales viables o irradiadas que se fijaron en PBS 3 % PFA durante 10 min a temperatura ambiente. Luego se permeabilizaron con 200 μ l de una solución de PBS 0,05 % saponina (PBS-SAP) durante 15 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron y fueron incubadas con 5 μ g/ml anti-MART-1 2A9, marcado con AlexaFluor⁶⁴⁷ (kit A20173, Invitrogen, Estados Unidos), en PBS-SAP durante 45 min a 4 °C. Luego de lavar, alternativamente se realizaron otras coloraciones con Bodipy 493/503, para visualizar los lípidos neutros, y Hoechst (bisBenzimide H 33258, Sigma-Aldrich, Estados Unidos), para localizar los núcleos celulares. Finalmente, las células se lavaron en PBS y fueron resuspendidas en una solución de Mowiol 4-88 (Calbiochem, Merck Millipore, Alemania), según las indicaciones del fabricante, y montadas en portaobjetos para su análisis por microscopía confocal (LSM 510, Meta, Carl Zeiss, Alemania).

Aislamiento de los cuerpos lipídicos de células tumorales

Los LB de células de melanoma se obtuvieron a partir de 1×10^8 células Mel-XY3 viables o 48 h post-irradiación. Las células fueron resuspendidas en 6 ml de buffer de disrupción (0,25 M sacarosa, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,4) en presencia del inhibidor de proteasas P8340. Las suspensiones celulares fueron procesadas con un homogenizador Dounce, con 4 ciclos de 20 golpes separados por intervalos de 1 min, realizando todo el procedimiento a 4 °C. Las células irradiadas fueron sometidas a una disrupción posterior con un homogenizador Polytron (IKA, Werke, GmbH, Alemania), de 4 ciclos de 30 seg cada una a 4 °C. Ambos homogenatos fueron centrifugados a 12.000 rpm por 10 min y los sobrenadantes fueron diluidos con 20 mM Tris-Hcl pH 7,4:solución salina (1:1), hasta un volumen final de 10 ml. Luego, fueron centrifugados a 100.000g por 60 min a 4 °C (Beckman L7-65, Beckman-Coulter, Estados Unidos). La capa superior lipídica blanquecina del sobrenadante fue separada y conservada a -80 °C en tubos de vidrio para su posterior análisis. Se conservaron alícuotas de los sobrenadantes para la determinación del contenido proteico.

Análisis de la composición bioquímica de los cuerpos lipídicos

Los LB de las células fueron liofilizados y resuspendidos en cloroformo: metanol 3:2 durante 30 min. Luego de una centrifugación a 7.000 rpm durante 30 min para remover el material insoluble, las muestras se dividieron, se lavaron con 4 mM MgCl₂, según Folch (Folch et al., 1956) y la fase inferior lipídica se secó a 40 °C bajo nitrógeno gaseoso. Para la separación por

cromatografía en capa delgada (TLC) se utilizaron placas Silica Gel 60 TLC (Merck), prelavadas con cloroformo y activadas previamente a su uso. Una fracción correspondiente a 6×10^6 células se usó para separar lípidos neutros usando un sistema uni-dimensional con tres solventes: (1) hexano hasta el final, (2) tolueno hasta el final y (3) hexano: dietil-éter: ácido acético (70:30:1) a 12 cm del origen (Aloisi et al., 1990). Las placas fueron rociadas con una solución de cloruro férrico/ácido sulfúrico y calentadas a 180 °C. También se analizaron los lípidos polares correspondientes a 3×10^6 células. En este caso las placas fueron corridas con un sistema uni-dimensional de dos solventes: (1) cloroformo: metanol: ácido acético: agua (40:10:10:1) y (2) cloroformo: metanol: ácido acético: agua (120:46:19:3) (Sterin-Speziale et al., 1992). Las placas fueron rociadas con una solución 5% de ácido fosfomobdílico etanólico, calentadas a 180 °C y expuestas a vapores de amonio para aclarar el fondo.

Todos los solventes utilizados tenían grado HPLC. Se utilizaron los siguientes estándares: 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicerol y monomiristina (Echelon Biosciences Inc., Estados Unidos), coenzima Q1, escualeno, *L*- α -fosfatidilcolina, *L*- α -fosfatidil-L-serina, *L*- α -fosfatidil-etanolamina, *L*- α -lisofosfatidilcolina, palmitato de colesterol, gliceril-trioleato, estearil-araquidato, metil-palmitato, cardiolipina, 1-(3-*sn*-fosfatidil)-*rac*-glicerol, ácido oleico y colesterol (Sigma-Aldrich) y dolicol (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Estados Unidos). Las densitometrías de las placas se analizaron con el programa ImageJ.

Síntesis de ácidos grasos

Para esta determinación se utilizó la estrategia de incorporación de [1,2 14 C] ácido acético (Perkin Elmer, Boston, Estados Unidos). Para esto, $0,8 \times 10^6$ células tumorales viables o irradiadas se sembraron en placas de 24 pocillos y se les agregó un pulso de 1 μ Ci/ml de la marca radiactiva durante 2 h. Luego las células fueron lavadas y procesadas para su análisis. Por un lado, se separó una parte para ser cuantificada en el contador de centelleo y, por otro, el resto fue conservado para el aislamiento y separación de los lípidos, según lo descrito anteriormente. Una vez obtenidas las TLC, las placas fueron expuestas a pantallas de fósforo para el almacenamiento de las imágenes, para luego ser escaneadas con un STORM 840 (Molecular Dynamics Division, Amersham Pharmacia Biotech). Luego, las placas fueron rociadas con una solución de cloruro férrico/ácido sulfúrico y calentadas a 180 °C para detectar los lípidos.

La droga C75 (Cayman Chemical Company, Estados Unidos), inhibidor de la sintasa de ácidos grasos, se utilizó de acuerdo a las sugerencias del fabricante y lo previamente descrito (Samsa et al., 2009).

Obtención de las células mononucleares de sangre periférica y generación de las células dendríticas humanas ex vivo

Las CD humanas fueron diferenciadas a partir de *buffy coats* obtenidos de sangre de donantes sanos del Servicio de Hemoterapia del Instituto Alexander Fleming. Los donantes dieron su consentimiento informado y el procedimiento contó con la aprobación del Comité de Ética del Instituto Alexander Fleming. Los *buffy coats* de los donantes fueron sembrados en gradientes de Ficoll-Paque (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para obtener los PBMC. Éstos fueron luego plaqueados durante 2 h a 37 °C para permitir la adherencia de los monocitos a la placa de cultivo. Luego de un lavado con PBS, se agregó medio AIM-V (Gibco, Life Technologies, Estados Unidos) con 144 ng/ml GM-CSF y 40 ng/ml IL-4. Al día 2, se alimenta el cultivo con medio AIMV con citoquinas. Al día 5 se obtienen las CDi, que se levantan por pipeteo, se cuentan y están listas para ser usadas para el co-cultivo de la vacuna.

Preparación del cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec

La vacuna CD/Apo-Nec se preparó realizando el co-cultivo de CDi y células Mel-XY3 irradiadas (Apo-Nec) (Figura 19). Las Apo-Nec fueron descongeladas, resuspendidas en medio AIM-V y utilizadas en el momento para generar la vacuna. Alternativamente, para el análisis del contenido lipídico de la vacuna, se realizaron co-cultivos en los que se utilizaron células irradiadas descongeladas al momento de ser usadas (Apo-Nec T0) o descongeladas y cultivadas en medio AIM-V a 37 °C 72 h previamente a su uso (Apo-Nec T72).

Las CDi fueron co-cultivadas en una relación 3:1 con las Apo-Nec, en placas p35 o placas de 6 pocillos, con una densidad final de 1×10^6 células/ml en medio condicionado: AIM-V (1:2). Los co-cultivos se incubaron en estufa a 37 °C con 5 % CO₂ por 48 h, momento en el que se obtiene la vacuna CD/Apo-Nec para las determinaciones fenotípicas y funcionales.

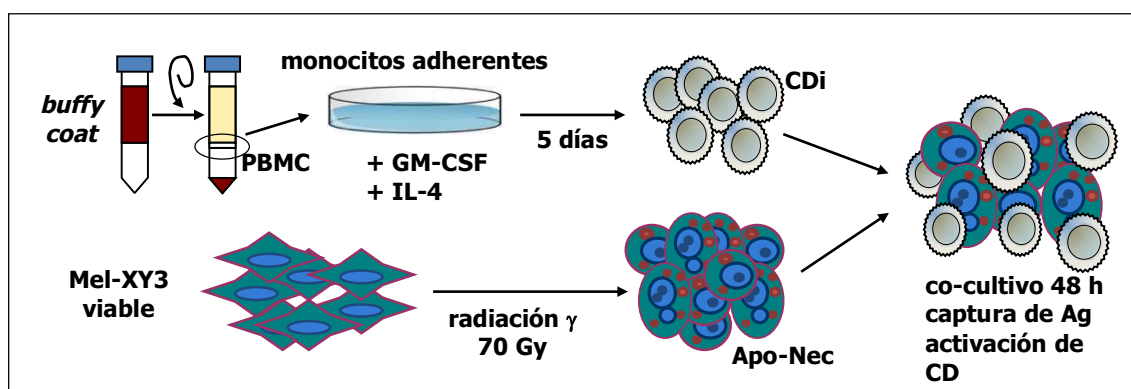


Figura 19. Esquema de la elaboración de la vacuna CD/Apo-Nec.

Maduración de las células dendríticas y uso de adyuvantes in vitro

En los cultivos *in vitro* se adicionaron diferentes agentes de maduración para evaluar el fenotipo inducido en las CD y la vacuna CD/Apo-Nec. Como controles positivos de maduración de las CD se utilizaron 2 µg/ml de lipopolisacárido (LPS) (*E. coli* J5, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias (CC) compuesto por 20 ng/ml TNF-α, 10 ng/ml IL-1β, 50 ng/ml IL-6 y 1 µg/ml PGE2 (Jonuleit et al., 1997). El CC también fue agregado al co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec. Sólo en los casos indicados, algunos componentes del CC se omitieron o se agregaron por separado. Todos los agentes de maduración fueron agregados al momento de plaquear las células y fueron dejados durante las 48 h de cultivo. Según se indica, los co-cultivos de la vacuna CD/Apo-Nec fueron suplementados con 2x10⁴ unidades formadoras de colonia (UFC)/ml de BCG (provista por el Instituto Malbrán, Argentina), 1 µg/ml Imiquimod (Glenmarck Pharmaceuticals Ltd., Argentina) y 50 ng/ml GM-CSF durante las 48 h de cultivo. En algunos casos, se cultivaron CD con 10 ng/ml IL-10 como control de fenotipo inmunosupresor.

En todos los casos los compuestos fueron lavados antes la evaluación fenotípica o funcional de las células.

Fenotipo de las células dendríticas y la vacuna CD/Apo-Nec

Los marcadores de superficie analizados para describir el fenotipo celular fueron (fluorocromo y clon del anticuerpo utilizado): CD14 (FITC, M5E2), CD11c (PE, B-ly6), CD80 (FITC, L307.4), CD86 (FITC, FUN-1), CD86 (PE, FUN-1), CD83 (FITC, HB15e), CD1a (FITC, HI149), HLA-A/B/C (FITC, G46-2.6), HLA-DR/DP/DQ (FITC, Tu39), CD40 (FITC, 5C3), ICOS-L (PE, 2D3/B7-H2), CCR5 (FITC, 2D5) y CCR7 (PE, 150503) y PD-L1 (AlexaFluor 488, 130021) (R&D Systems, Estados Unidos). En cada determinación se utilizaron 5x10⁵ células por tubo para la marcación. En los casos analizados por citometría de flujo, se adquirieron 20.000 eventos para el análisis de datos con el programa CellQuest Pro. Para la toma de imágenes por microscopía de fluorescencia o confocal, las células fueron montadas con una solución de Mowiol 4-88 (Calbiochem, Merck Millipore, Alemania) en portaobjetos de vidrio.

Todas las marcaciones se realizaron según las instrucciones del fabricante. Cada lote de anticuerpo fue titulado para utilizar la concentración óptima. En todos los casos se utilizó un control de isotipo correspondiente.

Fagocitosis de Apo-Nec por marcación con el colorante PKH67

Las células Mel-XY3 fueron marcadas previamente a su irradiación con el colorante PKH67 (MINI67-1KT, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Se descongelaron 50×10^6 células y se marcaron con una solución 2 μ M de PKH67, según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las células marcadas fueron irradiadas a 70 Gy y congeladas hasta su uso. Se elaboraron co-cultivos utilizando CDi y Apo-Nec PKH67⁺, que se incubaron a 37 °C en estufa gaseada y a 4 °C, como control por inhibición de la fagocitosis. Luego se procedió a la marcación con anti-CD86 PE y a su análisis por citometría de flujo a los tiempos indicados. El análisis de datos se realizó con el programa FlowJo. La población doble positiva fue considerada como el porcentaje de fagocitosis.

Ensayo de transferencia de cuerpos lipídicos

Las células Apo-Nec fueron marcadas con el colorante Bodipy previo al co-cultivo con las CD. Se realizaron co-cultivos con Apo-Nec Bodipy⁺ y otros con células sin marcar. Luego de 48 h, las muestras fueron marcadas con el anticuerpo anti-CD86PE y, en el caso de los controles sin marcar, también con Bodipy. Se realizaron controles a 4 °C. Las muestras fueron montadas en portaobjetos y analizadas en el microscopio de fluorescencia.

Reacción Mixta de Leucocitos

La capacidad de la vacuna de estimular células alogeneicas se evaluó por medio del ensayo de reacción mixta de leucocitos (MLR). Células de las diferentes condiciones a ensayar fueron lavadas e inactivadas con 15 μ g/ml de mitomicina C (Delta Farma, Buenos Aires, Argentina) en medio AIM-V durante 3 h a 37 °C. Luego de tres lavados con exceso de PBS fueron utilizadas como células estimuladoras. Los PBMC efectores alogeneicos fueron obtenidos a partir de sangre entera de un donante sano, según lo descrito anteriormente. Las células estimuladoras y las efectoras fueron co-cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano en 200 μ l de medio AIM-V. Se sembraron 3 relaciones de estimulador:efector (1:10, 1:100 y 1:1.000), manteniendo constantes los efectores en 3×10^5 por pocillo, por cuadruplicado. Se utilizó un control positivo de proliferación estimulando los PBMC con una solución 0,5 % v/v fitohemaglutinina (PHA) (Gibco, Invitrogen, Estados Unidos) en AIM-V. Luego de 4 días de incubación a 37 °C, se agregó un pulso de 0,5 μ Ci/pocillo de [³H]Timidina y se incubó hasta el día siguiente. Las células fueron cosechadas y analizadas en el contador de centelleo, como se describió en secciones anteriores.

Zimograma

La actividad de metaloproteasas presentes en los medios condicionados fue evaluada en zimogramas de gelatina. Las muestras fueron preparadas en buffer de carga sin β -mercaptoetanol y separadas por SDS-PAGE con poliacrilamida al 10 % y 1 mg/ml de gelatina Sigma G2500 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las corridas electroforéticas se realizaron en presencia de SDS, en condiciones no reductoras, a 150 V durante 60 min. Luego de remover el SDS, los geles se colocaron en buffer de incubación (50 mM Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 7,4) a 37 °C en agitación hasta el día siguiente. Finalmente, los geles se fijaron y colorearon en una solución de Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). Las imágenes de los geles fueron analizadas con el programa ImageJ. Según se indica, se incluyeron controles positivos, sembrando la proteína activa recombinante humana MMP-9 (rhuMMP-9) (Calbiochem, Estados Unidos), y negativos, agregando 25 mM EDTA al buffer de incubación para inhibir la actividad enzimática.

Migración in vitro en microcámara de quimiotaxis

La capacidad de respuesta migratoria a quemoquinas fue evaluada utilizando una microcámara de quimiotaxis AP48 (Neuroprobe Inc., Estados Unidos) (Figura 20.A), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las migraciones se ensayaron a través de membranas de policarbonato con poros de 5 μm (Neuroprobe Inc., Estados Unidos) frente a 10 ng/ml de CCL3 o CCL19 en medio AIM-V. Se incluyeron controles de migración espontánea en ausencia de quemoquinas. Se sembraron 5×10^4 CD por micropocillo y se dejaron 90 min a 37 °C. Las membranas se fijaron y se colorearon con Giemsa (Merck, Alemania). Se observaron 5 campos al azar de 400X en el microscopio óptico para el recuento de la migración. Todas las condiciones fueron evaluadas por triplicado en cada ensayo.

Migración in vitro en Transwell recubiertos con Matrigel

Los ensayos de invasividad de la vacuna fueron realizados en insertos Transwell para placa de 24 pocillos, con membranas PET con poros de 8 μm (BD Falcon, Estados Unidos). Las migraciones se evaluaron frente a 350 μl de soluciones 100 ng/ml de CCL3, CCL19 o medio AIM-V solamente. La cámara superior del Transwell fue recubierta con 70 μg proteínas de Matrigel (BD Biosciences, Estados Unidos), según instrucciones del fabricante, y luego cargada con 2×10^5 células en 200 μl de medio AIM-V (Figura 20.B). Las placas se incubaron a 37 °C en estufa gaseada hasta el día siguiente. El medio de la cámara inferior fue recolectado y

analizado por citometría de flujo, cuantificando los eventos en una adquisición de tiempo fijo (60 s). En las migraciones se incluyeron tratamientos con el MMP-9 Inhibitor I (Calbiochem, Estados Unidos) a una concentración de 1, 2 o 4 μM y el agregado de rhuMMP-9 a una concentración de 100, 200 o 300 ng/ml.

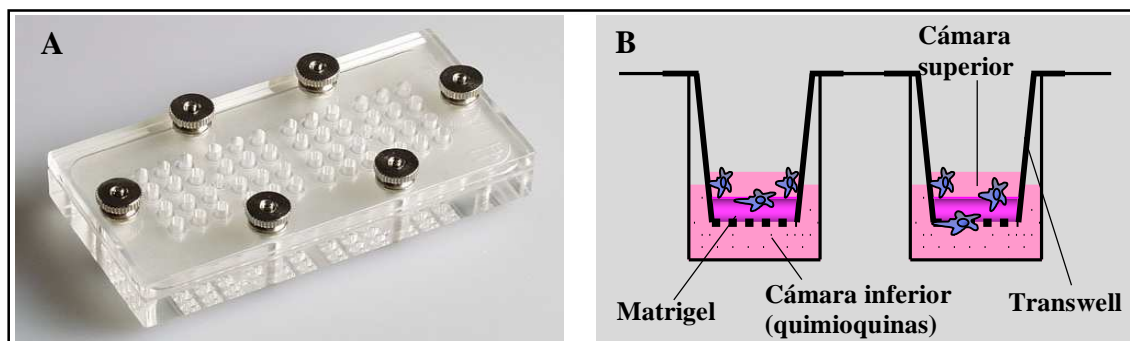


Figura 20. A. Microcámara de quimiotaxis AP48. B. Esquema del diseño de los Transwell recubiertos con Matrigel para caracterizar la migración invasiva de la vacuna.

Mapeo de los ganglios linfáticos de ratón con Azul de Evans

Se inocularon 50 μl de una solución de Azul de Evans en la almohadilla plantar trasera del ratón (Harrell et al., 2008). Luego de 30 min, los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 y se analizaron los GL regionales luego de la disección. Las referencias para el mapeo y la nomenclatura de los GL fueron tomadas de Van den Broeck *et al.*

Purificación celular por separación inmunomagnética

Todas las purificaciones celulares se realizaron por selección inmunomagnética positiva. Se utilizó el sistema MACS (Miltenyi, Alemania), según las indicaciones del fabricante (Figura 21). Para los experimentos de migración *in vivo*, se purificaron CDi del día 5 utilizando el anticuerpo magnético anti-DC-SIGN (Miltenyi Biotec, Alemania), previo a la preparación de los co-cultivos. Para los ensayos de presentación cruzada de Ag, se purificaron monocitos a partir de las células mononucleares con el anticuerpo magnético anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Alemania). Dichos monocitos purificados fueron utilizados para diferenciar las CD, como ya fue descrito. En todos los casos se verificó la viabilidad y la pureza (>90-95%) luego de la purificación inmunomagnética.

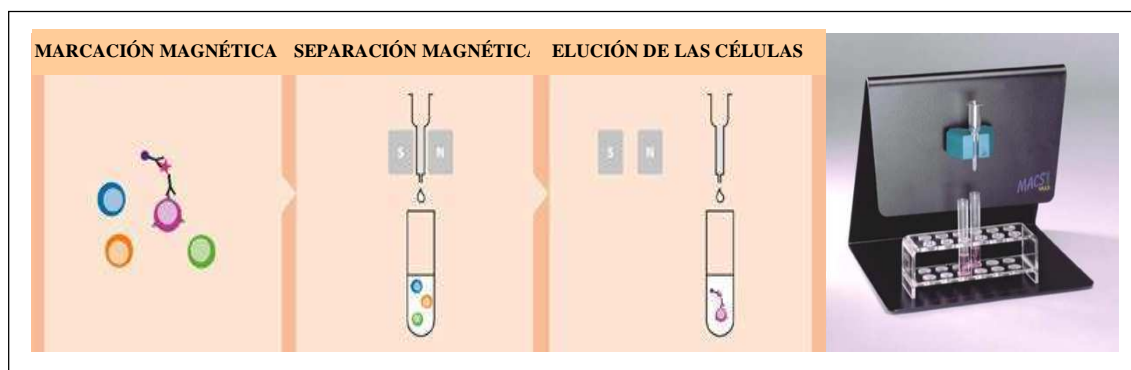


Figura 21. Estrategia de purificación inmunomagnética con el sistema MACS.

Marcación con el trazador celular fluorescente DiR

Se realizó la marcación de las células con una solución 1,75 $\mu\text{g/ml}$ del colorante DiR (Molecular Probes, Estados Unidos), según lo descrito por Kalchenko *et al.* Brevemente, las células se resuspendieron en una solución del colorante en PBS con 0,5 % etanol, a razón de 1×10^6 células/ml. Se incubó 30 min a 37 °C y luego se lavó dos veces con exceso de PBS. Luego del recuento de viabilidad, las células estaban listas para ser utilizadas.

Análisis de la migración de la vacuna por In vivo Imaging

Para las mediciones *in vivo* se utilizaron CD purificadas magnéticamente por DC-SIGN y marcadas con el colorante DiR, ambos procedimientos realizados previamente al armado del co-cultivo. Aproximadamente 1×10^6 células de las vacunas obtenidas luego de 48 h de co-cultivo fueron inoculadas por vía subcutánea en la almohadilla plantar trasera de ratones *nude*. Los animales fueron anestesiados con isoflurano (Figura 22.B y .C) y observados a diferentes tiempos en un bioluminómetro IVIS Lumina (Xenogen, Hopkington, Estados Unidos) en la Fundación Instituto Leloir (Figura 22.A y .D). Para analizar los GL drenantes del sitio de inyección *ex vivo*, los animales fueron sacrificados en cámara de CO_2 y los GL extraídos fueron dispuestos en un formato de *array* en una placa de 96 pocillos. La nomenclatura de los GL fue tomada de Van den Broeck *et al.* El porcentaje de migración se definió como la señal de DiR de los GL relativa a la del sitio de inyección. En todos los casos se utilizó la imagen del lado contralateral al inyectado para restar la señal basal del tejido.

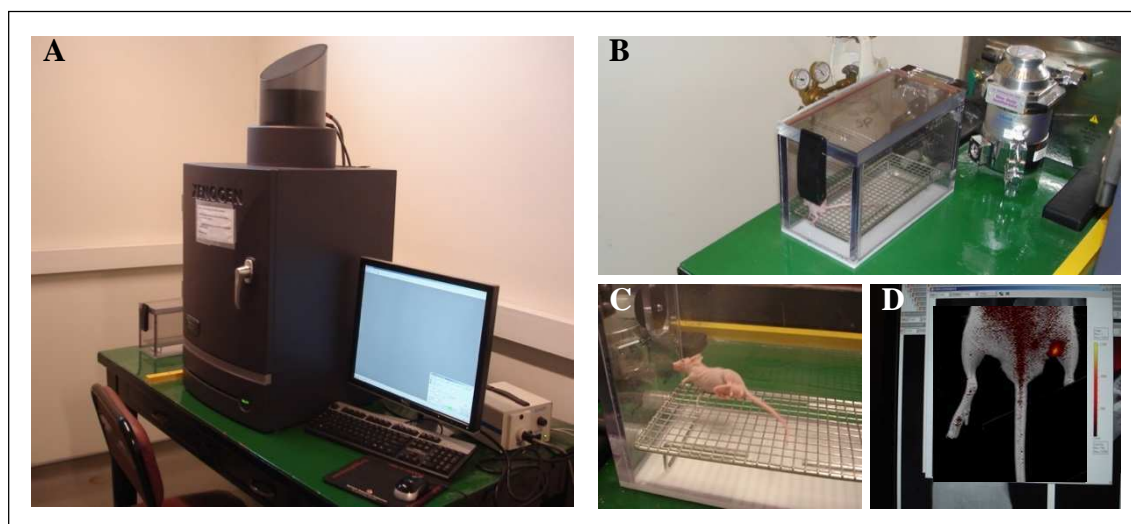


Figura 22. **A.** Bioluminómetro IVIS Lumina. **B** y **C.** Cámara para la anestesia de los animales con isofluorano. **D.** Obtención de las imágenes con el programa Living Image.

Disgregación mecánica de los ganglios linfáticos de ratón

Luego de 48 h de inocular la vacuna marcada con DiR, se extrajeron todos los GL en los cuales se había podido observado señal positiva en las imágenes y sus controles contralaterales. En una placa p60 con medio DMEM se procedió a cortar el material con tijera de cirugía. Ese medio fue transferido a un tamiz celular de 40 μm (BD Falcon, Estados Unidos) colocado sobre un tubo cónico de 50 ml. Los trozos de tejido fueron disgregados por fricción contra el tamiz con el émbolo de una jeringa de tuberculina. Las células recuperadas a través del tamiz fueron lavadas con exceso de PBS y marcadas con anti-CD11c-PE y anti-DC-SIGN-FITC (clon DCN47.5, Miltenyi Biotec, Alemania), y luego analizadas por citometría de flujo.

Marcación con el trazador celular fluorescente CM-DiI

Las CDi purificadas magnéticamente por DC-SIGN fueron marcadas con 2 $\mu\text{g/ml}$ CM-DiI (Molecular Probes, Estados Unidos), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se resuspendieron en una solución del colorante en PBS, a razón de 1×10^6 células/ml. Se incubó 30 min a 37 °C y luego se lavó con exceso de PBS dos veces. Luego del recuento de viabilidad, las células se utilizaron en los experimentos.

Cortes por congelación de tejido de ratón

El material extraído fue colocado en una solución de formaldehído 4 % v/v en PBS a 4 °C hasta el día siguiente. En el caso de los sitios de inyección (pata posterior del ratón), se incluyó una

incubación extra luego de la fijación con una solución 10 % EDTA en agua pH 7,4, hasta descalcificar la pieza. Luego, el material fijado se lavó y se transfirió a una solución de sacarosa 30 % m/v en PBS a 4 °C. Por último, a las piezas se les removió el exceso de solución criopreservante y se incluyeron en un compuesto de Temperatura Óptima de Corte (OCT) sobre un molde adecuado. El taco generado se conservó a -20 °C. Los cortes histológicos fueron realizados en un crióstato Leica CM1850 UV (Leica, Alemania) y se colocaron sobre portaobjetos de vidrio con carga positiva (Patholab, China). Se realizó una contratinción con una solución del colorante Hoechst y se montaron con ProLong Gold (Molecular Probes, Estados Unidos), para ser observados en microscopio de fluorescencia. Algunos cortes del material analizado fueron coloreados con Hematoxilina de Harris para referencia.

Administración del MMP-9 Inhibitor I en las migraciones in vivo

Durante el ensayo de migración *in vivo* de 48 h, en algunos ratones en los cuales se había inyectado la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC, se administraron diariamente 50 µl de una solución 12 µM del MMP-9 Inhibitor I en PBS con una inoculación en el sitio de vacunación. Luego se procedió a la evaluación de la migración como se describió anteriormente.

Administración de adyuvantes en las migraciones in vivo

Para el ensayo de migración *in vivo* de 48 h con BCG, se co-administraron 333 UFC de BCG en aquellos ratones inoculados con la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC.

En el caso del Imiquimod, la aplicación en los ratones fue realizada con la crema tópica Imimore, 5% Imiquimod (Laboratorio Panalab, Argentina). La crema fue administrada localmente sobre la almohadilla plantar y se dejó absorber durante 5-10 min. Las aplicaciones comenzaron 24 h antes de la inyección y se continuaron diariamente hasta las 48 h post-inyección.

ELISA

La liberación de diferentes citoquinas a los sobrenadantes de los co-cultivos de la vacuna y de los ensayos funcionales fue evaluada por la técnica de ELISA. Las determinaciones se realizaron utilizando kits BD OptEIA (BD Biosciences, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante. Las placas se revelaron con el reactivo TMB (BD Biosciences, Estados Unidos) y fueron analizadas en un lector de placas a 450 nm. Se evaluaron las citoquinas humanas IFN- γ , IL-4, IL-10, IL-12p70, TGF- β 1 y TNF.

Ensayo de presentación cruzada de Ag in vitro

Se utilizó un clon de células T CD8⁺ específico para el Ag MART-1 (AAGIGILTV) restringido al HLA-A*0201 (clon M26), cedido gentilmente por el Dr. Cassian Yee (Yee et al., 2002). Para estos experimentos, se realizó la purificación inmunomagnética de monocitos por el Ag CD14, a partir de *buffy coats* de donantes sanos de haplotipo HLA-A*0201, para luego diferenciar las CD para los co-cultivos. Se plaquearon 3×10^5 CD en placas de 24 pocillos en medio AIMV. Dependiendo del experimento, se utilizaron diferentes tiempos de co-cultivo CD/Apo-Nec y diferentes relaciones CD:Apo-Nec. Pero en todos los casos, las vacunas y los controles fueron co-cultivados con el clon M26 en una relación 3:1 en un volumen final de 600 μ l y se dejaron a 37 °C hasta el día siguiente. Se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -80 °C para ser analizados por ELISA.

Estimulaciones in vitro de linfocitos naïve con vacunas autólogas

Se aislaron PBMC a partir de *buffy coats* de donantes sanos. Una parte de los PBMC se separó inicialmente y se sembró en placas de 6 pocillos, a razón de $1,5 \times 10^6$ células/ml, en medio AIMV suplementado con 20 U IL-2 y 5 ng/ml IL-7. En los días 3 y 5 de cada semana se renovó la mitad del medio de cultivo con medio fresco con citoquinas (Schnurr et al., 2001). Sobre estos linfocitos *naïve* (PBMC respondedores) se evaluó el efecto estimulador de la vacuna. El resto de los PBMC se dividió y congeló para luego generar las vacunas autólogas semanalmente para estimular a los linfocitos *naïve*. Se comparó el efecto de CD sin cargado de Ag, la vacuna CD/Apo-Nec y la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC. Las estimulaciones se realizaron semanalmente agregando las vacunas en una relación 20:1 (PBMC:vacuna) en los cultivos de PBMC respondedores, a lo largo de 4 semanas (Figura 23).

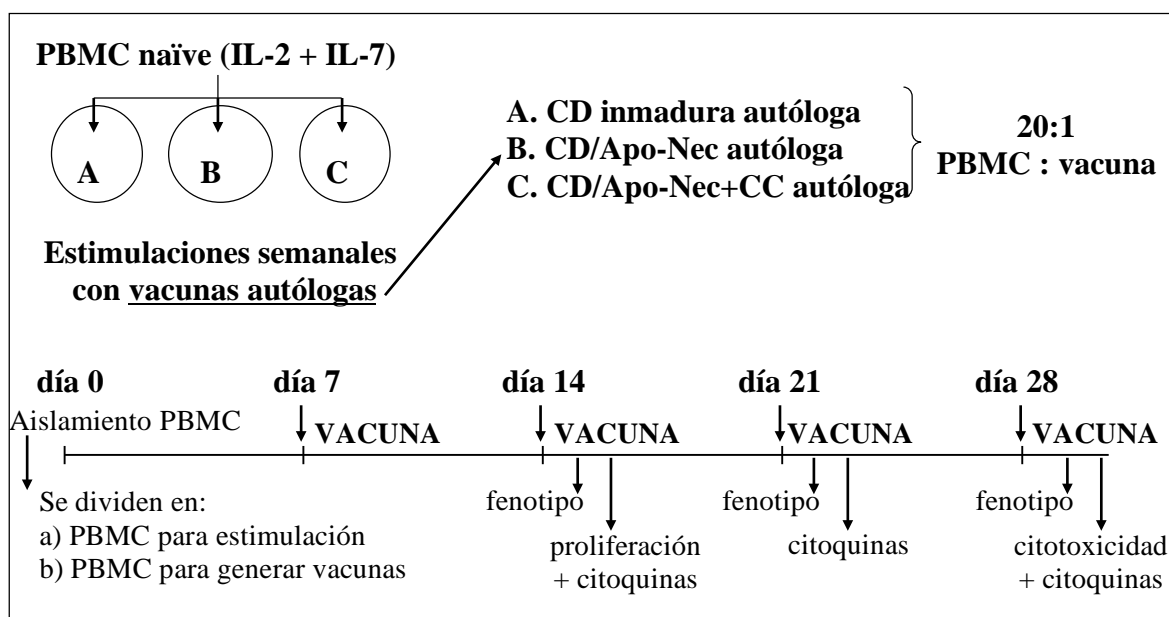


Figura 23. Esquema de estimulación *in vitro* de linfocitos *naive* con la vacuna CD/Apo-Nec y los parámetros evaluados a cada tiempo.

Luego de las re-estimulaciones se evaluaron parámetros de la respuesta anti-tumoral inducida por las vacunas comparadas. A las 24 h de exposición a la vacuna, se determinaron las poblaciones linfocitarias presentes y el nivel de activación de los PBMC. A las 48 h de exposición a la vacuna, se tomaron muestras del medio condicionado de los cultivos para determinar el perfil de citoquinas secretadas. Además, se evaluaron dos características funcionales específicas: la capacidad proliferativa (luego de la segunda re-estimulación) y la capacidad citotóxica sobre células tumorales blanco (luego de la cuarta re-estimulación).

Fenotipo de los linfocitos estimulados

Los marcadores analizados fueron (fluorocromo y clon del anticuerpo utilizado): CD3 (FITC, UCHT1 y PerCP, SK7), CD4 (FITC, RPA-T4), CD8 (FITC, RPA-T8 y PE, HIT8a), CD25 (PE, M-A251), CD28 (APC, CD28.2), CD56 (PE, NCAM16.2), CD69 (APC, FN50), CTLA-4 (APC, BNI3), CD62L (PE, DREG-56), CD45RA (PE, HI100), CD45RO (APC, UCHL1), FoxP3 (AlexaFluor 647, 259D/C7), ICOS (PE, DX29) y PD-1 (PE, FAB7115P, Policlonal de cabra) (R&D Systems, Estados Unidos) (Tabla 2). En cada determinación se utilizaron $3,5 \times 10^5$ células por tubo para la marcación. Se adquirieron 50.000 eventos de cada tubo en el análisis por citometría de flujo. Se evaluó el fenotipo de los PBMC al inicio del esquema de re-estimulaciones con las vacunas y se realizó un control positivo de activación con 30 ng/ml anti-CD3 (clon HIT3a NA/LE, BD Pharmingen, Estados Unidos) y 0,1 % PHA durante 48 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8
FITC	CD3	CD3	CD3	CD3	CD3	CD4	CD8	CD8
PE	CD8	CD8	CD56	CD45RA	CD26L	CD25	PD-1	ICOS
PerCP							CD3	CD3
APC/AF647	CD28	CD69	CTLA-4	CD45R0	CD28		FoxP3	

Tabla 2. Esquema de marcación para el fenotipo de los linfocitos.

Ensayo de proliferación de linfocitos con CFSE

Luego de 48 h de la segunda re-estimulación, los PBMC fueron marcados con 5 μ M CFSE (CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit, Molecular probes, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante. Las células marcadas fueron re-expuestas durante 4 días a las vacunas para evaluar su capacidad de respuesta proliferativa. Se sembraron 4×10^5 PBMC efectores en placas de 24 pocillos en medio AIM-V fresco, en un volumen final de 1 ml y el estímulo de vacuna se agregó en una relación 3:1. En el caso de los PBMC HLA-A*0201⁺ también fueron enfrentados a células viables Mel-XY3 (línea celular de melanoma, blanco específico) e IIB-BR-G (línea celular de cáncer de mama, blanco inespecífico) utilizadas como estímulo. Las células viables fueron evaluadas en 3 relaciones efector:estímulo, 5:1, 10:1 y 20:1. Luego de los 4 días de co-cultivo con los PBMC respondedores, las células fueron analizadas por citometría de flujo. Se realizaron controles de células sin marcar para todos los puntos evaluados, un control de arresto celular con mitomicina C, según lo descrito previamente, y control positivo de proliferación con el agregado de 30 ng/ml anti-CD3 y 0,1 % PHA. La proliferación se calculó en base al porcentaje de eventos con disminución de la fluorescencia de CFSE, comparado a su respectivo control de arresto celular.

Ensayo de citotoxicidad

Luego de 48 h de exposición a la cuarta vacuna, la última en el esquema de re-estimulaciones, los PBMC HLA-A*0201⁺ fueron co-cultivados con las líneas celulares Mel-XY3 y IIB-BR-G viables como células blanco, para evaluar el efecto citotóxico sobre las mismas. Por un lado, 2×10^6 células tumorales fueron marcadas con 0,5 μ M CFSE, según las indicaciones del fabricante. Los co-cultivos se armaron en placas de 96 pocillos opacas de fondo en U colocando 5×10^3 células blanco en medio AIM-V en un volumen final de 200 μ l. Los PBMC se agregaron en relación 10:1, 20:1 y 40:1 (efector:target) y todas las condiciones fueron evaluadas por triplicado. Las placas se incubaron en estufa a 37 °C hasta el día siguiente. Previo al análisis por citometría de flujo, se agregó 1 μ g/ml 7-AAD (Molecular probes, Invitrogen, Estados Unidos) en todos los wells. Otra estrategia para este ensayo consistió en la realización de un co-cultivo doble, marcando las células Mel-XY3 con 0,5 μ M CFSE y las IIB-BR-G con 0,5 μ M

CMTMR (Molecular probes, Life Technologies, Estados Unidos), según las indicaciones del fabricante, y sembrándolas juntas con las células efectoras en las mismas relaciones detalladas anteriormente. De la misma manera, luego del co-cultivo de una noche a 37 °C, se las marcó con el reactivo 7-AAD y se analizó por citometría de flujo. En todos los casos se incluyeron controles de muerte espontánea de las células blanco y controles positivos de inducción de apoptosis por shock térmico. El porcentaje de citotoxicidad calculado corresponde a las células tumorales 7-AAD⁺ con pérdida de integridad de membrana.

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos en los que se evalúan tratamientos sobre las células tumorales se realizaron con un diseño completamente aleatorizado. Esos datos se analizaron mediante análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, con comparaciones múltiples entre tratamientos.

Los experimentos en los que se evalúan características fenotípicas o funcionales de las CD se elaboraron con un diseño de bloques al azar. En estos casos los datos correspondientes a las CD obtenidas de cada donante sano fueron considerados como bloque, para cada ensayo. Los datos fueron analizados con ANOVA de dos o tres factores. Los análisis de los efectos principales y entre grupos se realizaron por comparaciones múltiples de Tukey.

En todos los casos, se verificó que se cumplieran los supuestos para realizar un análisis paramétrico y los supuestos particulares de cada prueba. En los experimentos con líneas celulares, el tamaño de la muestra (n) corresponde al número de repeticiones independientes de cada experimento. En el caso de las CD, el n corresponde al número de muestras independientes de donantes sanos que se procesaron en cada ensayo. La significación estadística fue considerada con un $\alpha = 0,05$ y las probabilidades se indican como * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ y *** $p < 0,001$. Los resultados que se muestran en los gráficos corresponden a la Media \pm Error Estándar (EE). Los datos presentados en las tablas corresponden a los intervalos de confianza del 95% (IC_{95%}) del porcentaje de la magnitud del efecto en cada caso.



RESULTADOS



CAPÍTULO I

**Caracterización de la fuente de antígeno
(Apo-Nec) y la interacción con las
células dendríticas en el co-cultivo de la
vacuna CD/Apo-Nec**

1. Caracterización de la integridad de las células tumorales luego de ser irradiadas

Se estudiaron diferentes parámetros de las células tumorales de melanoma luego de ser tratadas con altas dosis de radiación ionizante gamma. Se buscó describir y caracterizar los procesos que ocurren durante la muerte celular para determinar las condiciones de integridad y antigenicidad en las cuales las células de las líneas de melanoma serían expuestas a las CD.

1.1. Determinación de la viabilidad y el proceso apoptótico/necrótico post-irradiación

Las 3 líneas celulares de melanoma analizadas presentan una disminución abrupta en la viabilidad luego de ser irradiadas a 70 Gy, determinada por la integridad celular evaluada por la exclusión con Azul de Tripano. La línea Mel-XY1 muestra una mayor sensibilidad en las primeras horas post-irradiación, pero luego las 3 líneas celulares presentan una respuesta similar. El proceso va incrementando gradualmente a lo largo de los días alcanzando el máximo a las 72 h post-irradiación, donde casi ninguna célula tumoral conserva la integridad de su membrana (Figura 24).

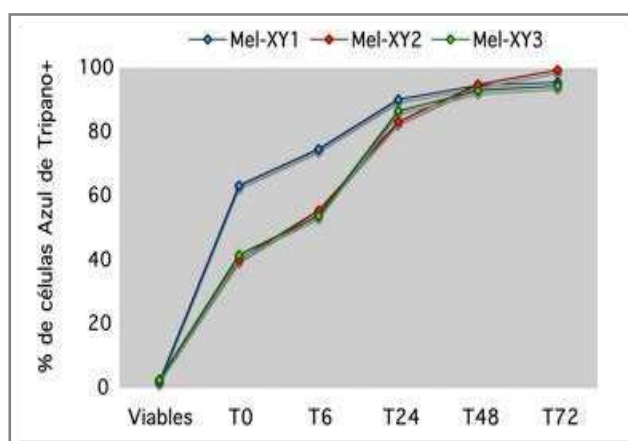


Figura 24. Pérdida de la integridad celular en las líneas de melanoma Mel-XY1, Mel-XY2 y Mel-XY3, evaluado por la exclusión del colorante vital Azul de Tripano.

La caracterización de la muerte de las células Mel-XY3 con Anexina-V (Anex-V) e Ioduro de Propidio (IP) muestra una mezcla de células apoptóticas y necróticas luego de la irradiación a 70 Gy. Estos datos concuerdan con los resultados de integridad celular, observándose una pérdida de aproximadamente un 50 % de la viabilidad como consecuencia directa de la irradiación. El resto de las células son una mezcla de células apoptóticas tempranas ($\text{Anex-V}^+ \text{IP}^-$), apoptóticas tardías/necróticas secundarias ($\text{Anex-V}^+ \text{IP}^+$) y necróticas ($\text{Anex-V}^- \text{IP}^+$). La proporción de células que no muestra estos marcadores disminuye rápidamente en el tiempo, aumentando la proporción de células que sufren apoptosis y disminuyendo lentamente

las células necróticas. La dinámica del proceso es similar si se somete a las células a una dosis menor de radiación ionizante (25 Gy) (Figura 25).

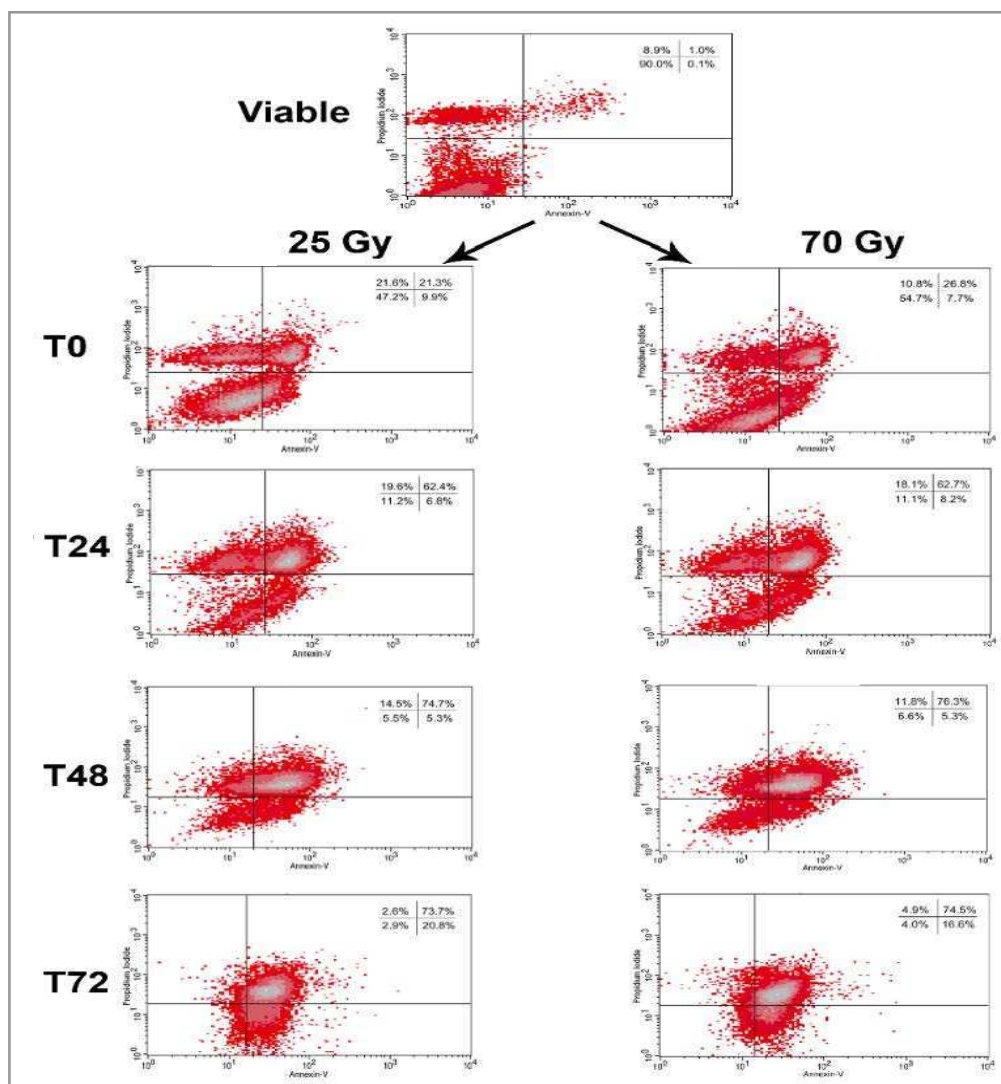


Figura 25. Determinación del estado de apoptosis/necrosis de las células Mel-XY3 luego de distintas dosis de radiación ionizante, determinado por citometría de flujo.

1.2. Capacidad proliferativa de las células post-irradiación

Luego de ser irradiadas, las células Mel-XY3 fueron sembradas en agar blando para evaluar su capacidad de crecer independiente de anclaje y formar colonias. Se comparó el crecimiento de células irradiadas con las dosis de 25 y 70 Gy, utilizando como control las células Mel-XY3 previas a la irradiación y células Mel-XY3 provenientes de un cultivo exponencial. En ambos casos, la capacidad proliferativa de las células irradiadas fue totalmente abolida. Los cultivos fueron observados a lo largo de 3 semanas y en ningún momento se

detectó el crecimiento de colonias, mientras que las células Mel-XY3 viables presentaron crecimiento de colonias desde la primera semana del cultivo (Figura 26).

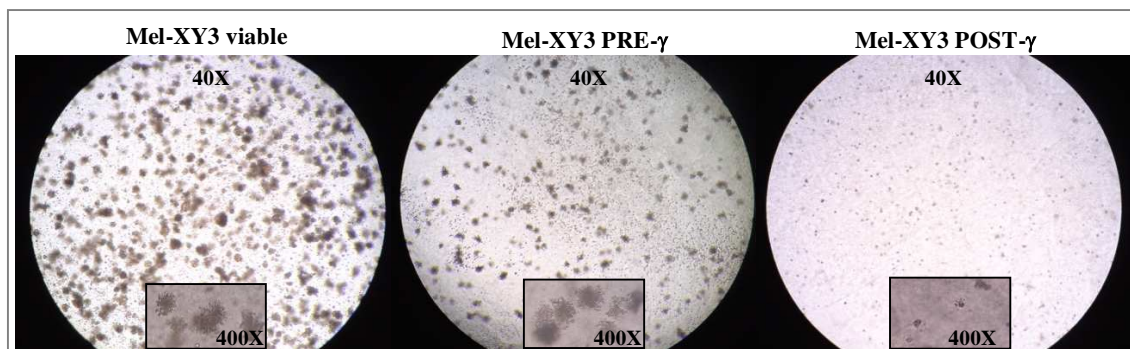


Figura 26. Crecimiento en agar blando de células Mel-XY3 viables de cultivo, Mel-XY3 previo a la irradiación 70 Gy (PRE- γ) e irradiadas (POST- γ), a los 14 días de cultivo. En el rectángulo inferior se detalla la morfología de las células/colonias del cultivo.

En todos los casos, las células irradiadas perdieron inmediatamente la capacidad de sintetizar ADN. La proliferación de las células viables en cultivo fue evidenciada por la importante incorporación de [3 H]-Timidina en el proceso. Luego de ser irradiadas, las 3 líneas celulares perdieron esa capacidad y se mantuvieron arrestadas durante las siguientes 72 h (Figura 27).

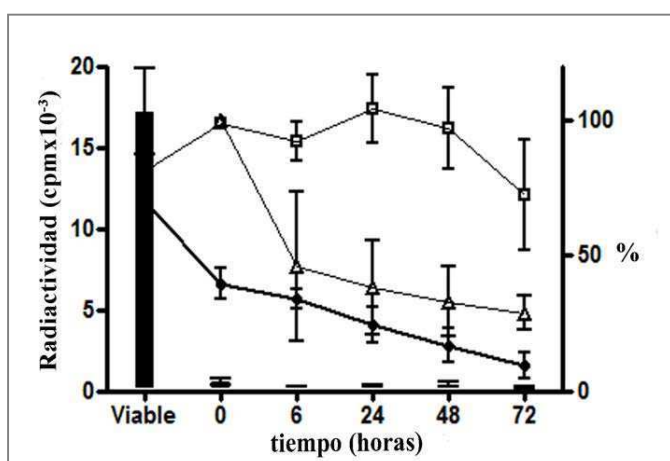


Figura 27. Evolución de la integridad de las células Mel-XY3 luego de la irradiación a 70 Gy. La síntesis de ADN se determinó por incorporación de [3 H]-Timidina (barras negras). Se muestran los porcentajes: células totales (□), viabilidad por exclusión con Azul de Tripano (●) y contenido proteico (▲), por el método de Bradford (Bradford, 1976).

1.3. Contenido proteico y antigénico de las células post-irradiación

Dado que las células tumorales irradiadas constituyen la fuente de Ag para el cargado de las CD, era de particular importancia determinar el contenido proteico luego de la irradiación, tanto en la cantidad de proteína como en el tipo de Ag disponibles.

En primer lugar, se cuantificó el contenido proteico en las células viables y luego de ser irradiadas. Como ya habíamos observado, las células se degradan durante el proceso apoptótico/necrótico en las primeras 72 h, disminuyendo el número de células totales (Figura 27). Sin embargo, el contenido proteico presente en las células parece perderse más rápidamente. Luego de irradiar con 70 Gy las células Mel-XY3 se perdió inmediatamente alrededor de un 38 % del contenido de proteínas, cuantificado por el método de Bradford. Durante el proceso apoptótico/necrótico, esta pérdida siguió se profundizó hasta alcanzar un descenso máximo de aproximadamente un 75 % del total de proteínas presentes en las células viables (Figura 28). Esto implica que por cada 1×10^5 células Mel-XY3 irradiadas se podrían ofrecer 3,45 μg de proteínas a las CD durante su co-cultivo, pero esta cantidad disminuiría a 1,50 μg si se deja avanzar 48 h el proceso apoptótico antes de ser utilizadas como fuente de Ag.

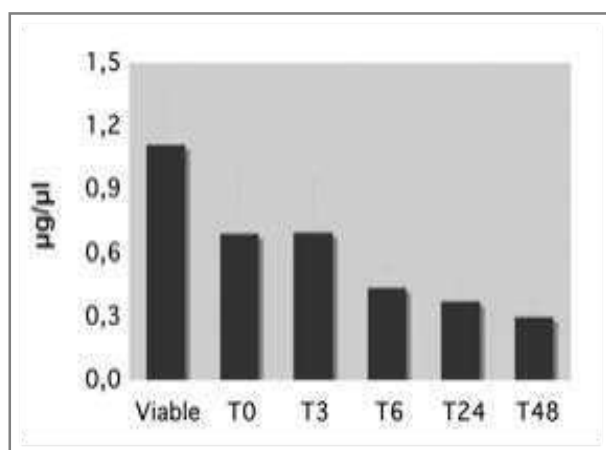


Figura 28. Cuantificación del contenido proteico mediante el método de Bradford de células Mel-XY3 viables y a distintos tiempos (T 0, 3, 6, 24 o 48 h) luego de ser irradiadas a 70 Gy ($n=3$).

Posteriormente, se determinó si el proceso de irradiación afectaba la expresión de Ag característicos y relevantes en las células tumorales, como las moléculas de HLA-I y Ag asociados al melanoma, luego del proceso de irradiación. Observamos que hay una subpoblación de las células que comienza a perder la expresión del complejo de HLA y que esta pérdida alcanza casi a la totalidad de las células luego de apenas 48 h (Figura 29.A). En cuanto a otros Ag de superficie, se observa de la misma manera una tendencia a la disminución en la expresión de los gangliósidos GD-2 y GD-3 (dato no mostrado).

Adicionalmente, se analizaron Ag intracelulares específicos, en particular el Ag de diferenciación melanocítica MART-1. Se evaluó cómo variaba su expresión en células viables y luego de la irradiación ionizante. De las 3 líneas de melanoma analizadas, las células Mel-XY3 viables fueron las que expresaban mayores niveles del Ag (Figura 29.B). Incluso más

importante, es que el Ag MART-1 seguía siendo detectado en las células tumorales varios días post-irradiación (Figura 29.C). A pesar de que las células perdían rápidamente su contenido proteico luego de la irradiación, el Ag MART-1 presentó una dinámica de degradación más lenta, enriqueciéndose alrededor de 1,5 veces, en relación a otras proteínas celulares de expresión constitutiva como la β -actina (Figura 29.D).

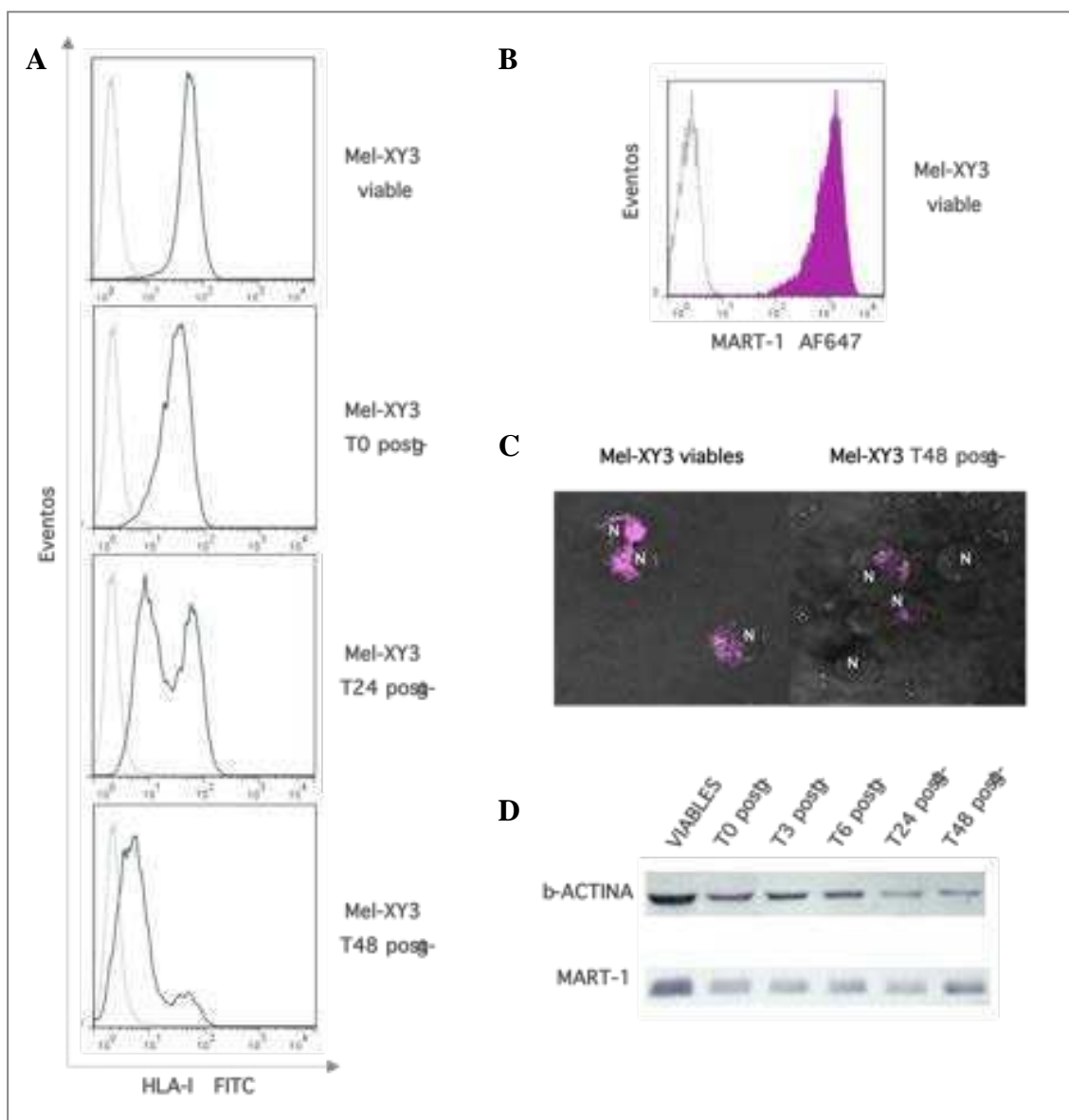


Figura 29. **A.** Histogramas representativos de la expresión del complejo HLA-I en la superficie de células Mel-XY3 viables y su evolución a diferentes tiempos (T 0, 24 o 48 h) luego de la irradiación a 70 Gy (post- γ), determinado por citometría de flujo. **B** y **C.** Expresión del Ag MART-1 en células Mel-XY3 viables y 48 h luego de la irradiación (T48 post- γ), determinado por citometría de flujo y microscopía confocal, respectivamente. AF647=AlexaFluor 647. N=núcleo. **D.** Determinación por *western-blot* del contenido

intracelular de MART-1 en células Mel-XY3 viables y a diferentes tiempos (T 0, 3, 6, 24 o 48 h) post-irradiación (post- γ), en relación a la expresión de la proteína β -actina como referencia.

2. Caracterización del contenido lipídico de las células tumorales luego de ser irradiadas

Se estudiaron en profundidad las características del contenido lipídico de las células tumorales de melanoma luego de ser tratadas con altas dosis de radiación ionizante gamma. El aumento de los LB inducidos por radiación representaba una importante característica de las células de las líneas de melanoma, ya que constituían un componente importante del material que podría ser capturado por las CD durante el co-cultivo de la vacuna.

2.1. Aparición de grandes cuerpos lipídicos luego de la irradiación

Sumado a los procesos que se suceden luego de la irradiación descriptos anteriormente, las células de melanoma sufrieron además cambios progresivos en su morfología, con variación del tamaño celular, *bubbling* de la membrana plasmática y la aparición de un elevado número de vesículas esféricas en el citoplasma, que sugerían un origen lipídico (Figura 30.A). Este fenómeno fue observado en todos los lotes de células irradiadas preparados.

Como una primera aproximación hacia la determinación de la naturaleza de estas estructuras se realizaron 2 técnicas de tinción. En primer lugar, se utilizó el colorante liposoluble Oil Red O para visualizar específicamente lípidos neutros. De esta manera, observamos que las células de melanoma viables contenían una moderada cantidad de pequeños LB. Luego del proceso de irradiación, estos LB incrementaban en número y tamaño y parecían ser secretados hacia el exterior de las células (Figura 30.B y .C). Utilizando una segunda estrategia con el colorante fluorescente Bodipy 493/503, específico para lípidos neutros, pudimos confirmar que las estructuras observadas al microscopio óptico correspondían precisamente a los LB (Figura 30.D y .E). Para el estudio de los mismos se hizo la distinción entre los LB de las células viables y los LB inducidos por radiación. Estas determinaciones de los lípidos citoplasmáticos fueron realizadas sobre células de las líneas Mel-XY1, Mel-XY2 y Mel-XY3.

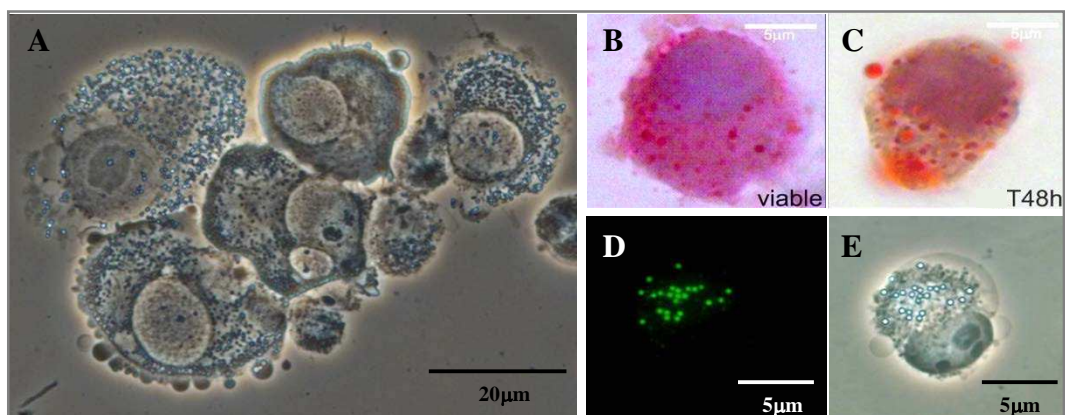


Figure 30. **A.** Aspecto al microscopio óptico de células Mel-XY1 48 h luego de ser irradiadas a 70 Gy. **B y C.** Detalle de la tinción con el colorante de lípidos neutros Oil Red O de una célula Mel-XY3 viable y otra 48 h luego de ser irradiada a 70 Gy (T 48 h), respectivamente. **D y E.** Detalle de la tinción con el colorante fluorescente Bodipy 493/503 de una célula Mel-XY3 48 h luego de ser irradiada a 70 Gy y su aspecto al microscopio óptico.

Se analizó la localización celular de los LB de las células tumorales para determinar si estaban asociados a Ag de interés, como MART-1, normalmente asociado a las membranas lipídicas de los melanosomas. Las imágenes de microscopía confocal revelaron que en ningún caso hay co-localización entre los lípidos citoplasmáticos y el Ag MART-1 (Figura 31). Esto no se observa en las células viables ni en ninguno de los tiempos post-irradiación estudiados.

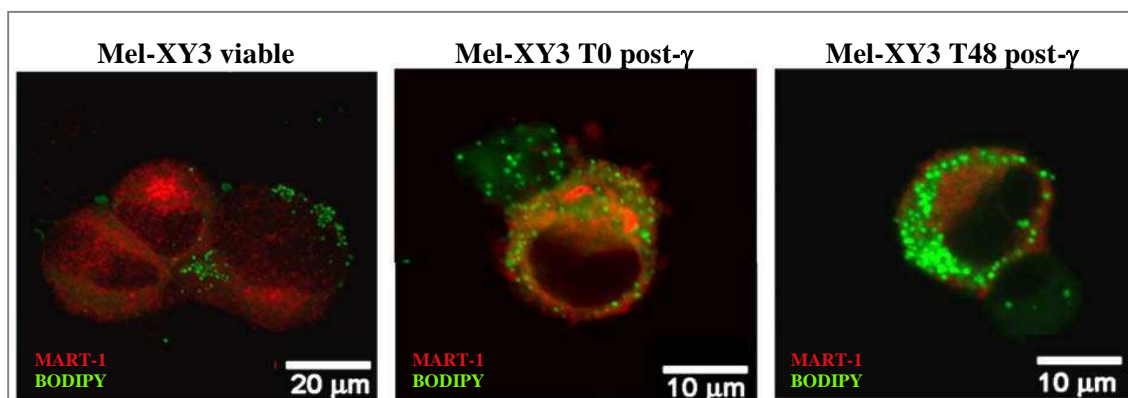


Figura 31. Localización celular del Ag MART-1 y de los LB en células Mel-XY3 viables y luego de la irradiación (post- γ), determinado por microscopía confocal.

2.2. Dinámica de formación de los cuerpos lipídicos inducidos por irradiación

Utilizando el colorante Bodipy 493/503, que marca específicamente los LB, se procedió a cuantificar por citometría de flujo la aparición de estos lípidos luego de la irradiación. Se compararon los LB de las células Mel-XY3 viables con los inducidos por radiación, durante el desarrollo del proceso apoptótico-necrótico de las células. Se observó que las células viables comprendían una población homogénea en cuanto al contenido lipídico, con una pequeña proporción de células, cercana al 10 %, con una media de fluorescencia más alta. Con la irradiación a 70 Gy, el incremento de los LB no fue inmediato, pero luego de las primeras 24 h el cambio resultó evidente. En ese momento apareció una población bien diferenciada, de más del 30 % de las células totales, con mayor contenido lipídico. El aumento continuó de manera progresiva, manteniéndose una población heterogénea, llegando a un máximo de casi un 40 % con mayor contenido de lípidos neutros a las 48 h post-irradiación. A partir de ese momento, el porcentaje de células con mayor intensidad de Bodipy 493/503 comenzó a disminuir, aunque conservaba una alta intensidad de fluorescencia. Esta cuantificación fue confirmada por la observación al microscopio de estas poblaciones heterogéneas (Figura 32).

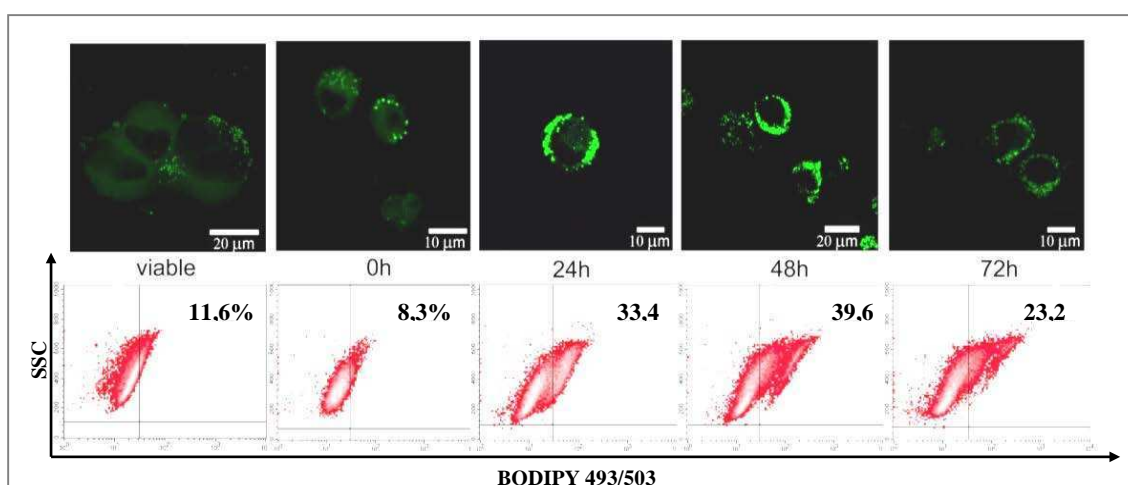


Figura 32. Cuantificación de los LB citoplasmáticos. Células Mel-XY3 viables y a distintos tiempos post-irradiación se marcaron con el colorante Bodipy 493/503 y se analizaron por citometría de flujo. Se muestra además una imagen representativa de cada tiempo.

2.3. Análisis bioquímico de los cuerpos lipídicos

Para estudiar y comparar la naturaleza bioquímica de los LB de las células viables y los inducidos por radiación, éstos se aislaron a partir de células Mel-XY3 viables y 48 h post-irradiación. Se caracterizó por cromatografía de capa delgada la composición de lípidos neutros y fosfolípidos (Figura 33.A y .C). Los LB están compuestos principalmente por triglicéridos tanto en células viables como irradiadas, pero al relativizarlos por el contenido proteico se duplican en las células irradiadas. De la misma manera, el colesterol libre aumenta, no así los ésteres de colesterol (Figura 33.B). En cuanto a los fosfolípidos, luego de la normalización por cantidad de proteína, se observaron incrementos en fosfatidil-etanolamina, fosfatidil-colina, esfingomiolina y fosfatil-inositol en los LB de las células irradiadas, pero una disminución en la lisofosfatidil-etanolamina (Figura 33.D).

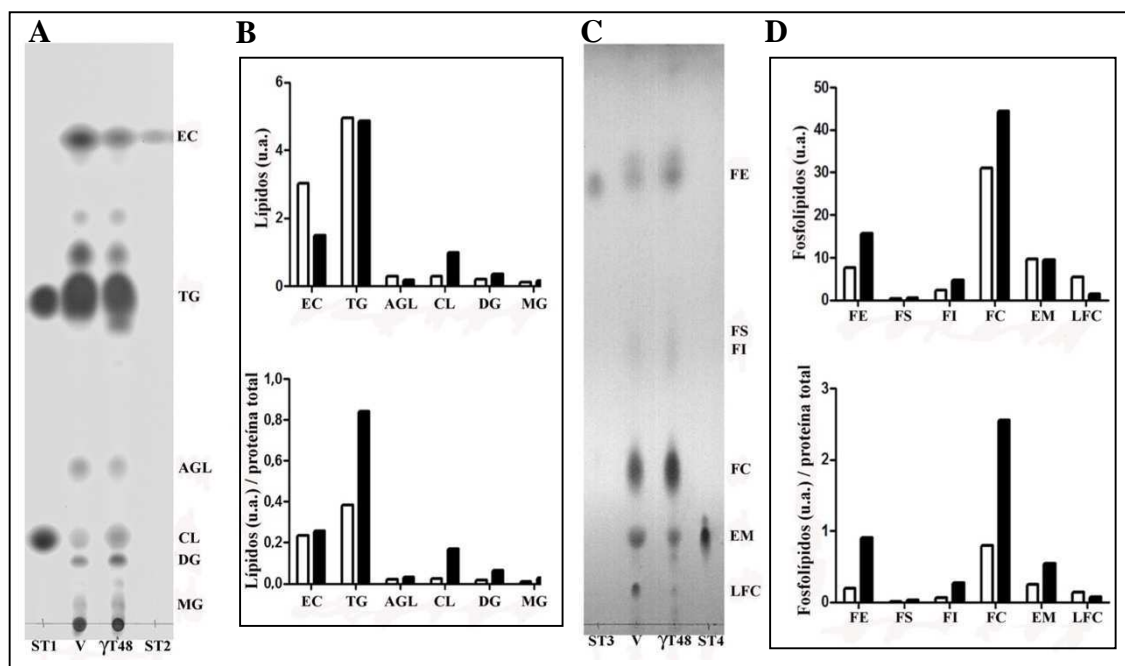


Figura 33. A. Cromatografía en capa delgada representativa para la caracterización de los lípidos neutros presentes en los LB, en células Mel-XY3 viables (V) e irradiadas (γT48). ST1=Estándar de Trioleína+Colesterol (10 µg), ST2= Estándar de Palmitato de Colesterol (1 µg), EC=Ésteres de Colesterol, TG=Triglicéridos, AGL=Ácidos Grasos Libres, CL=Colesterol Libre, DG=Diglicéridos y MG=Monoglicéridos. B. Arriba, densitometría de la placa para lípidos neutros en unidades arbitrarias (u.a.). Abajo, densitometría de lípidos neutros relativizados al contenido de proteína total. C. Cromatografía en capa delgada representativa para la caracterización de los fosfolípidos presentes en los LB, en células Mel-XY3 viables (V) e irradiadas (γT48). ST3= Estándar de Fosfatidil-Etanolamina, ST4= Estándar de Esfingomiolina, FE=Fosfatil-Etanolamina, FS=Fosfatidil-Serina, FI=Fosfatidil-Inositol, FC=Fosfatidil-Colina, EM=Esfingo-Mielina y LFC=Lisofosfatidil-Colina. D. Arriba, densitometría de la placa para fosfolípidos en unidades arbitrarias (u.a.). Abajo, densitometría de fosfolípidos relativizados al contenido de proteína total.

2.4. Generación de los cuerpos lipídicos en las células irradiadas

Para dilucidar los posibles mecanismos por los cuales se incrementan en cantidad y número los LB inducidos por radiación, se agregó un pulso del precursor de síntesis lipídica [¹⁴C]-ácido acético a los cultivos celulares. Se cuantificó su incorporación por células Mel-XY3 viables y a distintos tiempos luego de ser irradiadas con 70 Gy. Observamos una importante incorporación de radiactividad en las células viables que, luego de la irradiación, se reduce abruptamente y sigue en descenso durante las primeras 24 h. En los días posteriores se incrementa levemente la fijación del [¹⁴C]-ácido acético en las células, pero los niveles correspondían a un 10 % de lo incorporado por las células viables (Figura 34.A). El mismo patrón se pudo observar en los LB extraídos de estas células. A pesar del incremento que se produjo en la cantidad de triglicéridos que los conforman, éste no fue acompañado por una mayor incorporación del precursor [¹⁴C]-ácido acético (Figura 34.B).

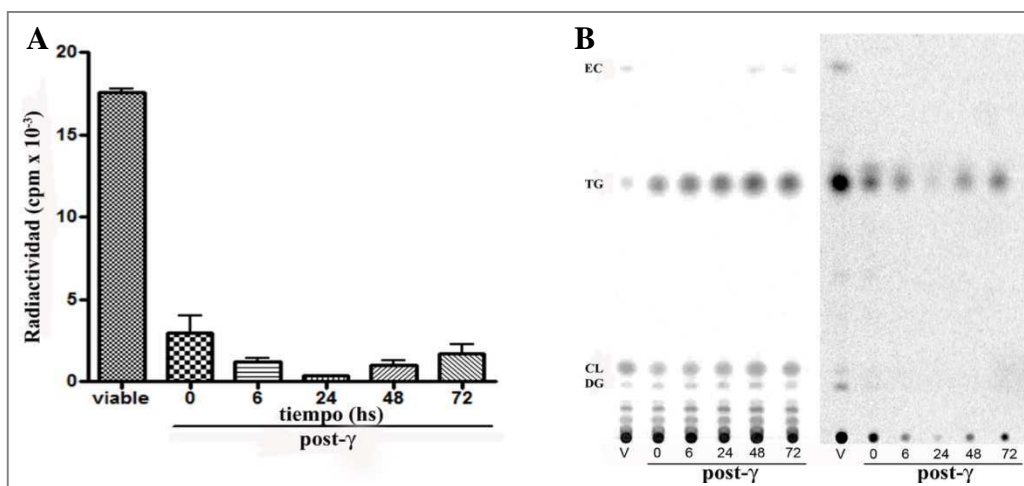


Figura 34. **A.** Síntesis de ácidos grasos en células Mel-XY3 enteras. Se cuantificó la incorporación de [¹⁴C]-ácido acético en células viables y a distintos tiempos luego de su irradiación (post- γ). **B.** Izquierda, cromatografía en capa delgada de los lípidos neutros en células Mel-XY3 viables (V) e irradiadas a distintos tiempos (post- γ). Derecha, revelado radiactivo de la placa. EC=Ésteres de Colesterol, TG=Triglicéridos, CL=Colesterol Libre y DG=Diglicéridos.

Con la intención de modular los niveles de los lípidos neutros, se utilizó la droga C75 en células Mel-XY3 viables para inhibir una de las vías de síntesis lipídica. Se ensayó el efecto del C75 realizando una curva de concentraciones de la droga, desde 1 μ g/ml hasta 50 μ g/ml. A través de un ensayo de incorporación de [¹⁴C]-ácido acético en las células Mel-XY3 viables,

se pudo observar una disminución significativa ($p < 0,05$) en la incorporación del precursor a partir de la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor, pero sin una reducción en la cantidad de LB por célula (datos no mostrados). Al analizar el efecto de la droga sobre la viabilidad de las células Mel-XY3 mediante un ensayo de MTT, se observó que el inhibidor C75 disminuía la proliferación celular significativamente a partir de una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Al analizar estas células por marcación de Anexina-V e ioduro de propidio, se pudo observar que estas células comenzaban a sufrir un proceso apoptótico/necrótico.

3. Co-cultivo de las células dendríticas con las células Apo-Nec

Se analizó la interacción en cultivo entre las células Mel-XY3 irradiadas a 70 Gy, denominadas Apo-Nec, y CD derivadas de monocitos humanos. Se determinó la respuesta de estas CDi durante la preparación de la vacuna, al ser co-cultivadas con las células Apo-Nec como fuente de Ag, focalizándonos en su maduración y captación de Ag tumorales.

3.1. Maduración de las células dendríticas

Se analizó la expresión de una serie de marcadores presentes en las CDi y cómo ésta variaba luego de la utilización de diferentes estímulos de maduración, como el LPS y el CC y, en particular, el efecto del co-cultivo con las células Apo-Nec (Figura 35).

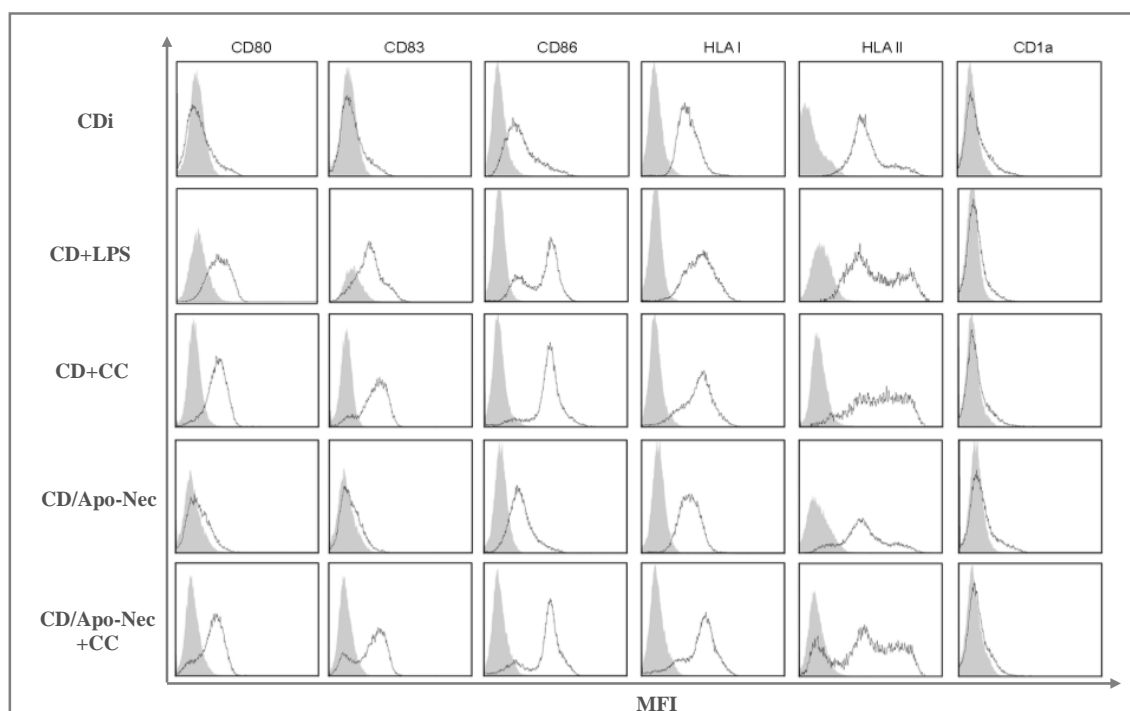


Figura 35. Histogramas representativos de la expresión de marcadores de maduración en las CDi y luego de 48 h de maduración con distintos estímulos. El sombreado gris corresponde al control de isotipo. La serie de datos de cada marcador fueron obtenidos de un mismo donante sano.

Las CDi derivadas de monocitos, luego de 5 días de diferenciación, eran en su totalidad CD11c⁺ y CD14⁻. Se estudiaron los cambios en la expresión de las moléculas CD80, CD86, CD83, CD1a, HLA-I y HLA-II. También se analizó la expresión de receptores de quemoquinas (datos presentados en el Capítulo II de los Resultados de la presente Tesis). La maduración de las CD con un estímulo conocido como el LPS fue tomada como referencia para evaluar los cambios en la expresión de estas moléculas en las CDi, observándose un aumento significativo de los marcadores CD80, CD86 y CD83 ($p < 0,05$) y una modulación menor de las moléculas de los complejos de HLA. El estímulo inducido por el CC sobre las CDi fue más fuerte, produciendo un aumento de mayor magnitud en los marcadores de maduración (Tabla 3). En ninguno de los casos se pudo modificar significativamente la baja expresión de CD1a. Las células Mel-XY3 Apo-Nec indujeron un efecto moderado sobre la maduración, resultando no significativo en la mayoría de los casos y con mayor variabilidad entre dadores, comparado con los demás controles de maduración.

Maduración de las CDi	Incremento en la expresión (IC ₅₀)			Incremento en la MFI (IC ₅₀)	
	CD80	CD86	CD83	HLA-I	HLA-II
CD+LPS	(284,7 ± 161,9)% † *	(52,5 ± 30,2)% † *	(317,7 ± 225,1)% † *	(33,7 ± 50,2)% †	(29,9 ± 39,0)% †
CD+CC	(412,3 ± 99,8)% † *	(88,6 ± 7,2)% † *	(684,3 ± 159,4)% † *	(18,7 ± 43,7)% †	(56,3 ± 57,9)% † *
CD/Apo-Nec	(102,9 ± 103,5)% †	(56,8 ± 14,5)% † *	(27,4 ± 44,8)% †	(17,7 ± 15,9)% †	(1,4 ± 32,7)% †

Tabla 3. Modulación de la expresión de moléculas co-estimuladoras y presentadoras de Ag en CDi luego de ser expuestas a diferentes estímulos de maduración (LPS, CC o células Apo-Nec). Los resultados se expresan con los intervalos de confianza de la magnitud del efecto de los tratamientos (n=8).

3.2. Uso del cóctel de citoquinas pro-inflamatorias en el co-cultivo CD/Apo-Nec

Con la intención de aumentar y homogenizar la maduración de las CD durante el co-cultivo con las células Apo-Nec, se agregó el CC durante las 48 h de preparación de la vacuna. De esta manera, se pudo observar un incremento significativo de la maduración, con una fuerte regulación positiva de los marcadores CD80, CD83, CD86, HLA-I y HLA-II en las CD de la vacuna (Figura 35). El CC incrementó hasta 5 veces la expresión de los marcadores de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec, mientras que los complejos de HLA aumentaron alrededor de un 80 % (p<0,001) (Tabla 4).

vacuna CD/Apo-Ne	Modulación de la expresión (IC ₅₀)			Modulación de la MFI (IC ₅₀)	
	CD80	CD86	CD83	HLA-I	HLA-II
Agregado de CC	(213,6 ± 49,5)% † ***	(38,8 ± 3,0)% † ***	(566,4 ± 109,9)% † **	(78,9 ± 30,5)% † ***	(79,3 ± 53,7)% † ***

Tabla 4. Modulación de la expresión de marcadores de maduración en la vacuna CD/Apo-Nec mediante el agregado del CC (n=3). Los resultados se expresan con los intervalos de confianza de la magnitud del efecto del tratamiento, expresada en porcentaje.

3.3. Fagocitosis de las células Apo-Nec y aumento de los cuerpos lipídicos en las células dendríticas

Las células Apo-Nec ofrecen los Ag para generar la vacuna CD/Apo-Nec, los cuales son activamente incorporados, procesados y presentados por las CDi. Se determinó el porcentaje de CD que fagocitaban partes o restos de las células Apo-Nec, o en otras palabras, la eficiencia de cargado de la vacuna con el material derivado de las células de melanoma irradiadas. Para esto, las células Apo-Nec se marcaron con el colorante fluorescente PKH67 previamente al co-cultivo. De esta manera pudimos cuantificar la cantidad de CD que efectivamente incorporaban restos de estas células durante las 48 h de su co-cultivo. A ese

tiempo, aproximadamente el 50 % de la mezcla de células de la vacuna CD/Apo-Nec corresponde a CD CD86⁺ que incorporaron restos celulares provenientes de las células Apo-Nec (Figura 36.A y .B). Un proceso de maduración abrupto de las CD, inducido por la utilización de CC durante el co-cultivo, no impactó negativamente en la fagocitosis de las células Apo-Nec. En este caso, la fagocitosis fue de alrededor del 40 %, pero esta disminución no fue significativa. Este fue un proceso activo por parte de las CD, ya que en ambos casos la fagocitosis fue inhibida por completo a 4 °C (p<0,01) (Figura 36.A).

Además de la captura de restos de Apo-Nec totales, se estudió la captura de Ag específicos por parte de las CD. Como ya se había determinado anteriormente, las células Mel-XY3 viables presentan una alta expresión del Ag MART-1, que disminuye luego de la irradiación, pero en los días subsiguientes se conserva diferencialmente respecto a otras proteínas citoplasmáticas. Al preparar el co-cultivo de la vacuna con células Apo-Nec a T 0 h post-irradiación, el Ag MART-1 muestra una alta expresión y se encuentra disponible para ser capturado por las CD. Se determinó que durante el co-cultivo el Ag MART-1 disminuye mucho más rápidamente que en las células Apo-Nec solas, haciéndose evidente esta disminución ya a las 24 h de cultivo (Figura 33.C).

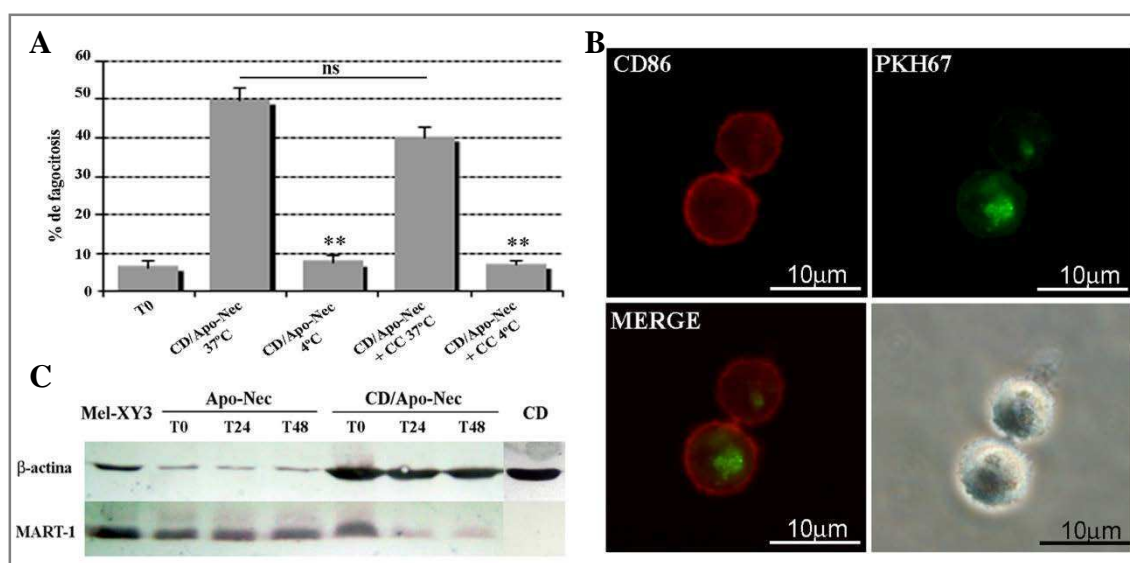


Figura 36. A. Cuantificación de la fagocitosis de las células Apo-Nec por citometría de flujo. El porcentaje de fagocitosis corresponde a la población CD86⁺PKH67⁺ en el co-cultivo. Se comparó la mezcla inicial CD+Apo-Nec (T0) con co-cultivos de 48 h, incubados a 37° C o 4 °C (n=6). B. Fotos obtenidas por microscopía de fluorescencia de una CD CD86⁺ con trazas de Apo-Nec en su interior (PKH67⁺). C. Western-blot del Ag MART-1 en células Mel-XY3 viables o irradiadas a 70 Gy (Apo-Nec), a diferentes tiempos, y en los co-cultivos con CD (vacuna CD/Apo-Nec), manteniendo la misma proporción de células Apo-Nec,

Mediante el análisis del co-cultivo por microscopía confocal, se evaluó la captura del Ag MART-1 y la presencia de LB, tanto en las células Apo-Nec como en las CD (Figura 37). Primero, se pudo determinar que la proteína MART-1, ofrecida por las células Apo-Nec y que era eliminada rápidamente en el co-cultivo, era incorporada por las CD. Además, se observó que las CDi contenían LB citoplasmáticos y que éstos aumentaban en número con la maduración. Sin embargo, en el co-cultivo, donde eran fagocitadas las células Apo-Nec que además de MART-1 presentaban un nivel muy alto de LB, las CD presentaban un aumento mayor en cantidad y tamaño de sus LB (Figura 37).

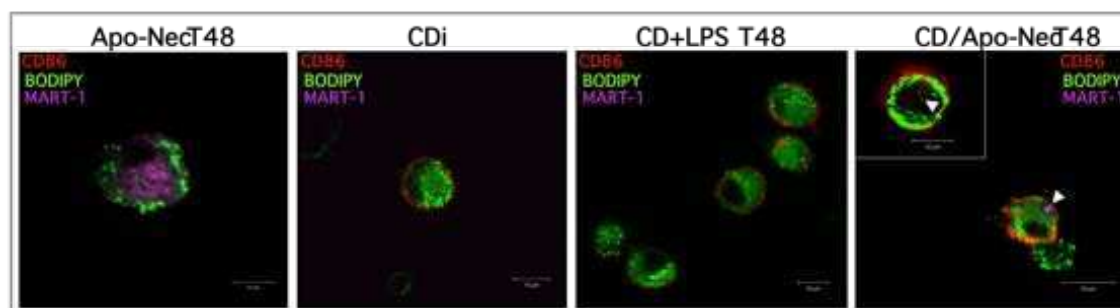


Figura 37. Captura del Ag MART-1 y aumento de los LB en las CD luego de 48 h de co-cultivo con las células Apo-Nec. Se muestra la fusión de los distintos canales adquiridos en las imágenes, obtenidas por microscopía confocal. Los triángulos blancos indican la presencia de MART-1 intracelular en las CD.

Previamente, ya se había observado mediante la marcación con Oil Red O que las células Apo-Nec expulsaban, al menos en parte, sus LB (Figura 30.C), y se lo pudo confirmar mediante la marcación con Bodipy 493/503 en los cultivos clonogénicos (Figura 38.A). Entonces, para evaluar una posible transferencia de estos LB desde las células Apo-Nec a las CD, se desarrolló una estrategia experimental que permitió analizar este proceso. La marcación de las células Apo-Nec con Bodipy 493/503 era retenida y mantenida en las células, sin pérdida ni transferencia inespecífica del colorante, durante varios días. Esto permitió marcar las células Apo-Nec de manera previa a su co-cultivo con las CD y evaluar, luego de 48 h, la presencia de LB marcados dentro de estas últimas. Efectivamente, se pudo observar que algunos LB eran capturados por las CD luego del co-cultivo con las células Apo-Nec (Figura 38.B), siendo éste un proceso activo, ya que no se observó dicha transferencia cuando el cultivo se incubaba a 4 °C. Sin embargo, este fenómeno observado no llega a explicar el aumento total de los LB en las CD de la vacuna.

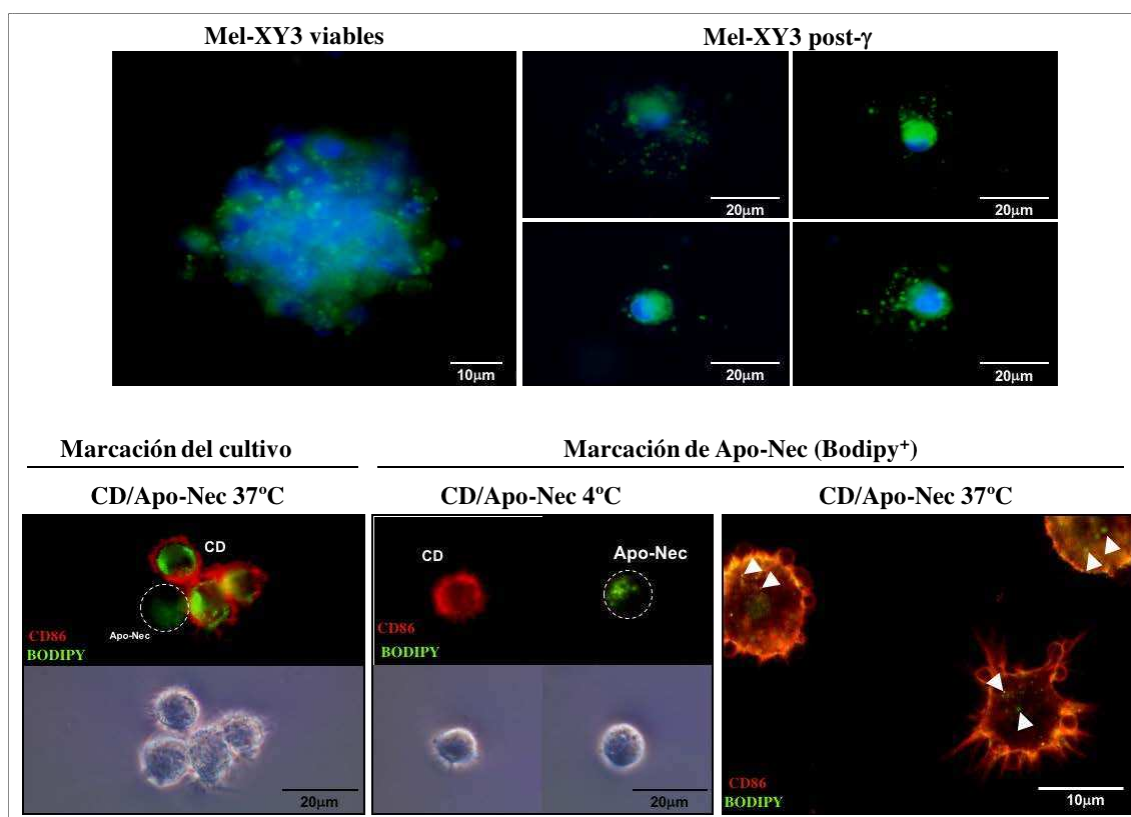


Figura 38. A. Cultivo clonogénico de 7 días de células Mel-XY3 viables e irradiadas a 70 Gy (post- γ), marcado con Bodipy 493/503 (verde) y Hoescht (azul). **B.** Marcación con Bodipy 493/503 para detectar transferencia de LB en el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec. Por un lado, se realizó una marcación del co-cultivo a las 48 h con CD86 y Bodipy. Por otro, se marcó solamente a las células Apo-Nec con Bodipy previamente al co-cultivo, y a las 48 h se hizo la marcación para CD86. Estos últimos cultivos se incubaron en paralelo a 37 °C y a 4 °C.

4. Efecto del contenido lipídico de las células Apo-Nec sobre la función de las células dendríticas luego del co-cultivo

Debido al marcado incremento de lípidos en las CD luego del co-cultivo con células Apo-Nec, se decidió determinar si este hecho podía interferir con alguna de sus funciones presentadoras e inmunomoduladoras. Se comparó la interacción de las células en cultivo y algunos parámetros funcionales de la vacuna, mediante la utilización de células Apo-Nec que ofrecieran diferente contenido lipídico a las CD. Este análisis se realizó teniendo en cuenta el grado de maduración las CD en los co-cultivos.

4.1. Interacción entre las células Apo-Nec y las células dendríticas en cultivo

Dado que los cuerpos lipídicos observados en las células Mel-XY3 luego de la irradiación no se generaban *de novo* y no se pudo inhibir su formación, se utilizaron células Apo-Nec con distinto contenido lipídico, conociendo la dinámica de formación de los LB de las mismas. Se elaboraron los co-cultivos CD/Apo-Nec utilizando células Apo-Nec inmediatamente luego de descongelarlas (Apo-Nec-T0), las cuales ofrecen un alto contenido lipídico, y se los comparó con co-cultivos realizados utilizando células Apo-Nec que permanecieron plaqueadas durante 72 h (Apo-Nec-T72), las cuales ya han liberado parte de los LB y por ende ofrecen un menor contenido lipídico a las CD. De esta manera, se contó con dos condiciones de células Apo-Nec para utilizar como fuente de Ag. Éstas se combinaron en co-cultivos con CD, con el uso alternativo del CC para inducir su maduración.

Al analizar el aspecto de los co-cultivos al microscopio óptico, se observaron importantes diferencias en la interacción entre las células. En ausencia del CC, las CD tenían un fenotipo más adherente a la placa de cultivo y se generaban grandes cúmulos de células. Los co-cultivos de las CD con Apo-Nec-T0 presentaban cúmulos de un tamaño relativamente mayor que en los co-cultivos con Apo-Nec-T72. Con una inmunomarcación para CD86, se pudo distinguir que las CD se ubicaban en la periferia de grandes cúmulos de células Apo-Nec. En cambio, cuando se preparaban los co-cultivos en presencia del CC, indistintamente de las células Apo-Nec utilizadas, las CD adquirían un fenotipo menos adherente y la mayoría de ellas se encontraban sueltas en suspensión, sin grandes cúmulos de células Apo-Nec (Figura 39).

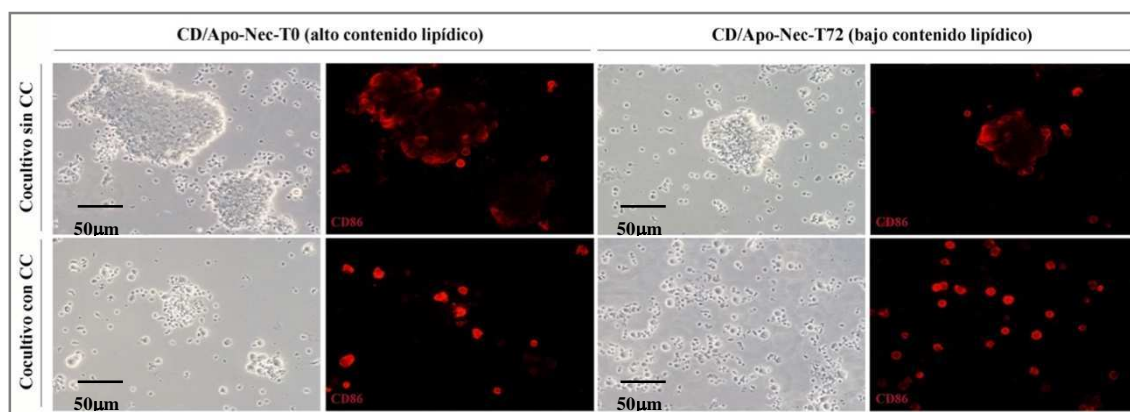


Figura 39. Co-cultivos preparados con células Apo-Nec descongeladas al momento del co-cultivo (Apo-Nec-T0) o 72 h antes (Apo-Nec-T72) y con el agregado alternativo del CC. Observación al microscopio óptico e inmunomarcación para CD86.

4.2. Fagocitosis de antígenos y presencia de lípidos en las células dendríticas

Además de describir las características de la interacción entre las células durante el co-cultivo, se buscó determinar si la diferencia de contenido lipídico de las células Apo-Nec modulaba de alguna manera el contenido lipídico de las CD de la vacuna, así como la incorporación de Ag, como MART-1.

El cambio en la fuente de Ag no generó diferencias en cuanto al contenido lipídico de las CD. Tanto en el co-cultivo con Apo-Nec-T0 como con Apo-Nec-T72, se observó un incremento en la cantidad y el tamaño de los LB citoplasmáticos de las CD, similar en ambas condiciones. Otra observación interesante fue que el agregado de CC tampoco modificaba el contenido lipídico de las CD de la vacuna, a pesar del marcado aumento del estado de maduración (Figura 40). La detección del Ag MART-1 capturado por las CD, fue similar en todas las condiciones, con un leve incremento en el co-cultivo con Apo-Nec-T72.

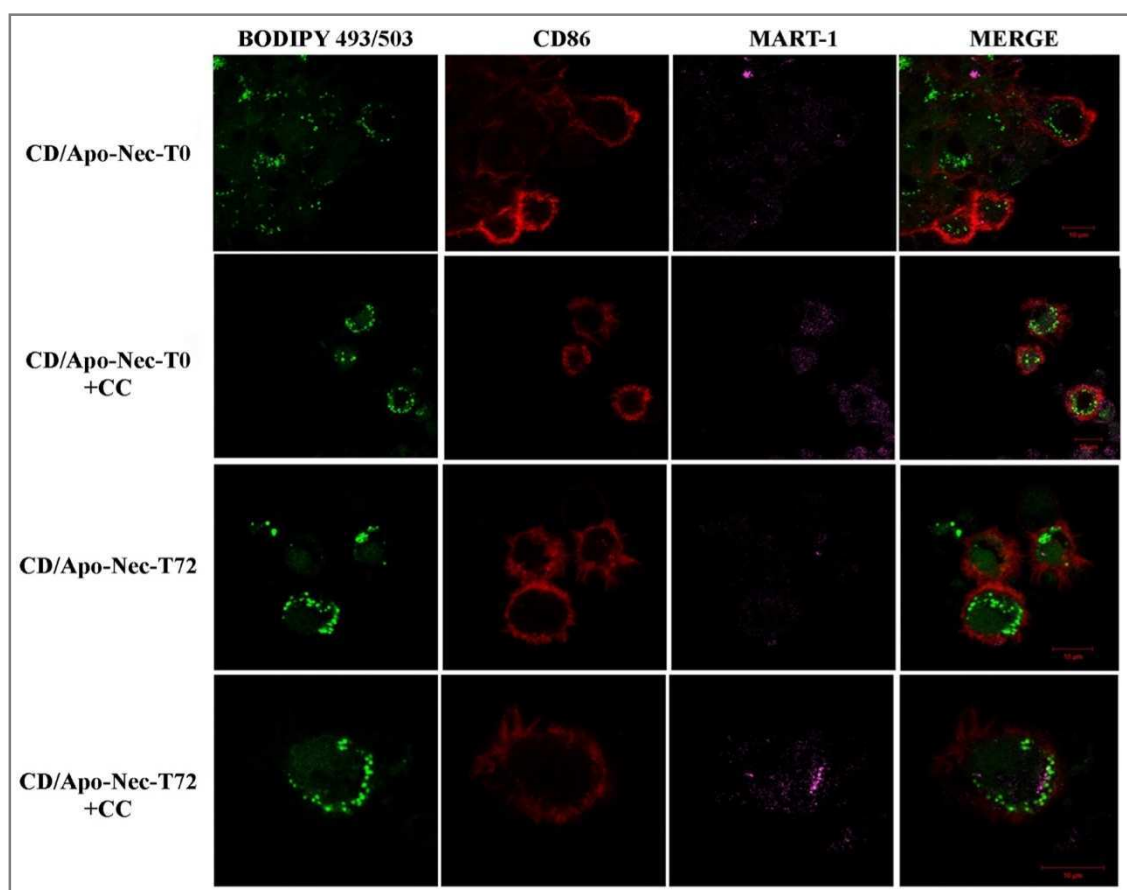


Figura 40. Análisis del contenido lipídico y MART-1 de la vacuna preparada con células Apo-Nec descongeladas al momento del co-cultivo (Apo-Nec-T0) o 72 h antes (Apo-Nec-T72) y con el agregado alternativo del CC, por microscopía confocal.

4.3. Capacidad estimuladora de las células dendríticas sobre linfocitos alogeneicos

Por último, luego de haber evaluado las interacciones en cultivo y la fagocitosis de las células Apo-Nec con distinto contenido lipídico, se determinó si eran diferentes como estímulo de maduración de las CD y cómo se veía reflejado en la estimulación de linfocitos alogeneicos en un ensayo de MLR.

Mediante el análisis de la expresión de algunos marcadores de superficie, como CD80, CD86, CD83 y HLA-II, se pudo observar una tendencia a una mayor maduración de las CD cuando se co-cultivaban con Apo-Nec-T72, de menor contenido lipídico, aunque no fue una diferencia estadísticamente significativa. Al agregar el CC, utilizando tanto Apo-Nec-T0 como Apo-Nec-T72, la maduración aumentaba notablemente, pero manteniendo la tendencia observada según el contenido lipídico de las células Apo-Nec. En estas condiciones, las células de la vacuna fueron enfrentadas a linfocitos alogeneicos para evaluar su capacidad estimuladora, en un ensayo de MLR (Figura 41). Mientras que las CDi generaban una activación mínima de los linfocitos y la maduración con LPS inducía un incremento de aproximadamente 10 veces en la proliferación, la maduración de las CD con CC generaba una estimulación máxima significativa sobre los linfocitos alogeneicos ($p < 0,001$). En este contexto, las vacunas CD/Apo-Nec tenían una baja capacidad estimuladora, apenas mayor que la inducida por las CDi, independientemente del contenido lipídico de las células Apo-Nec utilizadas al realizar los co-cultivos. El agregado de CC durante la preparación de los co-cultivos tiene un alto impacto en la respuesta proliferativa inducida sobre los linfocitos alogeneicos ($p < 0,001$). Nuevamente, este efecto es independiente del contenido lipídico de las células Apo-Nec, alcanzando un valor similar entre ambos co-cultivos, pero levemente menor que el generado por el control de CD maduras solamente con CC.

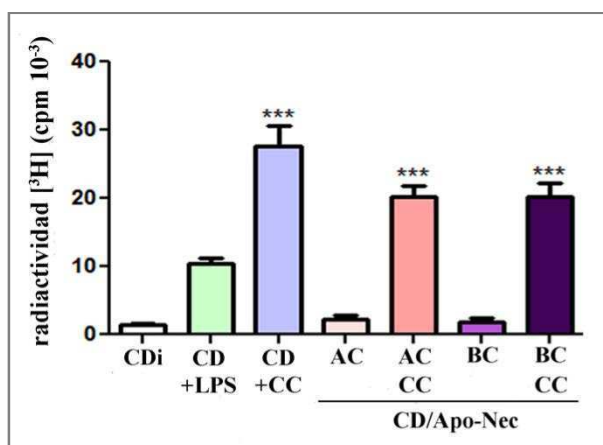


Figura 41. Respuesta del ensayo de reacción leucocitaria mixta (relación efector:target 10:1) de la vacuna CD/Apo-Nec, comparando el uso de células Apo-Nec con distinto contenido lipídico (AC=alto contenido lipídico, BC=bajo contenido lipídico) y el agregado del CC. Se utilizaron CDi y maduras con LPS o CC como controles ($n=3$).

Resumen

Capítulo I: Caracterización de la fuente de antígeno (Apo-Nec) y la interacción con las células dendríticas en el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec

- Se caracterizó la integridad de las células de melanoma luego de ser tratadas con altas dosis de irradiación gamma. Las células presentan una pérdida total de la viabilidad y capacidad proliferativa, atravesando un proceso apoptótico/necrótico, con disminución gradual del contenido proteico total. En particular, la expresión del complejo HLA-I se pierde, mientras que MART-1 se conserva.
- Se estudió en profundidad la inducción de LB citoplasmáticos en las células luego de la irradiación. El marcado incremento de los LB producido en las primeras 48 h comienza luego a disminuir y esos lípidos son liberados por las células irradiadas al medio. El análisis de su composición bioquímica revela un predominante aumento de los triglicéridos, que no provienen de la síntesis *de novo* a partir del precursor ácido acético en las células.
- Se analizó la interacción en cultivo de las CD con las células irradiadas (Apo-Nec), como fuente de Ag. Las células Apo-Nec inducen una activación de las CD, que es incrementada considerablemente con el agregado del cóctel de citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2. Las CD fagocitan los restos de las células Apo-Nec y procesan Ag tumorales, como MART-1, mientras adquieren un fenotipo maduro. Durante este proceso, también aumentan los lípidos citoplasmáticos de las CD, que sólo en una pequeña proporción son transferidos directamente por las células Apo-Nec.
- Se estudió el efecto de los lípidos citoplasmáticos sobre la función de las CD, utilizando células Apo-Nec con diferente contenido lipídico al momento de armar el co-cultivo de la vacuna. Determinamos que sin importar el contenido lipídico inicial hay un aumento similar de lípidos citoplasmáticos en las CD, sin cambios en la captura antigénica, seguida a través de MART-1, y una formación de grandes agregados celulares en los co-cultivos de la vacuna, que luego muestran una baja estimulación alogeneica de linfocitos. Esta situación es revertida en las condiciones de maduración con el cóctel de citoquinas, donde además se observa una disrupción de los agregados celulares.



CAPÍTULO II

Capacidad migratoria *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec y distribución a los ganglios linfáticos *in vivo* en el modelo de ratón *nude*

1. Respuesta quimiotáctica *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec

Como primer paso para determinar las características migratorias de la vacuna CD/Apo-Nec, se evaluó su sensibilidad y capacidad de respuesta frente a señales inflamatorias y de *homing* a GL. En particular, se buscó caracterizar los cambios generados en estos parámetros por el uso de diferentes agentes de maduración agregados al co-cultivo CD/Apo-Nec durante la elaboración de la vacuna.

1.1. Capacidad de respuesta y motilidad de la vacuna frente a diferentes quimioquinas

La sensibilidad de la vacuna a las quimioquinas CCL3 y CCL19 fue caracterizada tanto por su respuesta quimiotáctica *in vitro* como por la expresión de sus receptores CCR5 y CCR7, respectivamente. La migración de las CDi en respuesta a la quimioquina CCL3 disminuyó significativamente ($p < 0,05$) luego del proceso de maduración con todos los estímulos utilizados, incluido el co-cultivo con las células Apo-Nec. De manera inversa, la baja migración hacia CCL19 que presentan las CDi aumenta con la maduración con LPS y CC y, en menor medida, luego del co-cultivo de la vacuna, aunque en todos los casos ese aumento fue significativo (Figura 42.A y B). La migración de la vacuna evaluada a través de transwells reprodujo los resultados obtenidos en la microcámara de quimiotaxis (datos no mostrados).

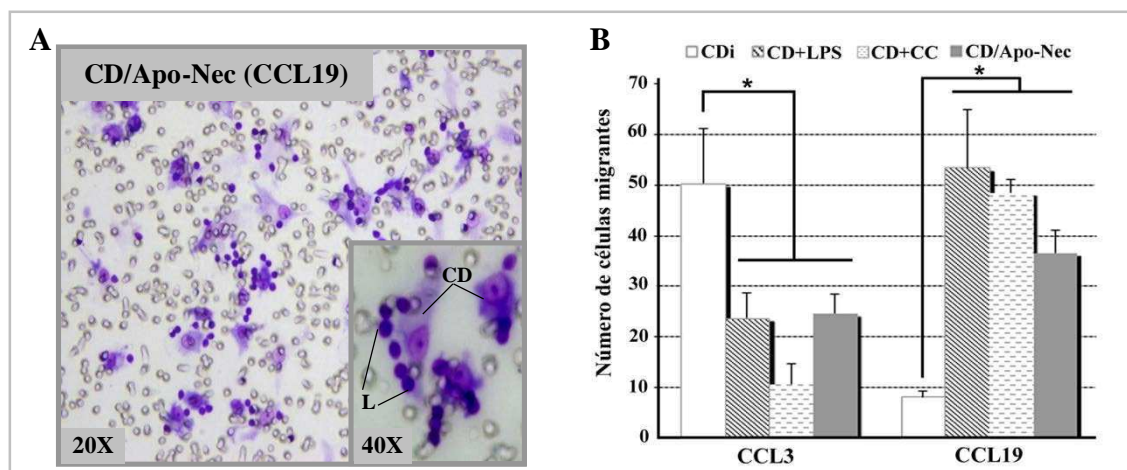


Figura 42. A. Imagen descriptiva de las membranas analizadas para evaluar la migración de las CD en la micro-cámara de quimiotaxis. CD=célula dendrítica, L=linfocitos B. Determinación del cambio en el patrón de respuesta migratoria de las CD luego de 48 h de maduración con diferentes estímulos. Las condiciones analizadas fueron evaluadas por triplicado y se contabilizó el número de células migrantes frente a las quimioquinas CCL3 y CCL19; ($n=3$).

La expresión del receptor CCR5 presente en las CDi se redujo un 75 % luego del co-cultivo con las células Apo-Nec. Esta disminución llegó a un mínimo de 90 % si se utilizaba el CC durante el co-cultivo. En el caso del receptor CCR7, el uso del CC durante la preparación de la vacuna fue necesario para detectar un aumento significativo en su expresión ($p < 0,01$) (Figura 43.A y .B).

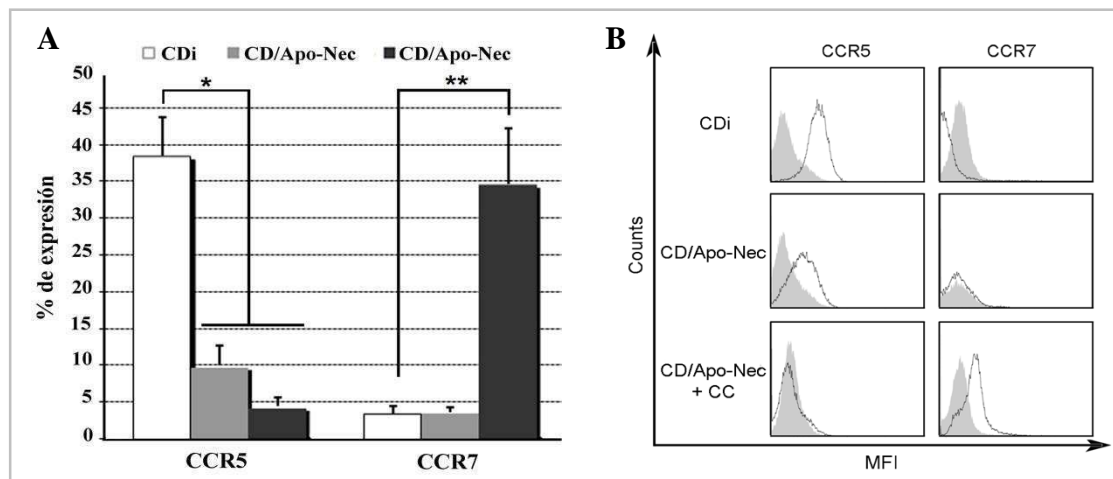


Figura 43. A. Balance de la expresión de los quimiorreceptores CCR5 ($n=8$) y CCR7 ($n=9$) en las CDi y su modulación luego del co-cultivo con células Apo-Nec. La expresión se determinó por citometría de flujo. B. Histogramas representativos que muestran la expresión de los quimiorreceptores CCR5 y CCR7 en las condiciones analizadas. El sombreado gris corresponde al control de isotipo. La serie de cada marcador fue obtenida de un mismo donante sano.

1.2. Modulación de la maduración y la quimiotaxis de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con diferentes componentes del CC

Se estudió el efecto del agregado de algunas citoquinas que componen el CC por separado en el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec, en particular de IL-6 y PGE2 que pueden cumplir diferentes roles según el contexto inmune. Se determinó su contribución parcial a la maduración y a la expresión de los receptores de quimioquinas de las CD de la vacuna, dado que impactan en la respuesta migratoria de la misma. El agregado de PGE2 por separado logró aumentar la expresión de algunos marcadores de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec, mientras que con el uso de IL-6 en algunos casos la maduración fue menor. Sin embargo, sólo en el caso del uso del CC completo se observó un aumento combinado de los marcadores CD86, CD83 y HLA-II (Figura 44).

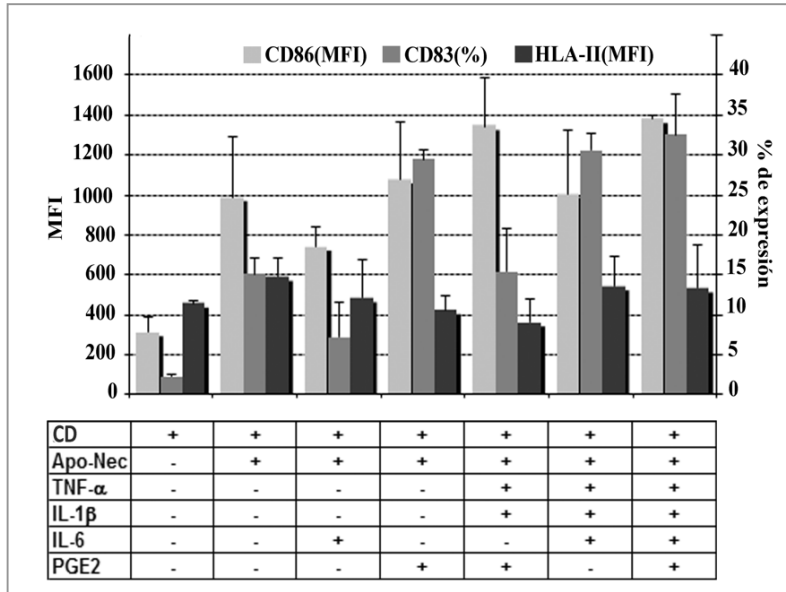


Figura 44. Se analizó la contribución parcial de algunos componentes del CC al proceso de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec. Se determinaron los niveles de expresión de los marcadores CD86, CD83 y HLA-II ($n=2$). Según el marcador se analizó el porcentaje de expresión (%) o su intensidad media de fluorescencia (MFI).

En todos los casos la expresión del receptor CCR5 en la vacuna fue menor que en las CDi. En cambio, la expresión del receptor CCR7, que con el uso conjunto de todos los componentes del CC alcanzó su máximo, presentó niveles disminuidos en presencia de IL-6 en otras combinaciones (Figura 45.A). Los cambios observados en la expresión de los quimiorreceptores generados por el uso del CC completo se reflejaron en la respuesta quimiotáctica de la vacuna. La respuesta migratoria frente a CCL19 presentó un aumento significativo del 40 % cuando la vacuna fue preparada en presencia del CC (Figura 45.B).

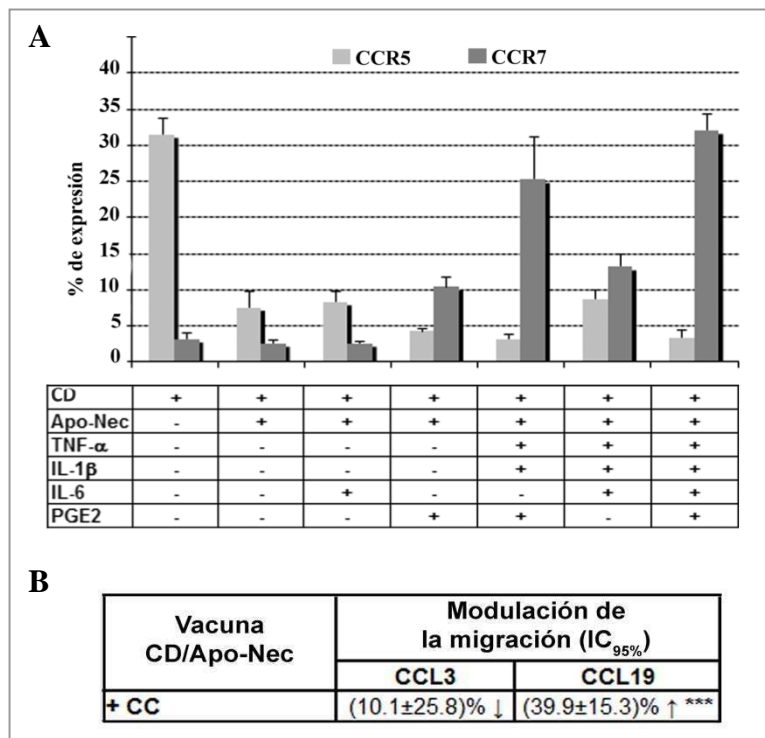


Figura 45. A. Análisis de la contribución parcial de algunos componentes del CC al balance en la expresión de los receptores CCR5 y CCR7 de la vacuna CD/Apo-Nec ($n=2$). **B.** Cambio en la migración de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con el CC completo, en microcámara de quimiotaxis. ($n=3$). Los resultados se expresan con los intervalos de confianza de la magnitud del efecto del tratamiento, expresada en porcentaje.

1.3. Utilización *in vitro* de adyuvantes durante la preparación del co-cultivo de la vacuna y su impacto sobre su maduración y quimiotaxis

Se analizó la modulación de los parámetros de maduración y quimiotaxis de la vacuna CD/Apo-Nec con el agregado del ligando de TLR4 BCG, el análogo de TLR7 Imiquimod y la citoquina GM-CSF, utilizados como adyuvantes, solos o en combinación con el CC. En cuanto a la expresión de marcadores de maduración, no se pudo observar efectos individuales adicionales en la maduración, más allá del aumento en la maduración inducido por el CC. No se detectó interacción en el efecto de ninguno de los adyuvantes con el uso del CC. Con los adyuvantes no se observó un efecto homogéneo, generando mayor dispersión de los resultados, dependiendo de la muestra del donante utilizado (Tabla 5). En cuanto a la respuesta quimiotáctica, se obtuvieron resultados similares a los de la maduración de la vacuna CD/Apo-Nec. No hubo interacción entre el efecto de los adyuvantes con el generado por el CC y, más allá de algunas tendencias observadas, no hubo ningún efecto significativo sobre la migración hacia CCL3 o CCL19 (Tabla 6).

Vacuna CD/Apo-Nec	Modulación del % de expresión (IC _{95%})			Modulación de la MFI (IC _{95%})	
	CD80	CD86	CD83	HLA-I	HLA-II
+ BCG	(5,4 ± 57,9) %	(-3,9 ± 25,3) %	(-12,7 ± 59,2) %	(-10,0 ± 42,6) %	(-18,8 ± 32,6) %
+ Imiquimod	(4,2 ± 76,0) %	(-2,3 ± 23,5) %	(-26,7 ± 74,0) %	(-30,0 ± 29,7) %	(-47,8 ± 19,6) %
+ GM-CSF	(13,0 ± 78,6) %	(-11,2 ± 32,9) %	(-18,8 ± 82,5) %	(-21,9 ± 31,3) %	(-47,4 ± 26,2) %

Tabla 5. Análisis de la modulación en la expresión de diferentes marcadores de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec, utilizando diferentes adyuvantes durante su preparación (n=3). Los resultados se expresan con los intervalos de confianza de la magnitud del efecto del tratamiento, expresada en porcentaje.

Vacuna CD/Apo-Nec	Modulación de la migración (IC _{95%})	
	CCL3	CCL19
+ BCG	(5.9±25.0)% ↑	(12.6±31.1)% ↑
+ Imiquimod	(4.4±42.8)% ↑	(4.5±7.3)% ↓
+ GM-CSF	(20.5±22.1)% ↓	(3.8±39.3)% ↑

Tabla 6. Análisis de la respuesta quimiotáctica de la vacuna CD/Apo-Nec, utilizando diferentes adyuvantes durante su preparación (n=3). Los resultados se expresan con los intervalos de confianza de la magnitud del efecto del tratamiento, expresada en porcentaje.

2. Rol de la metaloproteasa 9 en la motilidad invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec

Luego de caracterizar el perfil de respuesta migratoria *in vitro* frente a distintas quimioquinas, evaluamos los niveles de metaloproteinasas secretadas por la vacuna al medio de cultivo, que representa otra característica importante involucrada en la motilidad de las células inmunes. Además de cuantificar su liberación, se evaluó la actividad funcional de la MMP-9 en la vacuna CD/Apo-Nec, en relación a la capacidad de migración invasiva a través de Matrigel en respuesta a diferentes quemoquinas.

2.1. Secreción de metaloproteasas y su modulación con la maduración de la vacuna

El análisis de los medios condicionados de la vacuna CD/Apo-Nec reveló actividad para las gelatinasas MMP-2 y MMP-9. Pudimos determinar que la MMP-2 era producida por las células Apo-Nec mientras que la MMP-9 era secretada por las CD de la vacuna (Figura 46.A). Al cuantificar la actividad de la MMP-9 en los zimogramas, pudimos determinar que las CDi secretan un nivel basal de la enzima y que estos niveles aumentaban con la maduración. Luego de 48 h, el co-cultivo de las CD con las células Apo-Nec logró generar niveles de actividad de MMP-9 similares a los de activación de las CDi con LPS y el CC, todos éstos significativamente superiores a los obtenidos con las CDi ($p < 0,05$) (Figura 46.B).

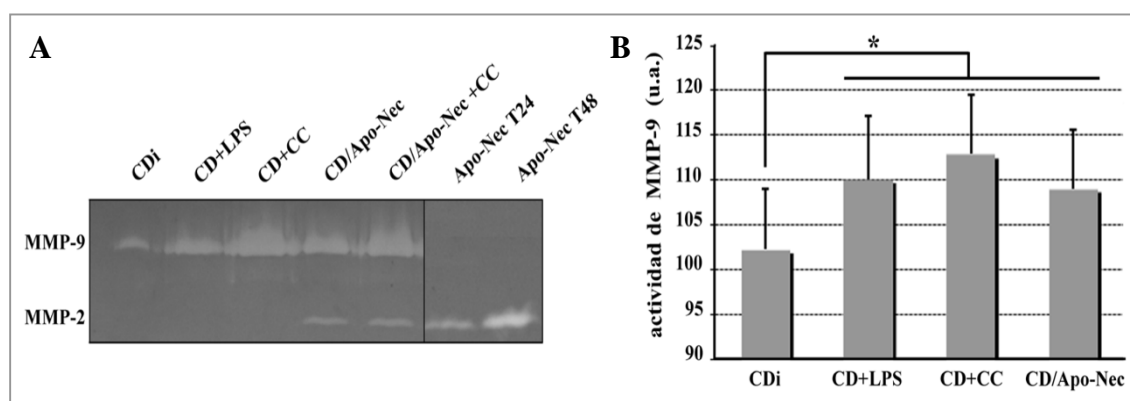


Figura 46. A. Zimograma representativo de la actividad gelatinasa presente en el medio condicionado de CD, co-cultivos de vacuna y células Apo-Nec a diferentes tiempos post-irradiación (T 24 h y T 48 h). B. Actividad de la gelatinasa MMP-9 liberada por las CD luego del proceso de maduración, con LPS, CC o células Apo-Nec ($n=4$). La actividad gelatinasa fue determinada en los medios condicionados y representada en unidades arbitrarias (u.a.), según se describe en ‘Materiales y métodos’.

El agregado del CC al co-cultivo de CD/Apo-Nec generó un incremento de la secreción de MMP-9, que resultó en promedio 1,4 veces superior ($p < 0,001$) al producido por la vacuna CD/Apo-Nec. Este incremento se mantuvo en combinación con los otros adyuvantes ensayados *in vitro* (BCG, Imiquimod y GM-CSF) (Figura 47.A y .B). No se detectaron diferencias significativas en la actividad de la MMP-9 en el medio condicionado de la vacuna con el uso de los adyuvantes BCG, Imiquimod o GM-CSF ensayados *in vitro*. No hubo interacción entre el efecto de los adyuvantes y el CC en el co-cultivo (Figura 47.B).

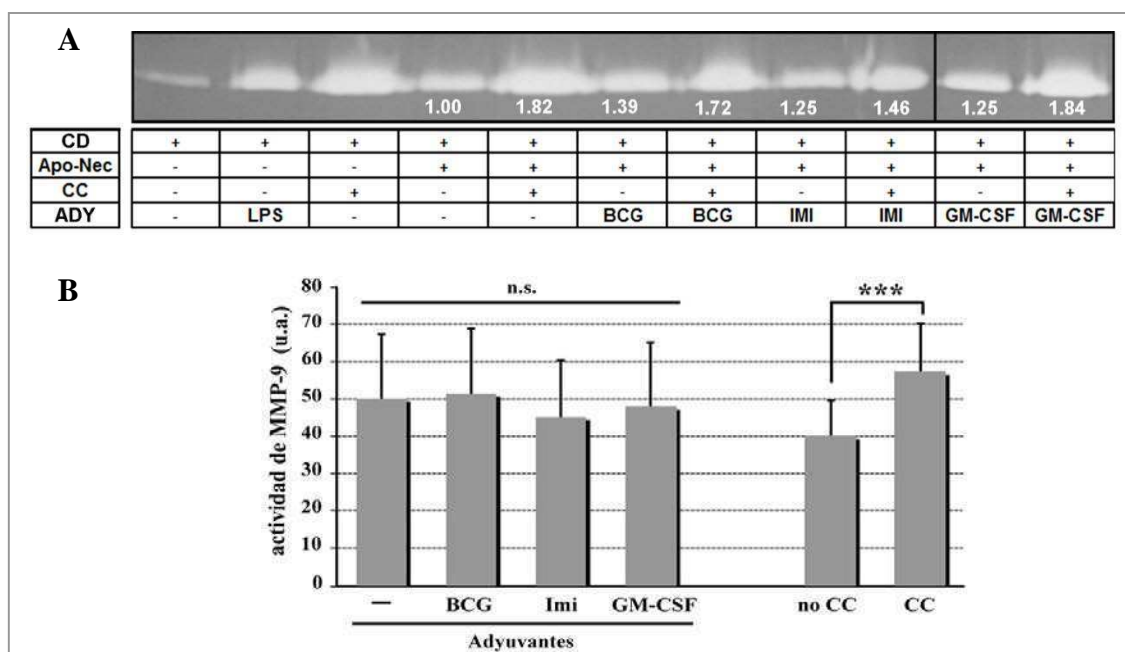


Figura 47. **A.** Zimograma representativo de la actividad de MMP-9 liberada por las CD luego de la maduración y en los co-cultivos de la vacuna CD/Apo-Nec combinada con el uso de CC y los adyuvantes BCG, Imiquimod (IMI) y GM-CSF. Los números blancos indican la actividad de MMP-9 relativa al co-cultivo CD/Apo-Nec. **B.** Comparación de la actividad de MMP-9 en los co-cultivos de la vacuna CD/Apo-Nec, tras el agregado del CC o adyuvantes. Como la interacción entre los 2 factores no fue significativa, se muestra el análisis de efectos principales ($n=4$). La actividad gelatinasa fue determinada en los medios condicionados y representada en unidades arbitrarias (u.a.). n.s.=no significativo.

2.2. Capacidad invasiva de la vacuna en respuesta a quimioquinas

Habiendo evaluado la capacidad de respuesta quimiotáctica de la vacuna, se quiso analizar su respuesta migratoria invasiva, otro parámetro de importancia para describir la motilidad de la vacuna CD/Apo-Nec frente a las quimioquinas de interés.

Se determinó la capacidad invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec a través de transwells recubiertos con matrigel frente a CCL3 y a CCL19, que resultó tener un mejor patrón migratorio cuando era preparada con el CC. La limitada respuesta de CD/Apo-Nec frente a CCL19 aumentó alrededor de un 100 % con el agregado del CC durante el co-cultivo ($p < 0,05$). En cambio, la migración hacia CCL3 se redujo un 75 % con el uso del CC ($p < 0,05$), valor que sólo llegaba al 50 % en el caso de CD/Apo-Nec (Figura 48).

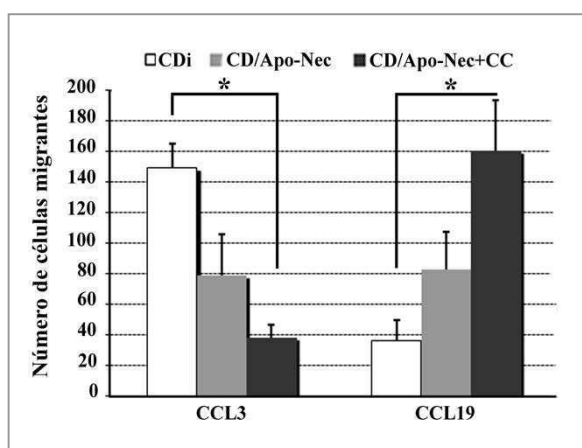


Figura 48. Migración invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, evaluada en transwells recubiertos con matrigel. Cuantificación por citometría de flujo, a tiempo fijo de 60 s, de las células que atravesaron la membrana luego de un ON (CCL3 $n=3$ y CCL19 $n=4$).

Al evaluar el efecto de algunos componentes individuales del CC sobre la capacidad invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, se observó que con el uso de PGE2 se alcanzan niveles de migración similares a los obtenidos con el agregado del CC completo (Figura 49.A). La PGE2 aumentaba moderadamente la expresión de CCR7 de la vacuna CD/Apo-Nec (Figura 45.A) pero con un mayor aumento de la secreción de MMP-9 (Figura 49.B).

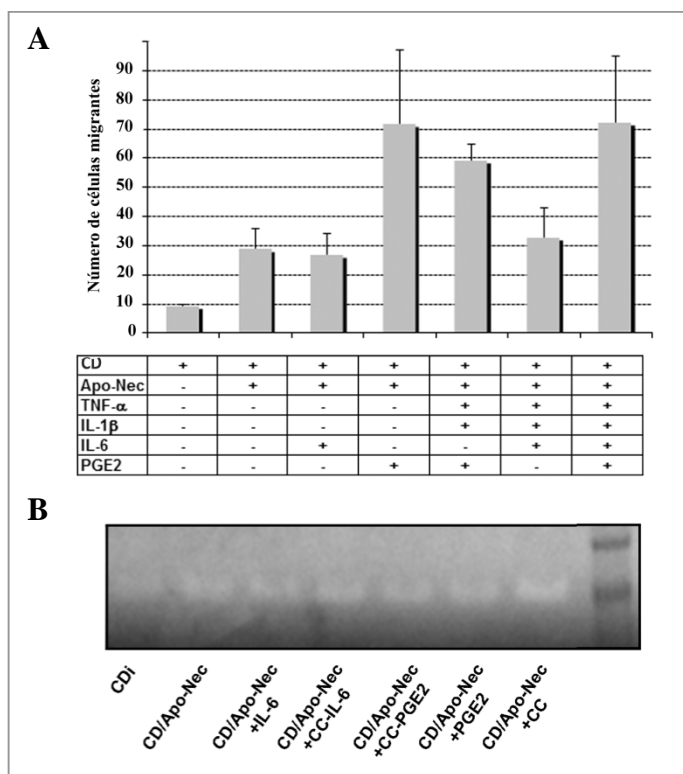


Figura 49. A. Migración invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, evaluada en transwells recubiertos con matrigel, utilizando diferentes combinaciones de citoquinas del CC ($n=2$). **B.** Zimograma para MMP-9 en los medios condicionados de los co-cultivos CD/Apo-Nec con diferentes combinaciones de las citoquinas del CC.

2.3. Modulación de la MMP-9 y su impacto sobre la migración invasiva *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec

Luego de analizar los cambios en los niveles de MMP-9 liberados durante el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec y su patrón migratorio con capacidad invasiva, se buscó determinar el efecto directo de la MMP-9 sobre la trans migración de CD/Apo-Nec. Para regular su actividad, se utilizó la droga Inhibitor I, específica para gelatinasas, y la rhuMMP-9 en la preparación de los co-cultivos y durante el ensayo de migración.

El agregado de la rhuMMP-9 activa aumentó significativamente la invasividad de la vacuna CD/Apo-Nec y su efecto fue dependiente de la concentración. Se obtuvieron niveles similares a los generados por el agregado de CC en la concentración de 200 ng/ml ($p<0,05$), y que aumentaban más en la concentración máxima ensayada ($p<0,01$) (Figura 50.A). De la misma manera, el agregado del Inhibitor I en los co-cultivos revirtió el efecto generado por el CC sobre la migración invasiva de la vacuna hacia CCL19 ($p<0,05$). En este caso, todas las concentraciones utilizadas lograron un efecto similar, llevando los valores de la migración a los obtenidos inicialmente con la vacuna CD/Apo-Nec (Figura 50.A). El Inhibitor I tuvo su efecto solamente sobre la actividad de la MMP-9, sin interferir con la secreción de la gelatinasa al medio condicionado de la vacuna (Figura 50.B).

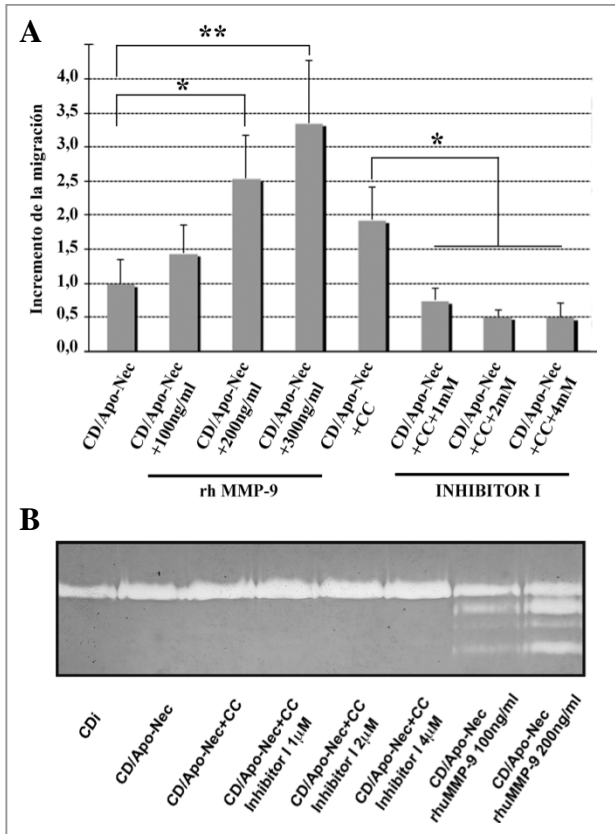


Figura 50. A. Migración invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, evaluada en transwells recubiertos con matrigel, utilizando la proteína activa rhuMMP-9 y el Inhibitor I específico de gelatinasas. Los valores están representados como el incremento relativo al valor de la migración de la vacuna CD/Apo-Nec ($n=4$). **B.** Zimograma para determinar la actividad de la MMP-9 en los medios condicionados de los co-cultivos tratados con el Inhibitor I y la rhuMMP-9 activa.

3. Distribución de la vacuna CD/Apo-Nec a los ganglios linfáticos en ratones *nude*

A continuación del análisis de las características quimotácticas y de la migración *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec, se estudió el patrón migratorio *in vivo* de la vacuna humana. Para esto se eligió un modelo mixto humano-murino para analizar este proceso debido a la alta conservación del receptor CCR7 entre especies humano-ratón, con 87 % de homología (BLAST, National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y la reactividad cruzada del receptor con sus ligandos murinos CCL19 y CCL21, expresados en los tejidos del sistema linfático (Campbell et al., 1998). El modelo murino permitió analizar el tránsito de la vacuna desde el sitio de inoculación subcutáneo hasta los GL, cuantificar qué proporción lo hacía y su distribución entre los diferentes GL drenantes.

3.1. Evaluación de la arquitectura y mapeo de los ganglios linfáticos de ratones inmunodeficientes

En primer lugar, se identificó y analizó la estructura de los GL de diferentes modelos murinos para determinar el más apropiado para evaluar la migración de la vacuna humana CD/Apo-Nec a corto plazo. Para evitar reacciones de rechazo a las células humanas en el ratón en el corto plazo, los sistemas murinos analizados fueron las cepas inmunodeficientes *nude* y NOD-SCID. Se comparó la estructura de los GL de ratones de ambas cepas (Figura 51). Los GL del ratón *nude*, aunque sin linfocitos T en el paracórtex, conservan una estructura compartimentalizada, con folículos de células B, células mieloides e irrigación sanguínea y linfática. Los ratones NOD-SCID presentan GL más pequeños, con ausencia de linfocitos y regiones diferenciadas.

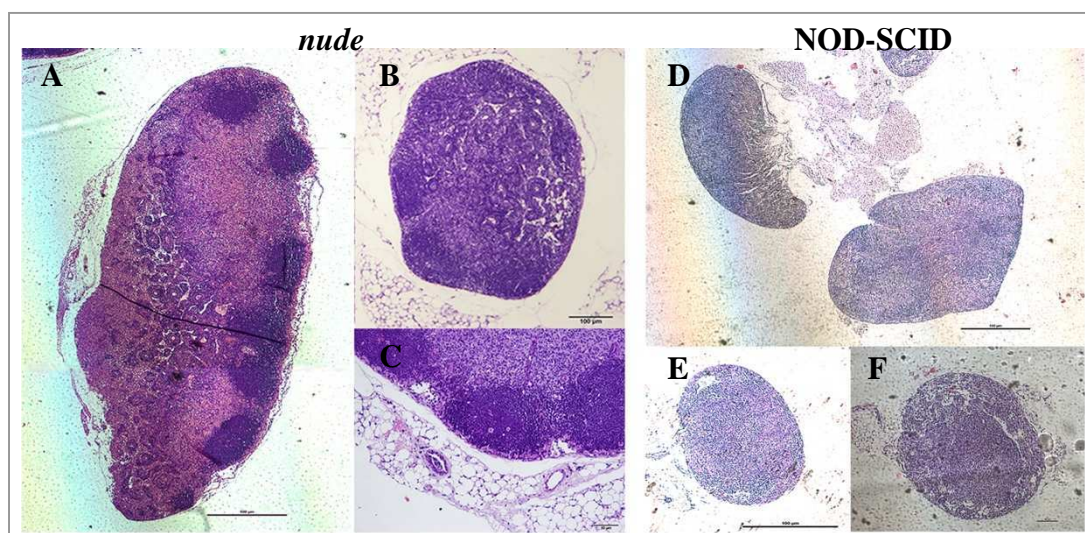


Figura 51. Coloración con hematoxilina/eosina de cortes histológicos de GL murinos embebidos en parafina. De ratón *nude*: **A.** Ganglio axilar, **B.** Ganglio poplíteo y **C.** Detalle del ganglio poplíteo. De ratón NOD-SCID: **D.** Ganglios axilares, **E.** Ganglio poplíteo y **F.** Ganglio ciático.

Luego, se realizó un mapeo del drenaje por vía linfática hasta los GL mediante la inyección subcutánea del colorante Azul de Evans, principalmente desde las almohadillas plantares. La mejor distribución del colorante fue obtenida luego de la administración por la almohadilla plantar trasera. En los ratones *nude*, se observó la coloración de los ganglios poplíteo y ciático, los primeros en la línea de drenaje desde el sitio de inyección (Figura 52.A). Esta distribución fue ipsilateral, sin observar tinción de los mismos GL contralaterales (Figura

52.B). El ganglio subilíaco, también denominado inguinal, no mostró una marcación intensa en el ratón *nude* (Figura 52.C), que sí se logra detectar en la cepa inmunocompetente BALB/c (Figura 52.F). Siguiendo la línea de diseminación linfática del colorante desde la almohadilla plantar trasera, se localizó el ganglio lumbar (Figura 52.D). Por esta vía no se detectaron GL a mayores distancias desde el punto de origen. Los ganglios axilares, principalmente el axilar accesorio, también denominado braquial, fueron detectados por vías de administración subcutáneas más cercanas al miembro anterior (Figura 52.E). En los ratones NOD-SCID, la distribución del colorante desde la almohadilla plantar trasera fue similar, presentando GL de menor tamaño y en algunos de ellos la coloración fue muy tenue (datos no mostrados).

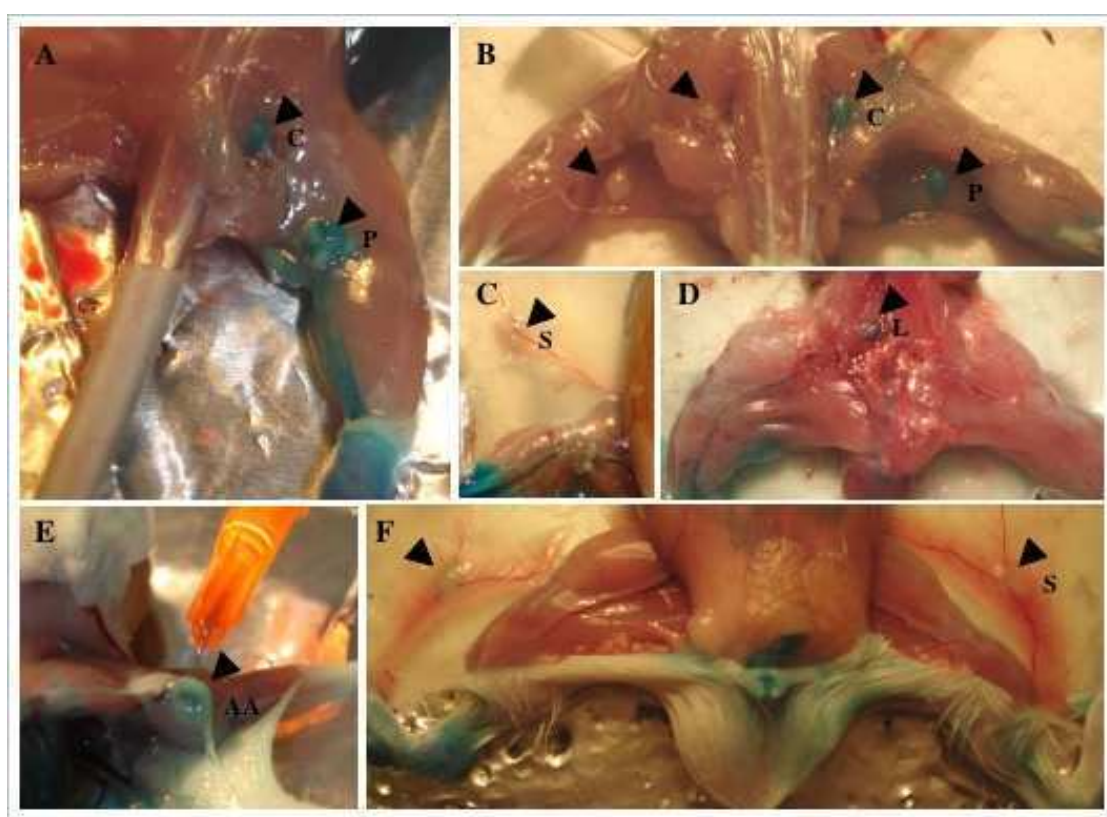


Figura 52. Mapeo de GL con el colorante Azul de Evans (Harrell 2008). **A-D.** Coloración de GL en ratones *nude* luego de la inoculación por vía subcutánea en la almohadilla plantar trasera. **E.** Ganglio axilar marcado luego de la inyección subcutánea del colorante en el flanco de un ratón *nude*. **F.** Marcación ipsilateral del ganglio subilíaco en un ratón BALB/c, luego de la inoculación en la almohadilla plantar trasera. Con los triángulos negros se señalan los GL de interés. C=ciático, P=poplíteo, S=subilíaco (inguinal), L=lumbar, AA=axilar accesorio (braquial).

3.2. Ensayo de migración de la vacuna CD/Apo-Nec por *in vivo imaging* en ratones *nude*

Una vez elegida la almohadilla plantar trasera como sitio de inoculación para estudiar la migración de la vacuna CD/Apo-Nec, se realizó el seguimiento de su distribución en los ratones por *in vivo imaging*, según se detalla en ‘Materiales y métodos’, registrando imágenes de los animales en posición dorsal a diferentes tiempos post-inyección (Figura 53.A). Se tomaron imágenes de la señal del colorante DiR presente en los sitios de inyección y de la zona lumbar de los ratones, a un tiempo corto luego de la inoculación (2 h) y a las 24 h y 48 h posteriores.

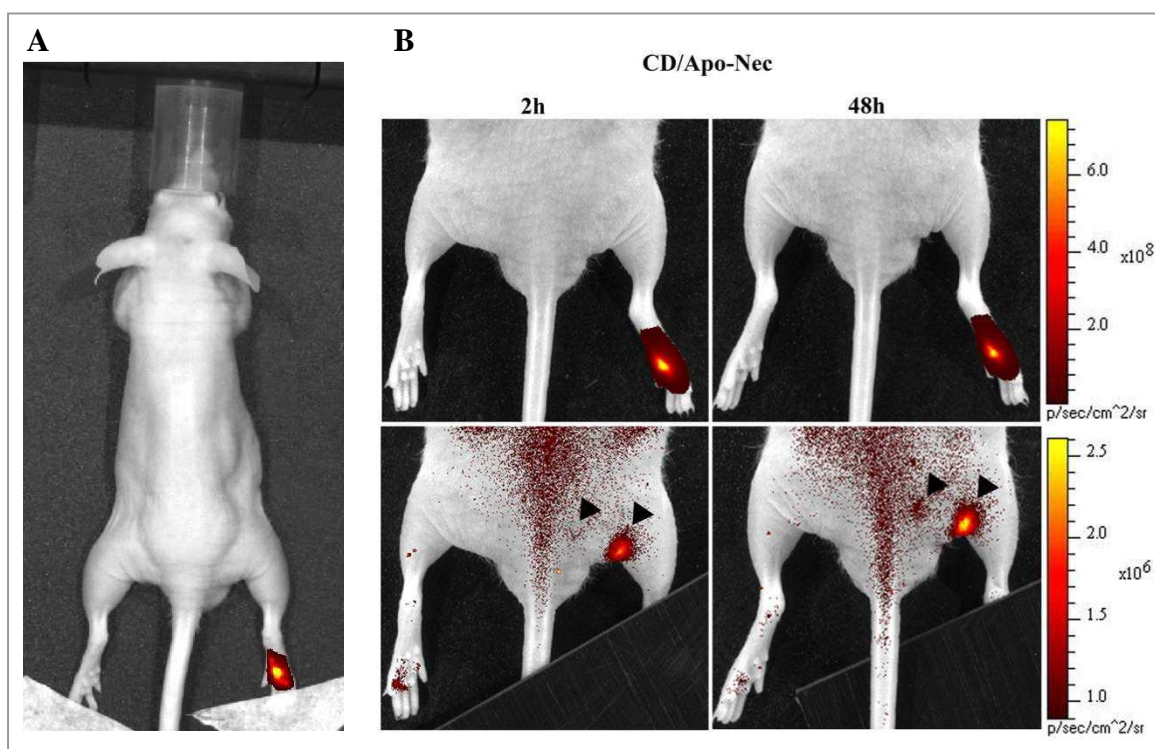


Figura 53. A. Imagen de un ratón *nude* en el bioluminómetro, anestesiado con isofluorano, inoculado con la vacuna CD/Apo-Nec DiR⁺. B. Imagen representativa de la migración *in vivo* de la vacuna, registrada en un ratón a las 2 h y a las 48 h post-inyección. El sitio de inyección (panel superior) una vez cubierto permite detectar los GL DiR⁺, señalados con los triángulos negros (panel inferior).

La vacuna se localizó rápidamente en los GL drenantes ipsilaterales cercanos, observado ya a las 2 horas posteriores a la inyección. A las 48 h se observa una mayor señal acumulada en los ganglios poplíteo y ciático, aunque la mayoría de la señal del colorante DiR permanece en el sitio de inyección (Figura 53.B).

Se observó que al inocular la fracción de los linfocitos de la vacuna por separado también aparecen células localizadas en los GL drenantes a lo largo del tiempo, aunque en menor proporción. De la misma manera, luego de la administración subcutánea de células Apo-Nec DiR⁺, se detectó señal en los GL del ratón (Figura 54). Por esto es que, para la cuantificación de la migración efectiva de las CD de la vacuna, se realizaron los co-cultivos de la vacuna utilizando CDi purificadas y marcadas previamente con el colorante DiR.

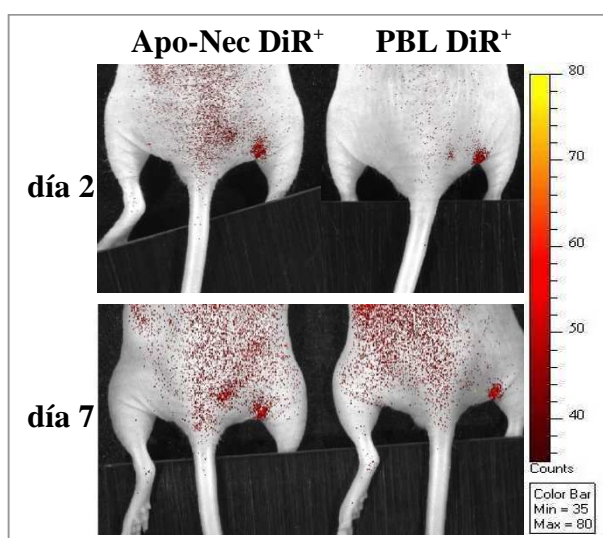


Figura 54. Análisis por *in vivo imaging* de la llegada de otros componentes de la vacuna CD/Apo-Nec a los GL murinos luego de la administración subcutánea. Ratones inoculados con células Apo-Nec o linfocitos humanos (PBL), marcados con el colorante DiR (DiR⁺) fueron monitoreados a lo largo del tiempo para analizar la aparición de señal positiva en los GL regionales.

Tras el estudio de las imágenes, se analizó la apariencia histológica del sitio de inyección de la vacuna CD/Apo-Nec. Para esto se recuperaron las patas traseras de los ratones luego de 48 h de la inoculación de la vacuna. Mediante una coloración con hematoxilina/eosina sobre cortes histológicos de esos tejidos, se localizaron las células de la vacuna presentes en la zona plantar, dispersas entre el tejido intersticial y el músculo (Figura 55.A-C). Las CD humanas conservaban su morfología y no se observaron zonas necróticas aparentes en el inóculo.

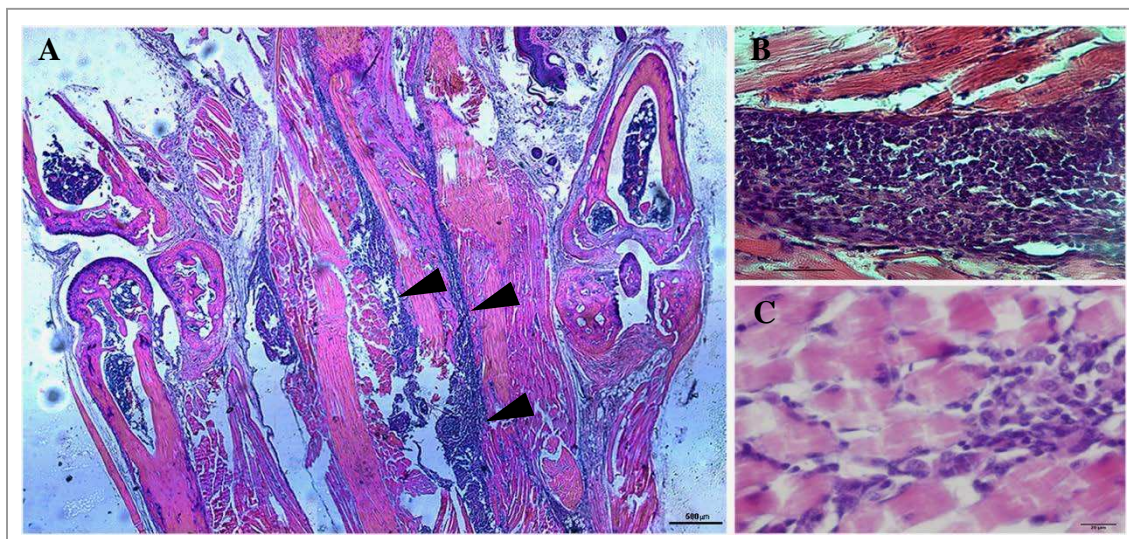


Figura 55. A. Vista general de la histología del sitio de inyección de la vacuna CD/Apo-Nec en la almohadilla plantar trasera. Los triángulos negros señalan la zona del inóculo. Magnificación original: 40X. B. Detalle de las células de la vacuna CD/Apo-Nec, localizadas entre el tejido de la pata del ratón. Magnificación original: 400X. C. Detalle de las células de la vacuna CD/Apo-Nec, dispersándose entre el tejido adyacente. Magnificación original: 1000X.

3.3. Cuantificación de la migración a corto plazo y distribución en los ganglios linfáticos de la vacuna CD/Apo-Nec

Para evaluar la migración a corto plazo, se tomó como tiempo de referencia las 48 h posteriores a la administración de la vacuna CD/Apo-Nec. Para la cuantificación detallada de la migración total y la distribución de la vacuna en el ratón, se realizó la disección bilateral de los GL analizados en el mapeo con Azul de Evans. Los GL extraídos fueron colocados ordenados en una placa, en forma de *array*, cuya imagen fue registrada en el bioluminómetro. El análisis *ex vivo* de los GL confirmó una distribución ipsilateral a la inyección, con una predominancia de los GL más cercanos, sin migración aparente al ganglio subilíaco (inguinal) (Figura 56.A). Durante las primeras 48 h, un total del $(1,3 \pm 0,4)$ % de la vacuna CD/Apo-Nec migró desde el sitio de inyección a los GL regionales, principalmente al ganglio poplíteo. La preparación de la vacuna en presencia del CC generó un incremento del 70 % ($p < 0,05$) en la proporción de células de la vacuna que se distribuyen entre los diferentes GL desde la almohadilla plantar trasera. Esta distribución también fue más amplia, ya que, a pesar de que la migración principal se da al ganglio poplíteo, se observó un incremento de la señal de mayor

proporción en los otros GL regionales, el ciático y el lumbar. Incluso en algunos ratones se llegó a detectar migración al ganglio axilar (Figura 56.B).

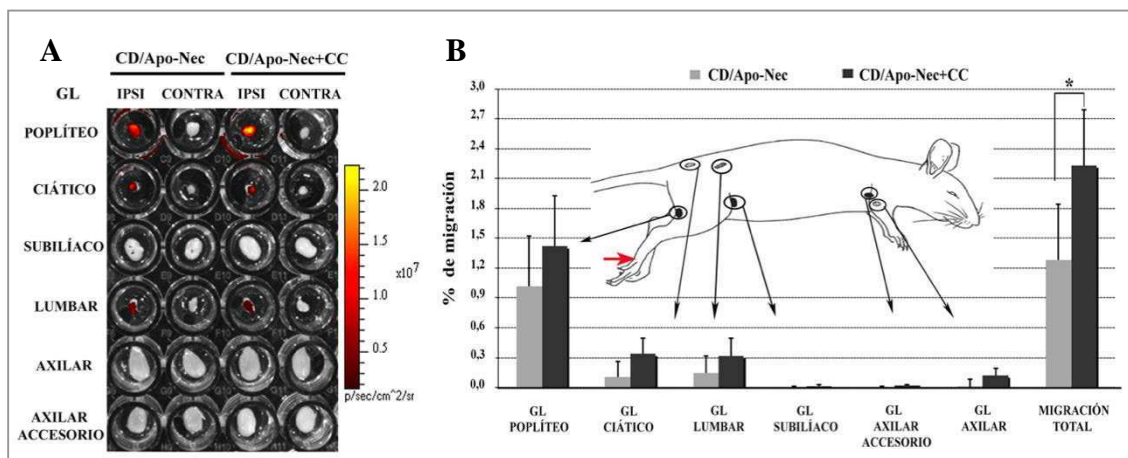


Figura 56. A. Array comparativo de los GL extraídos de 2 ratones *nude* a las 48 h de ser inoculados con vacunas DiR⁺. Las mediciones de fluorescencia fueron realizadas en el bioluminómetro. IPSI=ipsilateral, CONTRA=contralateral, respecto del sitio de inyección. **B.** Distribución de la migración de la vacuna entre los diferentes GL del ratón *nude*, 48 h post-inyección. También se muestra el porcentaje total de migración como la suma de la señal de todos los GL evaluados, con respecto al sitio de inyección (n=5).

3.4. Detección de las células de la vacuna en los GL del ratón

De algunos ensayos de migración *in vivo* en los ratones *nude*, se recuperaron los GL DiR⁺ y se los disgregó mecánicamente. Esas muestras se evaluaron por citometría de flujo para determinar la expresión de marcadores de CD humanos. Por un lado, se confirmó que en los GL contralaterales al sitio de inyección no había células DiR⁺. Por otro, las células DiR⁺ presentes en los GL ipsilaterales mostraron expresión de los Ag DC-SIGN y CD11c (Figura 57).

Además, se realizaron ensayos de migración *in vivo* con la vacuna marcada con el colorante fluorescente CM-DiI, para analizar imágenes de cortes histológicos de los GL extraídos. De esta manera se buscó identificar y ubicar las CD humanas dentro de la estructura los GL murinos. Luego de 48 h, fue posible detectar las células de la vacuna CD/Apo-Nec distribuidas entre diferentes GL regionales, mostrando integridad celular y ubicadas principalmente en la zona periférica cortical de la estructura y movilizándose hacia su interior (Figura 58).

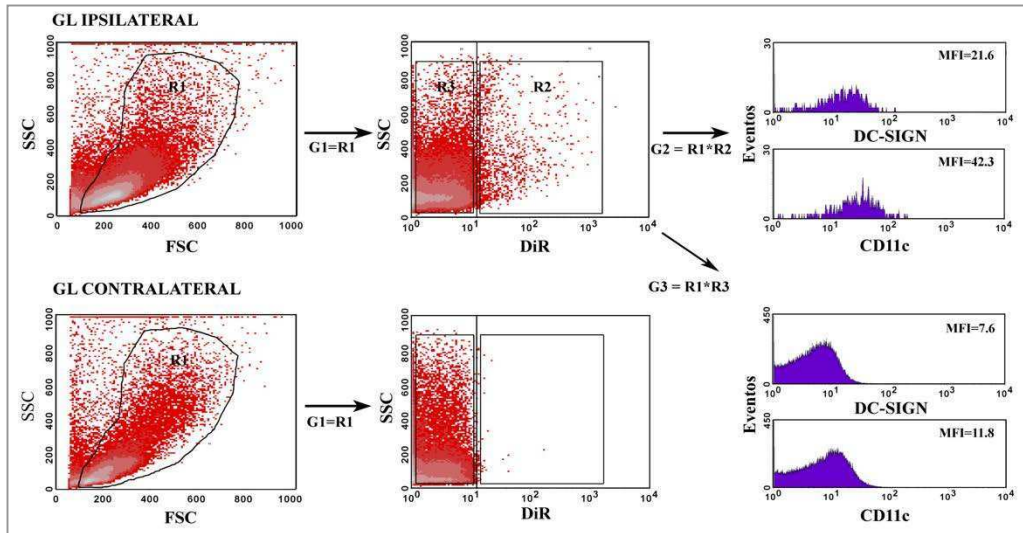


Figura 57. Detección de las CD humanas en los GL del ratón *nude*. Luego de 48 h de la migración *in vivo* de la vacuna CD/Apo-Nec DiR⁺, se aislaron los GL y se disgregaron mecánicamente. Se analizaron las poblaciones DiR⁺ y DiR⁻ para la expresión de los Ag humanos DC-SIGN-FITC y CD11c-PE. Se expresan las MFI de cada marcador.

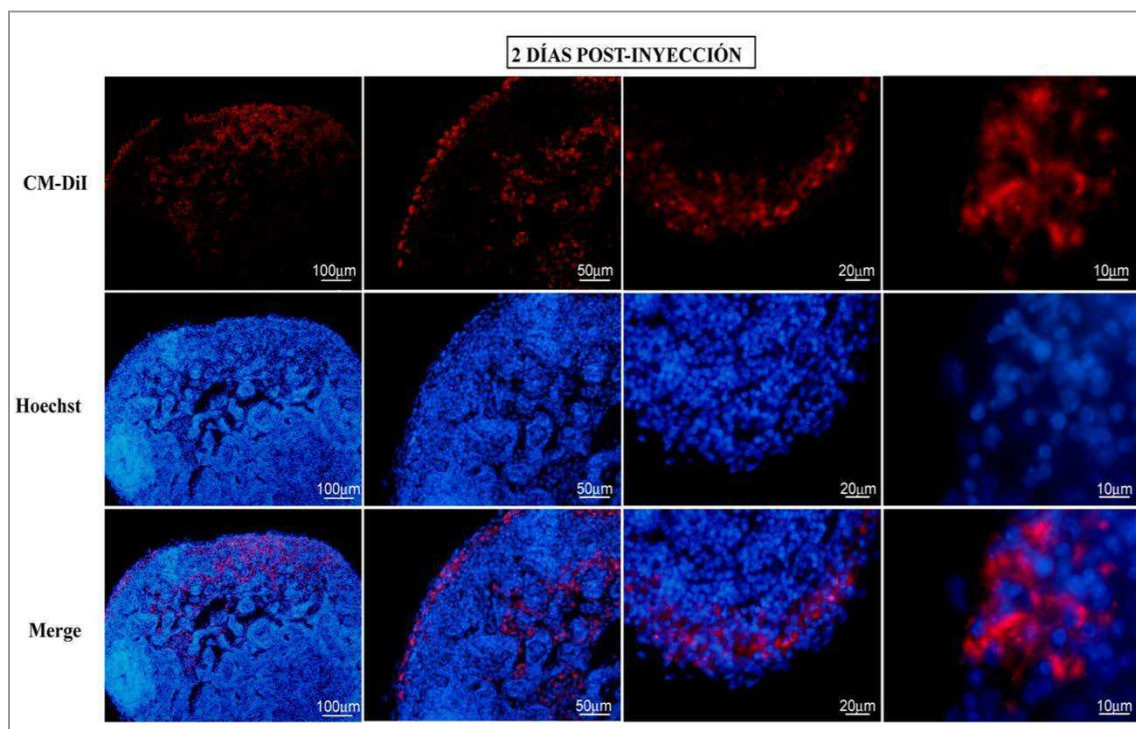


Figura 58. Luego de la inoculación de la vacuna CD/Apo-Nec CM-DiI⁺ en ratones *nude*, se recuperaron los GL drenantes a las 48 h y se realizaron cortes por congelación. El tejido fue contrastado con el colorante Hoechst. Magnificación original, de izquierda a derecha: 100X, 200X, 400X y 1000X.

4. Factores que modulan la llegada y distribución de la vacuna CD/Apo-Nec a los ganglios linfáticos del ratón

Por último, luego de haber cuantificado llegada de la vacuna CD/Apo-Nec a los GL de ratones *nude*, se analizaron otros parámetros para caracterizar mejor la respuesta migratoria de la vacuna *in vivo*. Se estudiaron principalmente mecanismos y componentes caracterizados *in vitro* sobre el desempeño migratorio de la vacuna *in vivo* para determinar factores y condiciones que pudieran mejorar el *homing* a los GL.

4.1. Rol de la MMP-9 en la migración *in vivo* de la vacuna CD/Apo-Nec

En los ensayos de migración *in vitro* se determinó que la MMP-9 cumplía un rol activo sobre la capacidad invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, y que su actividad podía ser modulada con la droga Inhibitor I (Figura 50.A). El aumento de la migración *in vivo* de la vacuna, obtenido por su maduración con el CC ($p < 0,01$), también pudo ser regulado con el Inhibitor I. La administración diaria de la droga en la almohadilla plantar del ratón durante el ensayo de migración *in vivo* disminuyó parcialmente la llegada de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con CC a los GL drenantes ($p < 0,05$) (Figura 59). Aún en esa condición, el valor de migración fue mayor al alcanzado con la vacuna CD/Apo-Nec inicialmente ($p < 0,05$).

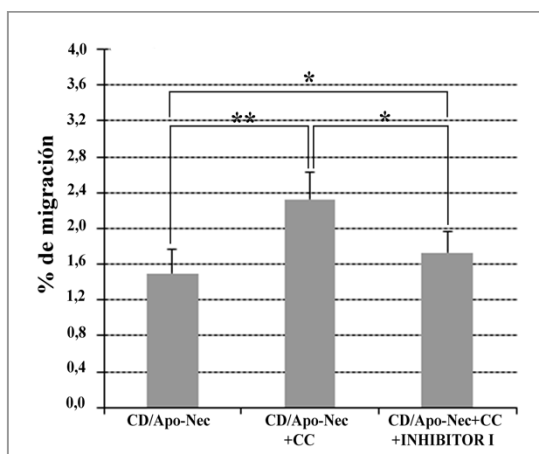


Figura 59. Ensayo de migración *in vivo* utilizando el *Inhibitor I*, específico para MMP-9. La droga fue inoculada diariamente en el sitio de inyección de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con CC. La migración a los GL fue evaluada a las 48 h. ($n=3$)

4.2. Impacto de la administración de adyuvantes *in vivo* sobre la migración de la vacuna

El uso tópico de la crema con Imiquimod en el sitio de inyección tuvo un efecto aditivo sobre la migración de la vacuna CD/Apo-Nec, El tratamiento del sitio de inyección con la crema con Imiquimod no fue suficiente para generar un aumento migratorio de la vacuna a las

48 h. Sin embargo, generó un incremento del 20 % sobre la migración de la vacuna preparada con CC, donde el efecto del Imiquimod fue significativo ($p < 0,05$). La migración basal de CD/Apo-Nec aumentó cuando ésta fue preparada con CC ($p < 0,05$) e incrementó aún más en la combinación con el uso de la crema con Imiquimod ($p < 0,01$) (Figura 60.A). La co-administración local de BCG, junto a la vacuna madurada con CC, no afectó significativamente su *homing* a los GL drenantes, aunque se observó una leve tendencia al aumento de la migración con BCG (Figura 60.B).

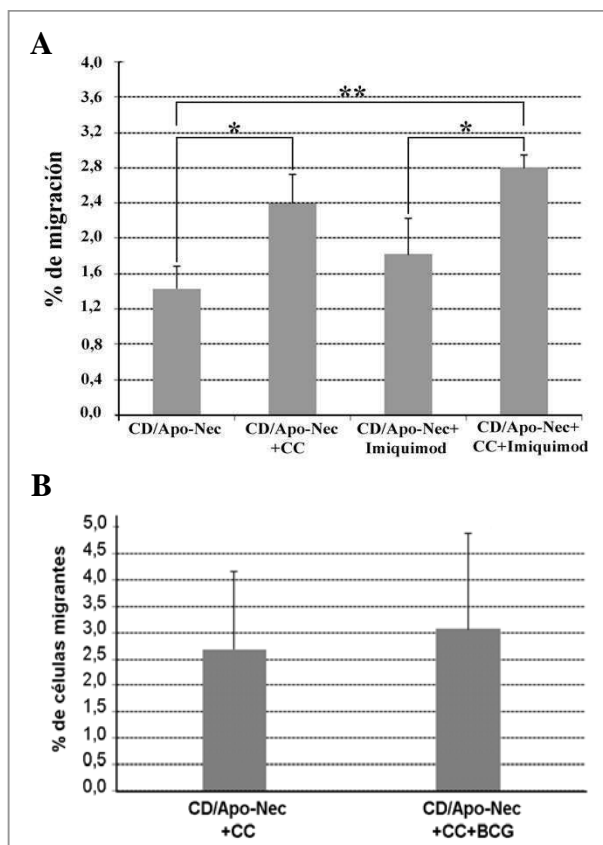


Figura 60. A. Ensayo de migración *in vivo* de la vacuna CD/Apo-Nec en combinación con el adyuvante Imiquimod. La crema con Imiquimod fue aplicada diariamente de manera tópica, sobre el sitio de inyección. La migración a los GL del ratón se determinó a las 48 h. ($n=3$). **B.** Ensayo de migración *in vivo* de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con CC en combinación con el adyuvante BCG. Se co-inyectaron 333 UFC junto con la vacuna. La migración a los GL del ratón se determinó a las 48 h. ($n=2$).

4.3. Seguimiento de la migración y distribución de la vacuna en el tiempo

Finalmente se analizó la migración de la vacuna a los GL, incrementando el tiempo de observación, para hacer un seguimiento más detallado de la distribución de CD/Apo-Nec preparada con CC y del efecto del uso de Imiquimod. El monitoreo de la migración se extendió por un período de 9 días luego de la inoculación. Por *in vivo imaging*, se determinó que la proporción de células de la vacuna que se distribuyeron a los GL locales (poplíteo y ciático) desde el sitio de inyección siguió aumentando hasta el día 5 luego de la inoculación, y luego se mantuvo relativamente constante. Durante las primeras 48 h no pareció haber diferencia de *homing* a los GL locales por la combinación con la aplicación tópica de Imiquimod. A partir

de ese momento, la proporción de células detectadas en los GL cercanos comenzó a variar, siendo menor en el tratamiento combinado (Figura 61.A).

Analizando la totalidad de los GL extraídos a dos tiempos fijos, se observaron diferencias importantes en el porcentaje total de migración y su distribución entre los GL del ratón. Hasta el día 2, período durante el cual se realizó una aplicación diaria de la crema con Imiquimod, se observó mayor porcentaje total de migración en el tratamiento combinado y además se obtuvo una distribución diferencial entre los GL (Figura 61.B). Con el uso de Imiquimod se observó una mayor proporción de células de la vacuna en otros GL más lejanos (lumbar, axilares), mientras que con la inoculación de la vacuna solamente las células se acumularon principalmente en los GL locales (poplíteo y ciático). Cuando se discontinuó el tratamiento con Imiquimod, la distribución entre los GL analizados se volvió similar entre ambas condiciones, en este caso evaluado el día 9 posterior a la inoculación de la vacuna (Figura 61.B).

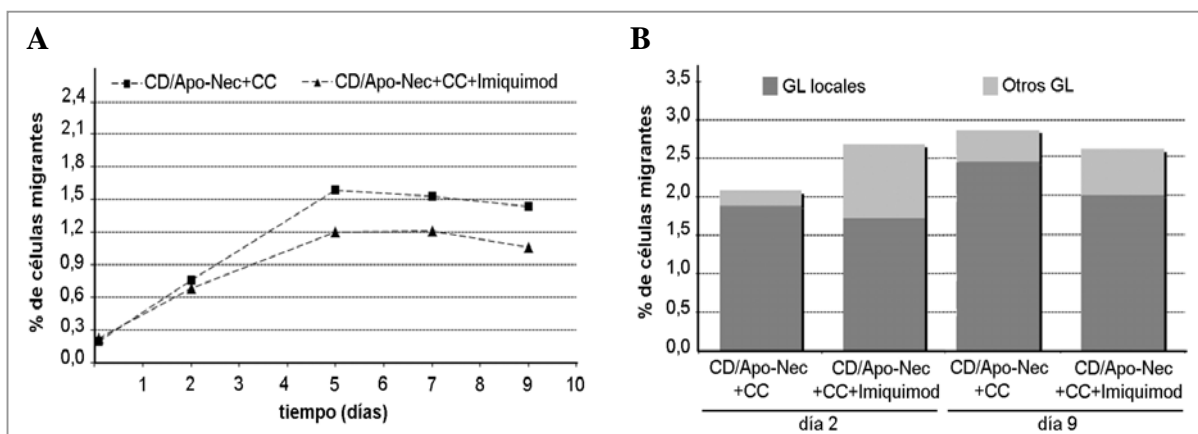


Figura 61. A. Seguimiento descriptivo en el tiempo de la migración de la vacuna madurada con CC a los GL locales (poplíteo y ciático), a través de *in vivo imaging*. Cada serie corresponde a los porcentajes de migración de un ratón a lo largo de tiempo, con las vacunas generadas a partir de un mismo donante sano. La aplicación tópica de la crema con Imiquimod fue realizada diariamente durante las primeras 48 h, momento en el cual se interrumpió el tratamiento. B. Distribución del porcentaje de migración entre los GL locales (poplíteo y ciático) y otros más distantes (lumbar y axilares) en el ratón, a distintos tiempos. Se comparó la migración de la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC en combinación con el tratamiento con Imiquimod durante las primeras 48 h.

A los 9 días luego de su administración, la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC se localiza claramente en el sitio de inyección en la almohadilla plantar del ratón, mostrando a las

CD dispersas y presentando una morfología normal. Las células de la vacuna CM-DiI⁺ todavía pudieron ser detectadas dentro de la estructura de los GL del ratón, en la misma proporción (Figura 62).

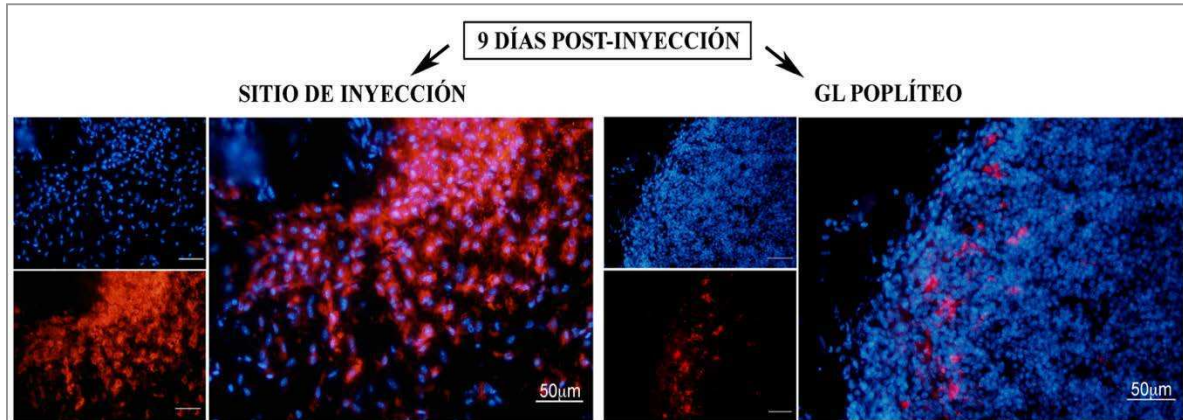


Figura 62. Identificación de las células de la vacuna CM-DiI⁺ en el sitio de inyección subcutáneo y en el ganglio poplíteo luego de 9 días de ser inoculadas. Magnificación original: 200X.

Resumen

Capítulo II: Capacidad migratoria *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec y distribución a los ganglios linfáticos *in vivo* en el modelo de ratón *nude*

- Se estudió la respuesta quimiotáctica *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec. El co-cultivo de las CD con las células Apo-Nec produce un cambio en su patrón migratorio, con una significativa migración frente a quimioquinas de *homing* a los GL. Esta respuesta aumenta cuando la vacuna es preparada con todos los componentes del CC, junto con su receptor CCR7.
- Se analizó la migración invasiva *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec. Ésta presenta un aumento en la secreción de la MMP-9 con el estado de maduración, inducido por el uso del CC, junto con su capacidad migratoria invasiva en respuesta a CCL19. La modulación de la actividad de la MMP-9 regula directamente la migración invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec, siendo la PGE2 del CC el componente principal que aumenta su invasividad.
- Se puso a punto el modelo en ratón *nude* para analizar la migración de la vacuna por *in vivo imaging*. Se realizó el mapeo de los GL drenantes desde la almohadilla plantar del ratón y el análisis histológico tanto del sitio de inyección como de los GL. La vacuna CD/Apo-Nec se distribuye rápidamente a los GL más cercanos, aunque la mayor proporción permanece en el sitio de inyección.
- Se determinó el porcentaje total de la migración de la vacuna CD/Apo-Nec a las 48 h y la distribución entre GL del ratón. La preparación de la vacuna con CC aumenta significativamente su *homing* a los GL, detectándose distribuida entre los ganglios regionales e incluso en GL distantes. Las CD humanas expresan Ag de diferenciación y se localizan dentro de la estructura de los GL murinos, en la zona periférica.
- Se analizaron factores que pudieran estar involucrados en la migración y distribución de la vacuna *in vivo*. La MMP-9 contribuye parcialmente al aumento de la llegada de la vacuna madurada con CC a los GL. El uso de Imiquimod en crema de manera tópica aumenta la migración total de la vacuna, efecto que resulta ser aditivo sobre el incremento producido por la maduración con CC. Además, se detectaron cambios en la distribución entre GL regionales en el tiempo utilizando la crema tópica.



CAPÍTULO III

**Interacción de la vacuna CD/Apo-Nec
con células T e inducción de una
respuesta anti-tumoral *in vitro***

1. Perfil inmunoestimulador de la vacuna CD/Apo-Nec

Se estudiaron características en la vacuna CD/Apo-Nec que resultan determinantes al momento de la interacción de las CD con las células T efectoras. Estas comprenden, entre otras, las moléculas de co-estimulación ('segunda señal') y factores solubles ('tercera señal') presentes o producidos por las CPA, que modulan fuertemente la respuesta inducida sobre los linfocitos T y, por ende, la respuesta anti-tumoral que pueda generar la vacuna CD/Apo-Nec.

1.1. Expresión de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica

Como ya se demostró anteriormente, el uso del CC durante la preparación de la vacuna CD/Apo-Nec indujo una fuerte maduración, aumentando la expresión de diferentes marcadores de membrana (Figura 35 y Tabla 4). En particular, se produjo un aumento en la expresión de las moléculas presentadoras de Ag peptídicos HLA-I y HLA-II, y de los ligandos de CD28, CD80 y CD86, ambas moléculas co-estimuladoras canónicas.

De la misma manera, se analizó además la expresión de las moléculas CD40 y PD-L1, como balance del perfil inmunomodulador de la vacuna CD/Apo-Nec. En este caso, observamos que las CDi expresan niveles muy bajos de ambas moléculas, mientras que luego del co-cultivo con las células Apo-Nec un 20 % de las CD expresaban CD40. El agregado de CC durante la preparación de la vacuna CD/Apo-Nec generó un incremento significativo del 75 % sobre la expresión de CD40 ($p < 0,05$). Todas estas condiciones estuvieron asociadas a niveles constantes de PD-L1, en un porcentaje menor al 10 % (Figura 63.A). También se observó la inducción de la expresión de ICOS-L cuando se maduró la vacuna con CC, alcanzando un 20 % (datos no mostrados).

Las células Mel-XY3 viables expresaban PD-L1 en su superficie en baja proporción (15 %), pero luego de la irradiación gamma a 70 Gy la expresión aumenta a un 50 %, correspondiente a la expresión de superficie e intracelular debido a la permeabilidad celular generada por el tratamiento (Figura 63.B). Sin embargo, a las 48 h de co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec, las células Apo-Nec constituyen sólo entre el 10 y 15 % del total celular de la vacuna. En CD derivadas de monocitos es posible inducir la expresión de PD-L1 en condiciones inmunosupresoras, como el agregado de IL-10 (Figura 63.A), o bien en respuesta al estímulo de activación por medio de IFN- γ (Figura 63.B).

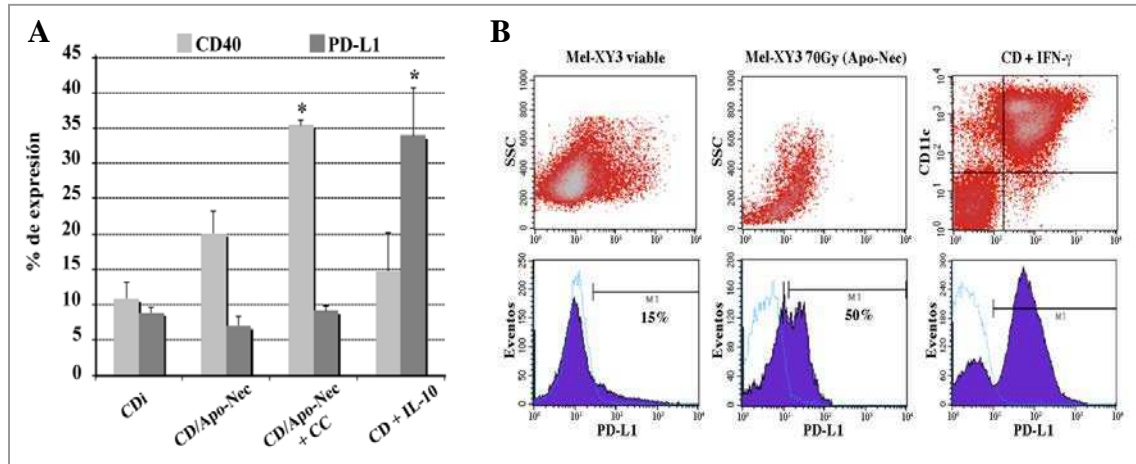


Figura 63. A. Balance en la expresión de las moléculas inmunomoduladoras de superficie CD40 y PD-L1 en la vacuna CD/Apo-Nec. Se comparó su expresión luego de 48 h de co-cultivo, respecto de las CDi. Como control, se indujo un fenotipo inmunosupresor incubando las CD con 10 ng/ml IL-10 ON ($n=2$). B. Expresión de PD-L1 en células Mel-XY3 viables, Apo-Nec y CD previamente estimuladas con 10 ng/ml IFN- γ .

En cuanto al uso *in vitro* de los adyuvantes BCG, Imiquimod y GM-CSF durante la preparación de la vacuna, no se observó un efecto directo sobre la expresión de los marcadores CD40 y PD-L1 (Figura 64). La combinación de los adyuvantes con el CC no mostró interacción significativa y, en todos los casos, se mantuvo el patrón observado anteriormente.

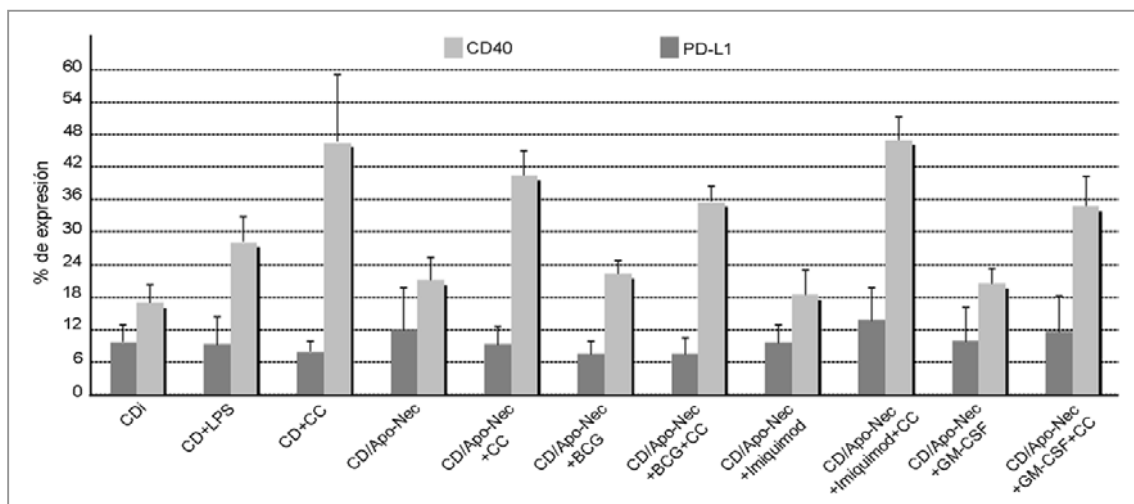


Figura 64. Expresión de los marcadores CD40 y PD-L1 en la vacuna CD/Apo-Nec. Análisis del agregado de los adyuvantes BCG, Imiquimod y GM-CSF, solos y en combinación con el CC, durante la preparación del co-cultivo de la vacuna. ($n=3$).

1.2. Balance de la producción de las citoquinas IL-12 e IL-10 de la vacuna

Además de las moléculas de superficie, se estudiaron algunos factores solubles producidos por la vacuna CD/Apo-Nec que pueden modificar el perfil de respuesta de los linfocitos efectoras. Se analizó específicamente la producción de la citoquina inmunoestimuladora IL-12 y la inmunosupresora IL-10 durante el co-cultivo. El CC generó un incremento significativo en la producción de IL-12 ($p < 0,01$), respecto a las CDi. El co-cultivo con las células Apo-Nec no resultó suficiente para generar un cambio significativo en los niveles basales de IL-12, pero con la maduración con el CC su producción incrementó un 150 % ($p < 0,01$). La vacuna CD/Apo-Nec preparada con CC produjo más IL-12 ($p < 0,05$) que las CD maduras con CC solamente (Figura 65). En cuanto a la secreción de IL-10, se observó que los bajos niveles producidos por las CDi incrementan levemente en la vacuna madurada con CC ($p < 0,05$), muy inferiores a los inducidos por el estímulo con LPS ($p < 0,01$) (Figura 65).

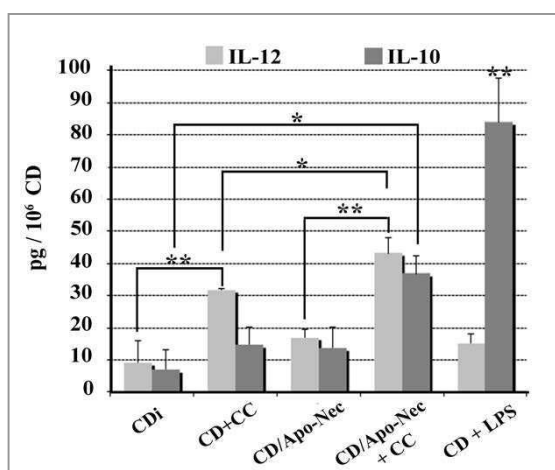


Figura 65. Análisis de la liberación de IL-12 e IL-10 al medio de cultivo. Los sobrenadantes de los cultivos de 48 h fueron analizados por ELISA por triplicado. Se maduraron CD con LPS como control. ($n=3$).

2. Capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de estimular células T CD8⁺ *in vitro*

En una primera aproximación para estudiar la presentación cruzada de Ag por parte de la vacuna y la generación de una respuesta sobre células T CD8⁺, se utilizó un clon CD8⁺ específico para el Ag de melanoma MART-1 (M26). Con este modelo se estudiaron diferentes variables de la preparación de la vacuna CD/Apo-Nec que permitieran caracterizar y optimizar su preparación en función del cargado de Ag y su capacidad de estimular al clon M26.

2.1. Activación del clon CD8⁺ específico para MART-1 de la vacuna CD/Apo-Nec

Como ya se detalló en secciones anteriores, las CD de la vacuna fagocitan las células Apo-Nec y es posible detectar material MART-1⁺ dentro de las mismas a las 48 h, incluso a tiempos más cortos (Barrio 2012). Para determinar la dinámica mediante la cual el antígeno MART-1 es procesado y presentado a las células T CD8⁺ específicas, se realizó el seguimiento de los co-cultivos en el tiempo hasta las 48 h y se evaluó su capacidad de presentar el antígeno en el HLA-I (presentación cruzada). Para esto, se enfrentó la vacuna al clon M26 a diferentes tiempos de co-cultivo y se determinó su nivel de activación a través de la liberación de IFN- γ al medio de cultivo. Se observó que ya a partir de las 3 h de co-cultivo hay una importante activación del clon M26, que se mantiene relativamente constante hasta las primeras 24 h y que para las 48 h aumenta significativamente ($p < 0,01$) (Figura 66). Esta activación es dependiente de las CD, ya que las células Apo-Nec no son capaces de inducir una respuesta del clon M26 de la misma magnitud por sí solas en ninguno de los tiempos evaluados. La activación del clon M26 fue específica, como se pudo observar al cargar externamente a CD con el nonapéptido específico de MART-1 o uno irrelevante de gp100, así como con el co-cultivo de CD con la línea de cáncer de mama IIB-BR-G irradiada, HLA-A*0201⁺ que no expresa el Ag MART-1.

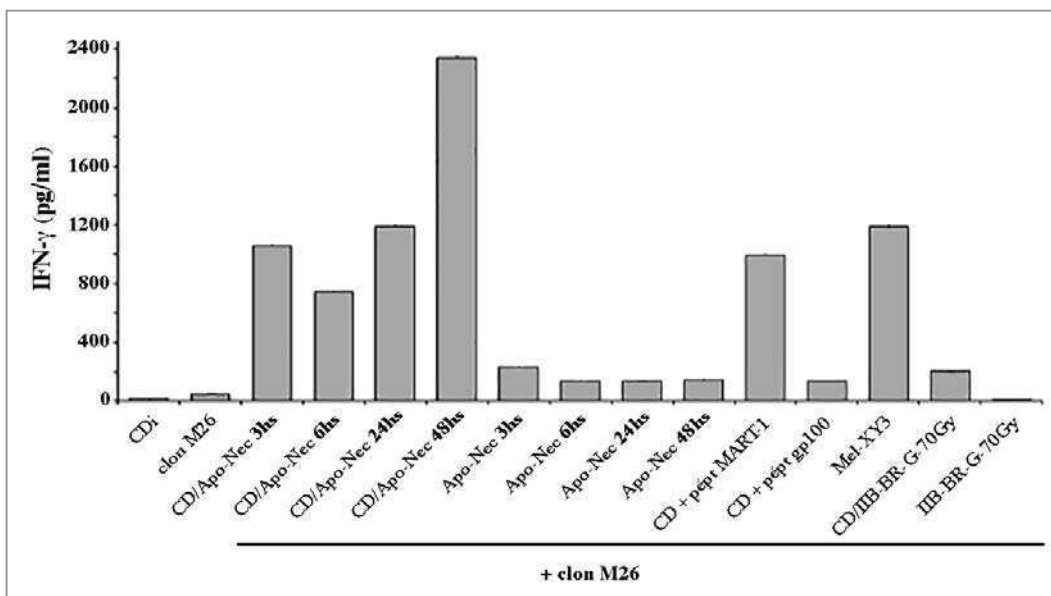


Figura 66. Ensayo representativo de presentación cruzada del Ag MART-1 al clon T CD8⁺ específico M26, restringido al HLA-A*0201, a diferentes tiempos de co-cultivo CD/Apo-Nec. El clon M26 fue enfrentado a las distintas condiciones ON, luego de lo cual se determinaron por ELISA los niveles de IFN- γ liberado al medio de cultivo. Las mediciones de cada condición se realizaron por triplicado. ($n=3$)

Luego, se compararon diferentes relaciones de CD y Apo-Nec al momento de preparar el co-cultivo. La vacuna CD/Apo-Nec, hasta el momento, siempre había sido preparada en una relación 3:1 y las células co-cultivadas por 48 h. En este experimento se realizaron co-cultivos estándar y otros con relaciones mayores de Apo-Nec. El objetivo era comparar la activación de las células CD8⁺ del clon M26 como medida indirecta de la disponibilidad de Ag y el cargado de las CD y, de esa manera, determinar una relación óptima CD:Apo-Nec para el co-cultivo de la vacuna. Se pudo determinar que bastaba con una baja proporción de células Apo-Nec como fuente de Ag para el cargado de las CD y la generación de una fuerte activación del clon M26. Los niveles de IFN- γ liberados por el clon se mantenían constantes entre las relaciones ensayadas, incluso cuando se utilizaban 2 células Apo-Nec por cada CD durante el co-cultivo (Figura 67).

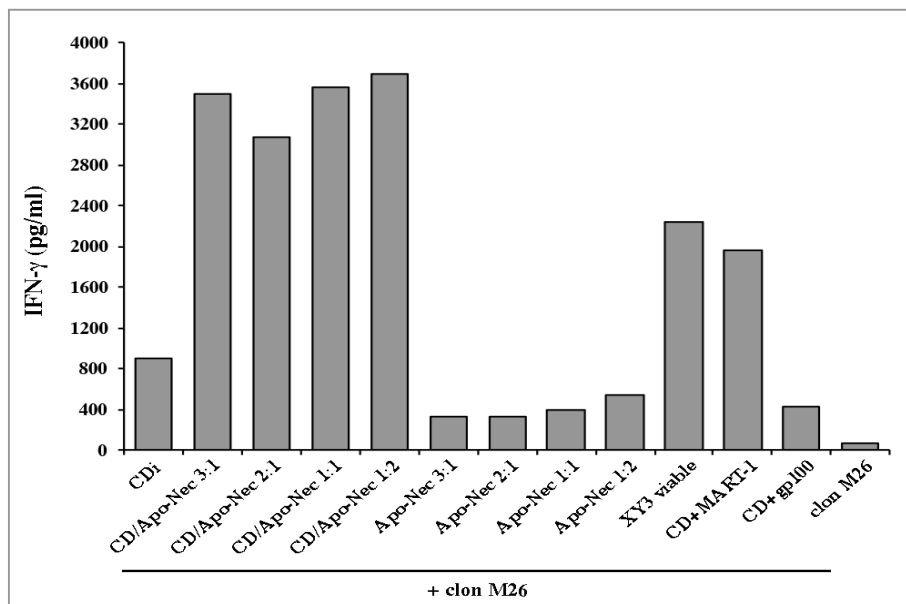


Figura 67. Ensayo de presentación cruzada del Ag MART-1 al clon T CD8⁺ específico M26, con diferentes relaciones CD:Apo-Nec (3:1, 2:1, 1:1 y 1:2) al momento de realizar el co-cultivo de la vacuna. Luego de 48 h, las células fueron enfrentadas al clon M26 y, luego de una incubación ON, se determinaron por ELISA los niveles de IFN- γ liberado al medio de cultivo. Las mediciones de cada condición se realizaron por triplicado.

2.2. Presentación cruzada del antígeno MART-1 según el grado de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec

El uso del CC durante la preparación de la vacuna CD/Apo-Nec indujo una fuerte y rápida maduración sobre la misma, por lo que se estudió el efecto sobre el procesamiento

antigénico y la activación de las células T CD8⁺. Se comparó la respuesta del clon M26 frente a la vacuna con distinto grado de maduración. Se determinó que la activación del clon fue similar en magnitud en ambas condiciones, que resultaron en promedio dos veces superior al nivel basal generado por las CDi solamente ($p < 0,05$) (Figura 68). El agregado de CC durante la preparación de la vacuna no resultó en un incremento significativo de la respuesta a la presentación cruzada del Ag MART-1, aunque se observó una leve tendencia a una respuesta superior cuando la vacuna presenta un fenotipo más maduro.

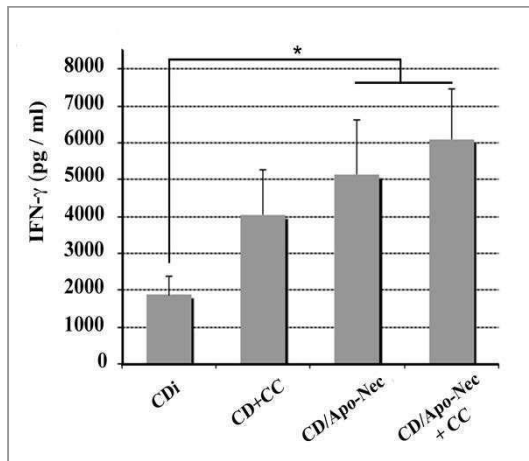


Figura 68. Determinación de la capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de activar un clon T CD8⁺ en distintos estados de maduración. Se analizó el efecto del agregado del CC durante la preparación de la vacuna. Los co-cultivos fueron evaluados a las 48 h. ($n=4$).

También se evaluó el efecto del estado de maduración de la vacuna CD/Apo-Nec sobre otros parámetros involucrados en el cargado antigénico de las CD y la presentación cruzada de Ag. Por un lado, se comparó el efecto del agregado de CC en relación al estado de la fuente de Ag al momento de ser agregado al cultivo con las CD. Se analizó, alternativamente a las células Apo-Nec como fuente de Ag particulado, el cargado de las CD con una fuente de Ag soluble mediante el lisado de las células Apo-Nec, en combinación con el uso de CC. Los niveles de IFN- γ liberados por el clon M26 utilizando el lisado de Apo-Nec fueron levemente inferiores a los obtenidos con el cargado con células Apo-Nec enteras. En ese caso, el agregado de CC aumentó la activación del clon M26 (Figura 69.A). Se estudió además si la relación CD:Apo-Nec en el co-cultivo preparado con CC tenía impacto en la estimulación del clon M26 (Figura 69.B). Al igual que lo observado en los co-cultivos CD/Apo-Nec, no hubo diferencias en la estimulación de las células CD8⁺ al incrementar la cantidad de células Apo-Nec como fuente de Ag en combinación con el CC. Además, los niveles de IFN- γ alcanzados fueron similares a los de la vacuna preparada sin el agregado de CC (Figura 67).

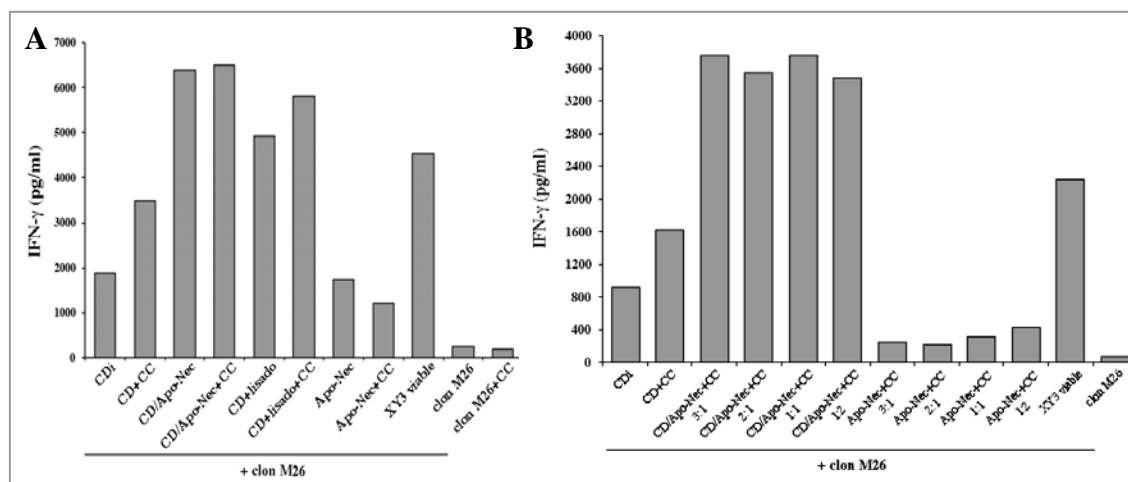


Figura 69. **A.** Ensayo de presentación cruzada del Ag MART-1 al clon T CD8⁺ específico M26. Se comparó la respuesta frente a la vacuna con distinto estado de maduración, preparada con la fuente de Ag en dos formas: Apo-Nec (células enteras) o lisado (células Apo-Nec sometidas a 3 ciclos consecutivos de congelado/descongelado en nitrógeno líquido). **B.** Ensayo de estimulación del clon M26, con diferentes relaciones CD:Apo-Nec (3:1, 2:1, 1:1 y 1:2), combinada con el uso de CC, al momento de realizar el co-cultivo de la vacuna. En ambos casos, luego de 48 h, las células fueron enfrentadas al clon M26 y, luego de una incubación ON, se determinaron por ELISA los niveles de IFN- γ liberado al medio de cultivo. Las mediciones de cada condición se realizaron por triplicado.

2.3. Evolución de la capacidad de presentación cruzada del antígeno MART-1 en el tiempo

Por último, se evaluó la capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de presentar Ag a largo plazo, luego de la preparación del co-cultivo. El seguimiento de la presentación cruzada del Ag MART-1 al clon M26 mostró que esta capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec se mantuvo en el tiempo, por lo menos hasta una semana luego de la preparación del co-cultivo, observándose una activación robusta del clon M26 (Figura 70). Se pudo determinar que en el caso de la vacuna madurada con CC los niveles de estimulación fueron inicialmente similares (a los 2 días de cultivo) y luego levemente menores conforme transcurría el tiempo, en comparación a la vacuna CD/Apo-Nec sola, que mostró una tendencia al alza en los días subsiguientes (3 a 7 días de cultivo). El cargado exógeno de las CD con el nonapéptido específico del Ag MART-1 generó una activación del clon de similar magnitud a la generada por la vacuna. Las células Apo-Nec solas indujeron una respuesta pobre sobre el clon M26, que disminuía conforme transcurría el tiempo.

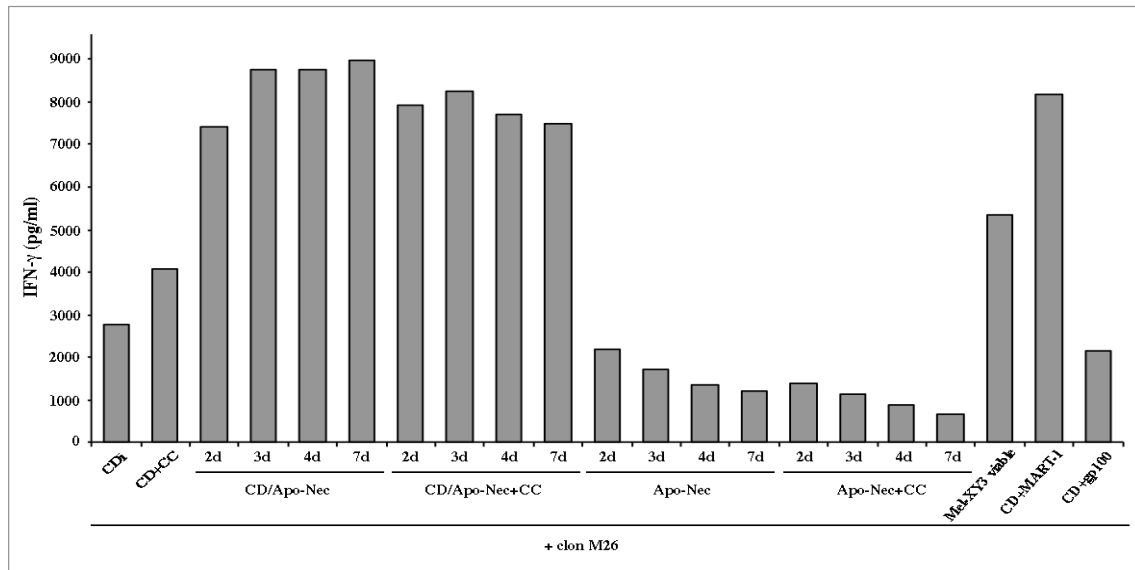


Figura 70. Ensayo de estimulación del clon M26 con la vacuna CD/Apo-Nec, en combinación con el uso de CC, a diferentes tiempos posteriores a la realización del co-cultivo. Luego de una incubación ON con el clon M26, se determinaron por ELISA los niveles de IFN- γ liberado al medio de cultivo. Las mediciones de cada condición se realizaron por triplicado. d=días posteriores al co-cultivo.

3. Estimulación *in vitro* de linfocitos *naïve* con vacunas CD/Apo-Nec autólogas

Mediante el estudio de la estimulación autóloga de linfocitos *naïve in vitro*, se evaluaron diferentes parámetros para caracterizar la RI generada por la vacuna CD/Apo-Nec. Desarrollamos un esquema de estimulaciones semanales de linfocitos con vacunas generadas a partir de PBMC autólogos y comparamos el perfil de activación generado por la vacuna y la inducción de respuesta anti-tumoral.

3.1. Fenotipo y activación de linfocitos *naïve* sometidos a un esquema de vacunación con CD/Apo-Nec autólogas *in vitro*

Se comparó el fenotipo y activación de linfocitos estimulados con la vacuna CD/Apo-Nec sola o madurada con CC, frente a aquellos estimulados con CD sin el cargado de Ag. Tras la re-estimulación de los linfocitos *in vitro* se observó un aumento de la proporción de CD8⁺ frente a los CD4⁺ y de los linfocitos NKT frente a los NK a lo largo de 4 semanas, en las condiciones de cultivo evaluadas.

Por un lado, se analizó la expresión de moléculas de superficie, tanto de marcadores de activación de la RI así como de su inhibición. Se determinó su evolución en el tiempo, a lo largo de las sucesivas estimulaciones y las diferencias entre tratamientos, relativizándolas a la expresión basal de esos marcadores, al momento inicial del aislamiento de los PBMC para el experimento (Figura 71). Los porcentajes basales de las poblaciones analizadas fueron, en promedio: CD25⁺ FoxP3⁻ 7,4 %; CD3⁺CD69⁺ 5,9 %; CD3⁺ICOS⁺ 8,8 %; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ 5,8 %; CTLA-4⁺ 10,8 %; CD3⁺PD-1⁺ 3,3 %; CD3⁺CD28⁺CD62L⁺ 55,6 %; CD3⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ 43,7 %.

De esta manera, se observó que el marcador de activación CD25 presentó un efecto incremental en el tiempo, marcadamente mayor en el caso del estímulo con vacuna y con mayor grado de maduración. En el caso de CD69, se observó una inducción del marcador de manera homogénea a lo largo del tiempo tras la estimulación con vacuna. La molécula co-estimuladora ICOS también aumentó de manera gradual su expresión, principalmente en el caso de la estimulación con la vacuna con mayor grado de maduración (CD/Apo-Nec+CC). En cuanto a los marcadores del freno de la RI, se observó un incremento en la proporción de los linfocitos Treg hacia la última ronda de estimulación, acompañado de un aumento en la expresión de PD-1, coincidente con el aumento del nivel de activación observado en los linfocitos, y en menor medida de la molécula CTLA-4. Respecto a los marcadores de memoria inmunológica, la población CD62L⁺ se mantuvo constante a lo largo de las estimulaciones, con una leve tendencia en alza, sin variar entre condiciones. A su vez, la expresión de CD45RO disminuyó a partir de la semana 3 de cultivo y se mantuvo hasta la última re-estimulación, en balance con la expresión de CD45RA y la población CD45RA⁺CD45RO⁺ (Figura 71).

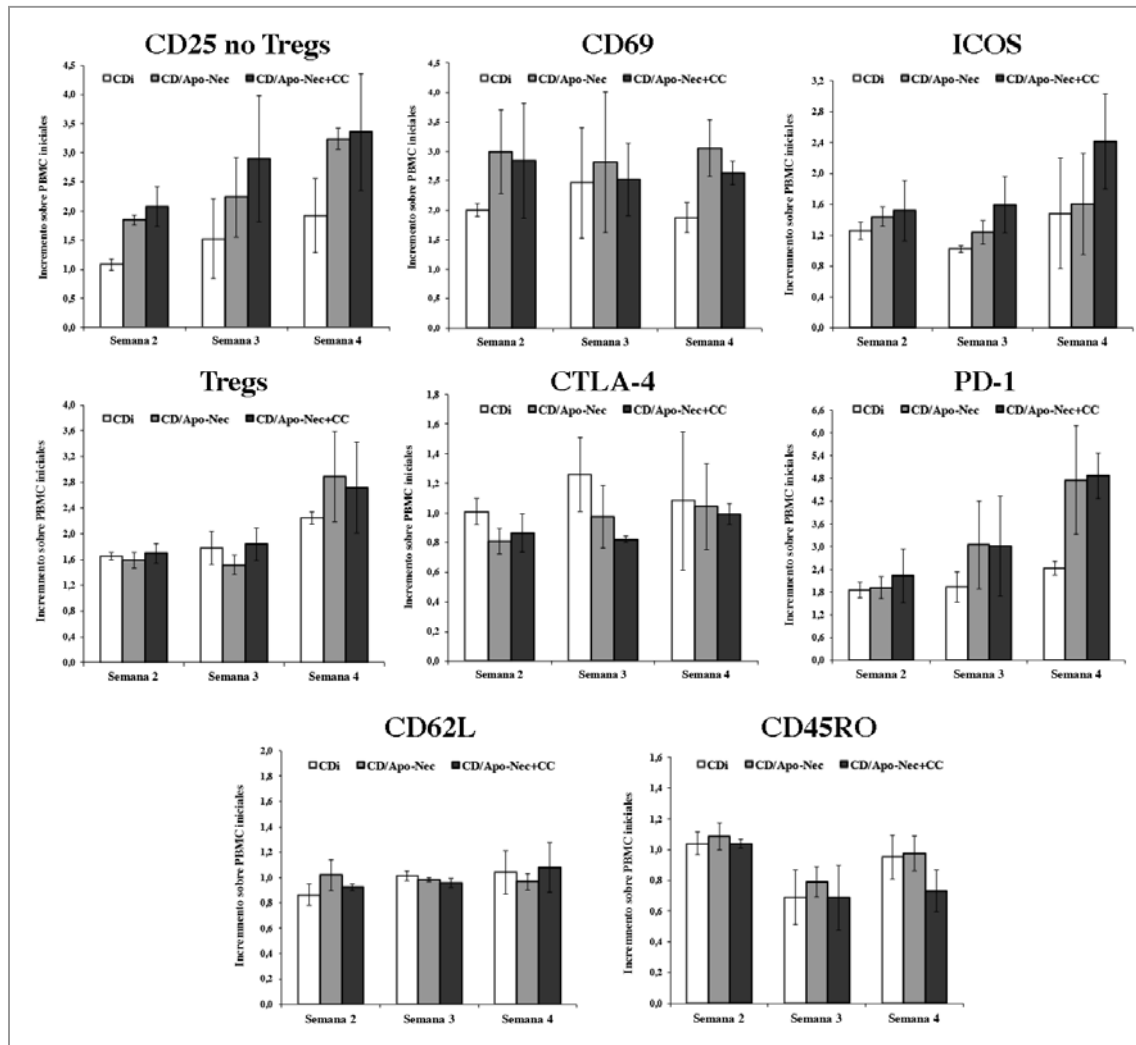


Figura 71. Expresión de marcadores de superficie, representados por las siguientes poblaciones: CD25⁺ FoxP3⁻ (CD25 no Treg); CD3⁺CD69⁺ (CD69); CD3⁺ICOS⁺ (ICOS); CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Treg); CTLA-4⁺ (CTLA-4); CD3⁺PD-1⁺ (PD-1); CD3⁺CD28⁺CD62L⁺ (CD62L); CD3⁺CD45RA⁻CD45RO⁺ (CD45RO). Se comparó el perfil de marcadores de los PBMC estimulados con CDi (CDi), vacuna CD/Apo-Nec y vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC (CD/Apo-Nec+CC), a lo largo de 4 estimulaciónes semanales. Los valores se muestran como el incremento frente a la expresión de cada marcador al momento del aislamiento de los PBMC, evaluado a las 24 h posteriores del agregado de tratamiento de las semanas 2, 3 y 4. (n=2).

Por otro lado, se cuantificaron diferentes citoquinas liberadas al medio de cultivo en el transcurso de las estimulaciónes *in vitro*, para caracterizar el perfil de activación inducido por la vacuna CD/Apo-Nec, con diferente grado de maduración. Se estudiaron algunas citoquinas de perfil de respuesta Th1 (TNF, IFN- γ , IL-12), de Th2 (IL-4) e inmunosupresoras (IL-10 y

TGF- β 1), en todos los tratamientos analizados (CDi, CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec+CC) (Figura 72). Se determinó que la estimulación de linfocitos *naïve* con vacunas CD/Apo-Nec autólogas favoreció la inducción de un perfil de respuesta Th1 en el tiempo, con aumento de las 3 citoquinas analizadas. El principal aumento correspondió a la liberación de IFN- γ , con un incremento progresivo de hasta 4 veces superior al producido por el tratamiento con CDi sin Ag tumorales, y un rango de entre 70-780 pg/ml. Luego, la producción de TNF aumentó hacia la última ronda de estimulación, siendo mayor en el caso de la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC. La IL-12 aumentó ligeramente en ambos tratamientos con vacuna, respecto del control. En cambio, la IL-4 incrementó parcialmente hacia la última semana, siendo mayor en el tratamiento control con CDi. La liberación de IL-10 también presentó un aumento hacia el final de las estimulaciones, mientras que el TGF- β 1 registró una disminución gradual en el tiempo, presentando siempre la menor concentración en el tratamiento con vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC (Figura 72).

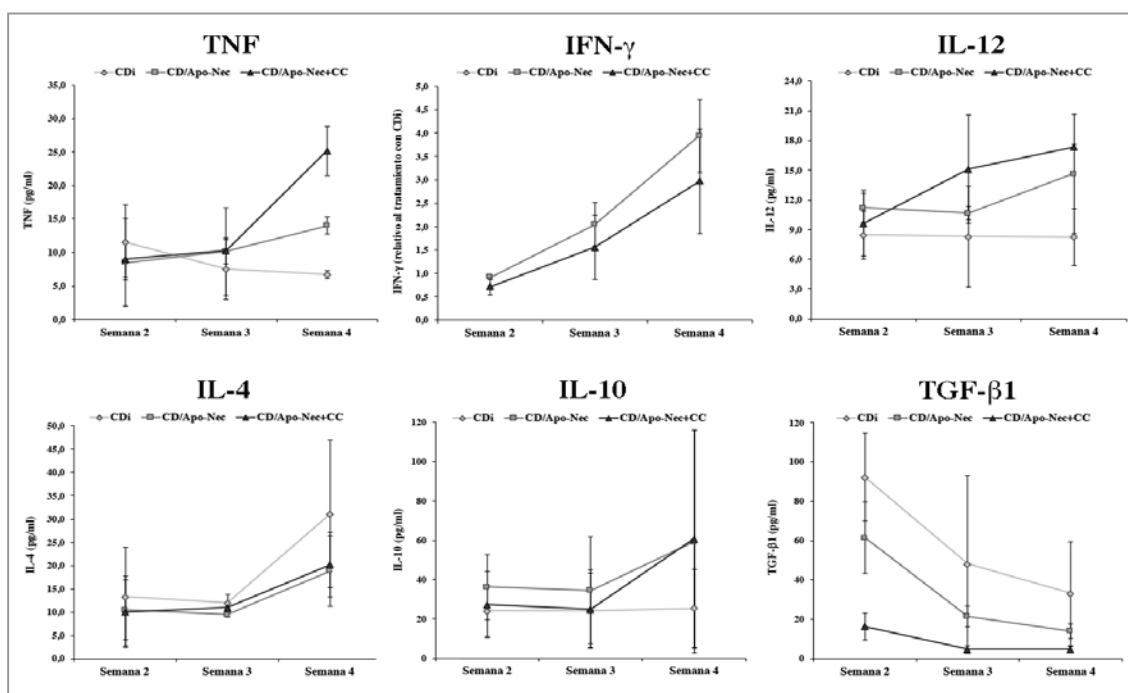


Figura 72. Determinación de la secreción de citoquinas al medio de cultivo por linfocitos *naïve* luego de sucesivas estimulaciones *in vitro* con diferentes tratamientos (CDi, CD/Apo-Nec y CD/Apo-Nec+CC). Las mediciones fueron realizadas a las 48 h posteriores del agregado del tratamiento, por ELISA. Se muestran las determinaciones absolutas, excepto para IFN- γ , en el que se muestra la relativización al valor obtenido con CDi a cada tiempo.

3.2. Respuesta anti-tumoral de linfocitos T inducida por la vacuna CD/Apo-Nec *in vitro*

Sobre los linfocitos estimulados *in vitro* con la vacuna CD/Apo-Nec se estudiaron principalmente dos parámetros relacionados con la respuesta anti-tumoral. Por un lado, la capacidad que tenían esos linfocitos de proliferar al ser nuevamente enfrentados a CD autólogas cargadas con Ag tumorales y frente células tumorales viables. Por otro, su capacidad citotóxica específica cuando son enfrentados a células tumorales viables, luego de ser previamente estimulados *in vitro* con la vacuna.

En cuanto a la capacidad proliferativa de los linfocitos luego de 2 rondas de estimulación *in vitro*, se determinó que su respuesta frente a una nueva exposición a la vacuna dependía del grado de maduración de la misma, y que la magnitud de la respuesta de los linfocitos estaba dictada por el tipo de estimulación previa (Figura 73.A). Aquellos linfocitos previamente estimulados con la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC presentaron la mayor respuesta proliferativa frente a la re-exposición a ambas vacunas. En aquellas condiciones donde no mediaban Ag tumorales, la respuesta obtenida promedió una proliferación basal del 5 %. En el caso de PBMC provenientes de un donante de haplotipo HLA-A*0201, fue analizada también la respuesta proliferativa frente a las líneas celulares viables de melanoma Mel-XY3 y de cáncer de mama IIB-BR-G, ambas HLA-A*0201 (Figura 73.B). Las células de melanoma en contacto con linfocitos previamente estimulados con las vacunas CD/Apo-Nec, independientemente de su grado de maduración, indujeron una mayor respuesta proliferativa, con un máximo de aproximadamente un 20 %, y dependiente de la cantidad de estímulo presente. Mientras que frente a células de cáncer de mama, la proliferación de los linfocitos fue similar al nivel basal, cercano al 8 % y sin variación entre tratamientos o relaciones respondedor:estimulador.

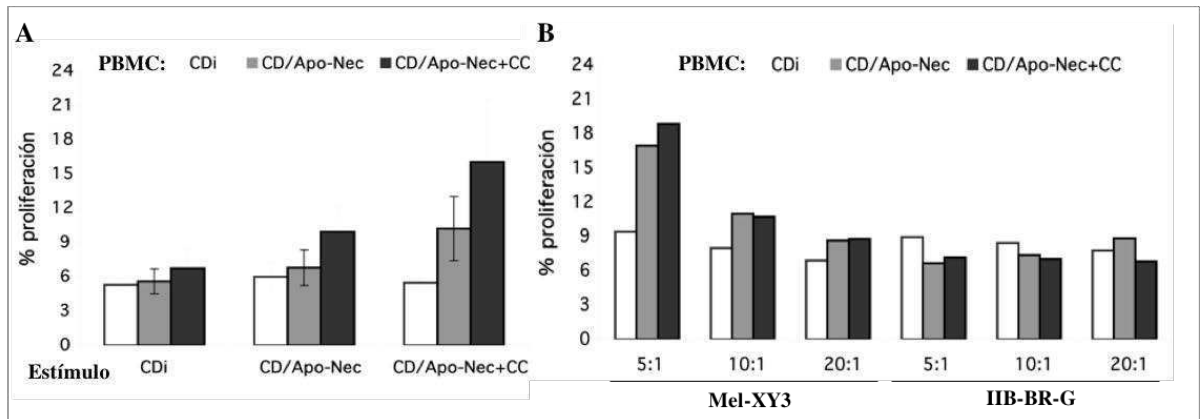


Figura 73. A. Ensayo de proliferación de PBMC marcados con CFSE. Luego de 2 re-estimulaciones *in vitro*, los PBMC fueron marcados con CFSE y re-expuestos a los diferentes tratamientos (CDi, CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec+CC), en una relación R:E 3:1. Se analizó la proliferación luego de 4 días de cultivo, por citometría de flujo. (n=2). **B.** Proliferación de PBMC HLA-A*0201 enfrentados a las líneas tumorales viables Mel-XY3 e IIB-BR-G. Se analizaron tres relaciones R:E, 5:1, 10:1 y 20:1. Se analizó la proliferación luego de 4 días de cultivo, por citometría de flujo. R=respondedor, E=estimulador.

Por último, se analizó la capacidad citotóxica de linfocitos estimulados *in vitro* con múltiples rondas de la vacuna CD/Apo-Nec sobre células de melanoma viables. En este caso, se utilizaron los PBMC del donante de haplotipo HLA-A*0201, para ser compatible con el alelo de HLA-I de las líneas tumorales analizadas. Se comparó la respuesta citotóxica sobre células Mel-XY3 y células de tumorales de mama (IIB-BR-G) (Figura 74.A). Se observó que la respuesta frente a las IIB-BR-G resultó similar entre los diferentes tratamientos, con un leve aumento a mayor relación efector:*target*. En cambio, la respuesta frente a las células de melanoma mostró mayor especificidad. Aquellos linfocitos previamente estimulados con Ag tumorales respondieron con una mayor actividad citotóxica sobre las células Mel-XY3, que incrementaba conforme aumentaba la relación efector:*target*. Sustrayendo la citotoxicidad basal inespecífica (condición CDi), la estimulación previa con la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC mostró una mejor respuesta específica contra las células de melanoma a baja relación efector:*target* (Figura 74.B).

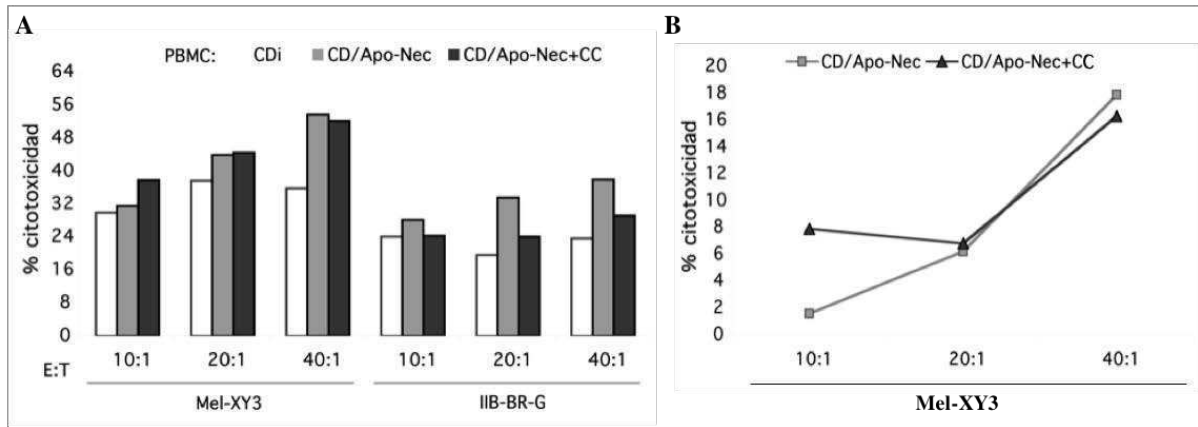


Figura 74. **A.** Ensayo de capacidad citotóxica de PBMC estimulados *in vitro* con los diferentes tratamientos (CDi, CD/Apo-Nec, CD/Apo-Nec+CC) sobre células tumorales viables. Luego de 4 re-estimulaciones *in vitro*, los PBMC HLA-A*0201⁺ fueron enfrentados a células tumorales marcadas con CFSE, en tres relaciones E:T, 10:1, 20:1 y 40:1. Se analizó la citotoxicidad por la incorporación del colorante 7-AAD luego de un cultivo ON, por citometría de flujo. **B.** Citotoxicidad específica contra células Mel-XY3 viables a las distintas relaciones E:T. A cada valor se le sustrajo la citotoxicidad obtenida en la condición CDi. E=efector, T=target.

Resumen

Capítulo III: Interacción de la vacuna CD/Apo-Nec con células T e inducción de una respuesta anti-tumoral *in vitro*

- El agregado de CC durante el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec induce un aumento de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, que ya se había descrito en detalle, y otras como CD40 y ICOS-L, todas de ellas participantes de la activación directa de linfocitos efectoras. Este perfil inmunoestimulador se completa con el incremento de la producción de IL-12. Por otro lado, en estas condiciones de activación se mantienen niveles bajos de IL-10 y de la expresión de PD-L1.
- Las CD co-cultivadas con células Apo-Nec son capaces de activar células CD8⁺ específicas a partir de las tres horas de co-cultivo, incrementando hacia las 48 h. La cantidad de Ag MART-1 ofrecido durante el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec es suficiente para una presentación cruzada efectiva y la magnitud de la respuesta del clon CD8⁺ específico no varía con un aumento de la relación de células Apo-Nec en el cultivo.
- La vacuna madurada con CC exhibe una capacidad similar de activación de las células CD8⁺ específicas, con mayor eficiencia con el uso de la fuente de Ag particulada y sin variaciones entre co-cultivos de distintas relaciones CD:Apo-Nec. La capacidad de presentación antigénica de la vacuna CD/Apo-Nec a largo plazo, evaluada posteriormente a las 48 h de co-cultivo, se mantiene robusta y constante por siete días. Este efecto es similar entre vacunas CD/Apo-Nec con diferente grado de maduración.
- La estimulación autóloga *in vitro* de linfocitos *naïve* con la vacuna CD/Apo-Nec induce una activación de los mismos, con una tendencia al aumento de la expresión de CD25, CD69 y ICOS, luego de cada estimulación, con una regulación a partir de la tercer o cuarta semana a través de Treg y la expresión de PD-1. La activación inducida por la vacuna tiene un perfil Th1, mediante la producción de TNF, IFN- γ e IL-12, que es más marcado en el caso de la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC.
- Los linfocitos estimulados con vacunas CD/Apo-Nec son capaces de proliferar frente a un nuevo estímulo, ya sea presentado por CD o células tumorales viables. Además, muestran actividad citotóxica específica frente a células de melanoma. La respuesta anti-tumoral de los linfocitos analizada *in vitro* es mayor en el caso de utilizar la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC.



DISCUSIÓN



CAPÍTULO I

**Caracterización de la fuente de antígeno
(Apo-Nec) y la interacción con las
células dendríticas en el co-cultivo de la
vacuna CD/Apo-Nec**

En primer término, el objetivo fue describir y analizar en profundidad los cambios e interacciones que se producían a lo largo del tiempo durante el co-cultivo que genera la vacuna CD/Apo-Nec. En particular, se determinaron los efectos de la radiación- γ sobre las células tumorales y algunas características adquiridas por las CD que conforman la vacuna, que resultaran del co-cultivo con las células Apo-Nec y que pudieran tener consecuencias en su capacidad de generar una RI al ser inoculadas en el huésped.

La utilización de fuentes de Ag complejas tiene múltiples beneficios en cuanto a la diversidad antigénica y las señales ofrecidas a las CD. Sin embargo, el empleo de preparaciones derivadas de células tumorales implica asegurar su seguridad biológica al momento de ser utilizada. La generación de lisados celulares ofrece una destrucción instantánea de las células pero que, luego de su incorporación a las CD, el material antigénico soluble no incorporado se pierde en las sucesivas centrifugaciones. Las células tumorales irradiadas son principalmente particuladas y por lo tanto son incorporadas por fagocitosis por las CD. Los restos celulares remanentes permanecen en la formulación de la vacuna, ya que se conservan durante las centrifugaciones, y contribuyen como depósito de Ag en el sitio de inyección. A esta característica se suman posiblemente los factores expresados o liberados por las células irradiadas, señales de peligro detectadas por las CD, como HMGB-1, las HSP y el ATP libre, y que favorecen su activación (Kono and Rock, 2008; Spel et al., 2013).

Los cambios bioquímicos y citológicos producidos luego de la radioterapia sobre las células tumorales han sido estudiados principalmente en cuanto a los daños oxidativos que llevan a la muerte celular localizada. Sumado a los daños producidos en el ADN, el estrés oxidativo generado por las especies reactivas del oxígeno, principalmente por la peroxidación lipídica, colaboran en la senescencia de las células tumorales (Flor et al., 2016). Las células tumorales muestran una lipogénesis aumentada, que ha sido observada como un posible *target* terapéutico (Swinnen et al., 2006). Algunos tumores presentan un incremento en el contenido citoplasmático de LB y, en esos sistemas, se los ha reportado como sitio de reserva de ciclooxigenasas y de producción de eicosanoides como la PGE2, relacionada tanto con la proliferación celular (Accioly et al., 2008) como con la resistencia a la radioterapia luego de la activación de los mecanismos de apoptosis (Brocard et al., 2015; Huang et al., 2011). Además de los daños directos y el efecto *by-stander* de la radiación ionizante sobre células adyacentes (Baskar et al., 2014; Sologuren et al., 2014), se ha analizado la muerte celular inmunogénica a través de su efecto inmunoestimulador y las RI generadas, principal responsable del efecto

abscopal de la terapia, en sitios a distancia (Chandra et al., 2015; Reynders et al., 2015). Sin embargo, los daños oxidativos producto de la radiación de las células, particularmente sobre sus lípidos, podrían traer efectos detrimentales sobre las CD y la presentación cruzada de Ag a linfocitos T CD8⁺ (Cao et al., 2014).

Acompañando estos cambios y procesos relacionados con la muerte celular inducida por la radiación, y basados en la evidencia previa del análisis de las células Apo-Nec por microscopía electrónica, que sugería cambios en la composición lipídica, se decidió caracterizar en profundidad aspectos fenotípicos de las células luego de la irradiación y determinar qué efectos podían tener sobre su preparación como fuente de Ag segura y que resultara en un cargado eficiente de las CD.

Por un lado, la radiación ionizante gamma en alta dosis (25 y 70 Gy) probó ser un método efectivo de esterilización replicativa, con una inmediata pérdida de la capacidad de sintetizar ADN y ausencia total de crecimiento de colonias en agar blando. Esta inactivación estuvo acompañada por una pérdida gradual de la integridad de membrana de las células tumorales, como parte del proceso apoptótico/necrótico, desencadenado en más del 90 % de las células irradiadas luego de 48 h. Sin embargo, hay que considerar que, como fuente de Ag, las células Apo-Nec deben proveer las proteínas tumorales para el cargado de las CD. Se produjo una disminución de casi 40 % en el contenido proteico total inicial de las células Mel-XY3 inmediatamente post-irradiación, probablemente debido a la pérdida de integridad de membrana. Esta pérdida continuó a medida que fue avanzando el proceso apoptótico/necrótico, principalmente durante las primeras 24 h. Las células irradiadas sufrieron además una disminución de la expresión en la membrana de los complejos HLA-I, casi nulo a las 48 h, lo que las convierte en pobres presentadoras directas de los Ag tumorales. Este efecto es diferente a otros sistemas, donde las células tumorales irradiadas a dosis sub-letales de hasta 25 Gy, como dosis única o acumulativa, inducen la expresión de los complejos HLA-I clásicos, de manera dosis-dependiente, con aumento de expresión de TAA (Garnett et al., 2004; Reits et al., 2006). Esta inducción estaría mediada por factores solubles secretados por las propias células luego de estímulos apoptóticos, como los agentes quimioterápicos o la radiación- γ . Se observó que el IFN- β liberado por células de cáncer de mama irradiadas puede generar una mayor expresión del HLA-I en células viables (Gallegos et al., 2016; Wan et al., 2012). A pesar del potencial inmunogénico *in vivo* de la radiación a bajas dosis, a través de señales de daño celular, si este aumento del HLA-I se produce en ausencia de moléculas co-estimuladoras, como CD80 o CD86, la presentación directa de antígenos induce anergia en los linfocitos

específicos. En el modelo aquí utilizado, se busca la inactivación segura de las células tumorales como fuente de Ag de la vacuna con CD, con una dosis alta de radiación- γ , sacando provecho de los efectos inmunoestimulatorios generados por la muerte inmunogénica inducida.

A pesar de la baja del contenido proteico total, hay una pérdida diferencial de sus componentes. Mientras que la proteína de referencia citoplasmática β -actina disminuyó al ritmo de la proteína total, Ag como MART-1, altamente hidrofóbicos y que están asociados a membranas celulares de estructura densa como los melanosomas (De Mazière et al., 2002), sufren un enriquecimiento relativo, ya que su dinámica a lo largo del tiempo post-irradiación es distinta. A pesar de una baja gradual, aumentó su proporción y mantuvo el patrón de distribución reticular en el citoplasma de las células tumorales, incluso a las 48 h post-irradiación. Las células tumorales formaron grandes agregados mientras ocurrían estos y otros dramáticos cambios morfológicos, inducidos por la irradiación. Sin embargo, un hecho importante es que permanecían cuerpos celulares intactos, que contienen carga proteica, enriquecida en Ag inmunogénicos conocidos y otros posibles neo-antígenos, y que liberan señales de peligro por muerte celular post-irradiación.

Al evaluar el contenido lipídico de las células de melanoma, se pudo determinar que, a pesar de estar presentes en las células de melanoma viables, el incremento de LB citoplasmáticos era uno de los principales cambios morfológicos luego de la irradiación, claramente evidente a las 24 h. Los LB, recientemente reconocidos como organelas, están formados por un núcleo compuesto por lípidos neutros, principalmente triglicéridos, y están recubiertos de una monocapa de fosfolípidos (Fujimoto et al., 2008). Los LB poseen numerosas proteínas asociadas y están involucrados en diferentes procesos celulares, con un número creciente de funciones asociadas, no sólo la de reserva energética (Bozza and Viola, 2010; Farese and Walther, 2009). A medida que avanzaba el proceso apoptótico/necrótico, el contenido lipídico se fue perdiendo, al igual que el contenido proteico, aunque en menor proporción. No se observó asociación física entre los LB y el Ag MART-1 en las células Mel-XY3 viables o post-irradiación. Este incremento de los LB inducidos por la radiación, tanto en su tamaño como en el número total por célula, no se generó principalmente por síntesis *de novo*, sino que probablemente fue consecuencia de la fusión de otros más pequeños, a través del sistema SNARE desde otros compartimentos celulares, sugerido en otros sistemas (Boström et al., 2007), y/o la reorganización y movilización de lípidos preexistentes. A las 48 h post-irradiación, en las células tumorales se produjo principalmente un aumento relativo de los triglicéridos. Este hecho fue asociado previamente al proceso apoptótico desencadenado

por la vía de señalización de Fas en células Jurkat (Al-Saffar et al., 2002). Sin embargo, en sistemas de muerte celular inducida por radiación en células tumorales, el aumento de los LB se reportó asociado a un mecanismo de resistencia a la apoptosis (Brocard et al., 2015; Huang et al., 2011). En nuestro sistema, no se determinó a cuál de los dos mecanismos estaría vinculado el aumento inicial de los lípidos, pero, a la dosis de radiación administrada, la muerte celular es rotunda e irreversible.

Además del análisis de estos cambios, resultaba de suma importancia entender las interacciones entre las CD y las células tumorales irradiadas *in vitro*, para mejorar la eficiencia de la vacuna CD/Apo-Nec. De alguna manera, también se podrían entender los posibles efectos del contenido lipídico en la interacción *in vivo* de las CD con las células tumorales, luego de la radioterapia. Las CD pueden expresar tanto moléculas co-estimuladoras como co-inhibitorias (Chen and Flies, 2013) y mediante la modulación de su expresión controlan y regulan la inmunidad, pudiendo activar o tolerizar a las células T (Banchereau and Steinman, 1998). Teniendo en cuenta esto, la maduración de las CD, producto del balance complejo de señales que determinan su fenotipo final al momento de encontrarse con los linfocitos, es un paso clave y decisivo en el proceso de la generación de vacunas anti-tumorales. Luego de 48 h, las CD co-cultivadas con las células Apo-Nec presentaban una modulación intermedia de las moléculas co-estimuladoras y presentadoras de Ag, comparado con la maduración inducida por otros estímulos canónicos como el LPS o el cóctel de maduración estándar, compuesto por las citoquinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 y PGE2 (Jonuleit et al., 1997). Las células Apo-Nec tendían a formar grandes agregados en los co-cultivos de la vacuna, dejando algunas CD atrapadas o relegadas a la periferia de estos acúmulos. La utilización del CC durante el co-cultivo de la vacuna incrementó todos los marcadores de maduración analizados, dejando una población de CD maduras y más homogénea en cuanto a la expresión de dichos marcadores. Además, generó, por un lado, menor adherencia de las CD a las placas de cultivo y, por otro, mayor dispersión de las células en el co-cultivo, casi sin formación de agregados de células tumorales y con mayor formación de acúmulos o *clusters* de CD. Sin embargo, lo más importante es que la rápida adquisición de este fenotipo maduro no tuvo consecuencias significativas en la captura de Ag ofrecidos por las células Apo-Nec. En este caso, poco más del 40 % de las CD del co-cultivo preparado con CC presentaba restos de células tumorales en su interior. En particular, el seguimiento del Ag MART-1 reveló que la proteína era incorporada y procesada por las CD a lo largo de las 48 h de co-cultivo. Por lo tanto, la utilización del CC en nuestro

sistema logró preservar el equilibrio requerido para generar una vacuna con un perfil que favorezca la estimulación de células T específicas contra Ag de melanoma.

En cuanto al contenido lipídico, se ha reportado que en ratones portadores de tumor, o con tumores inducidos por radiación, las CD presentan mayor acumulación de lípidos citoplasmáticos, mayormente triglicéridos, comparados con ratones sanos. Las CD con mayor carga lipídica tenían impedimento funcional, con menor maduración, baja estimulación de linfocitos alogeneicos y capacidad reducida para procesar Ag (Gao et al., 2015; Herber et al., 2010). A su vez, se los ha descrito involucrados en la inflamación y su aumento en respuestas de células de la inmunidad innata, en presencia de intermediarios como IFN- γ o la señalización vía TLR. Se ha reportado un incremento de LB en los leucocitos, en asociación con los fagosomas, y que proteínas localizadas de los LB están involucradas en el proceso de presentación cruzada de las CD, mediando el transporte de los péptidos fagocitados hacia el retículo endoplasmático (Bougnères et al., 2009; Bozza and Viola, 2010; van Manen et al., 2005). Por lo tanto resultó importante determinar si el contenido lipídico tenía algún efecto sobre las funciones de las CD en nuestro sistema. En primer lugar, las CDi contenían pequeños LB, que incrementaban con la maduración en respuesta al LPS. Al ser co-cultivadas con las células Apo-Nec, los LB de las CD aumentaban en número y tamaño. El agregado de CC no introdujo mayores cambios en el aumento del contenido lipídico, por lo que este fenotipo en las CD se desencadenaba principalmente por la presencia de las células Apo-Nec y durante el proceso de fagocitosis, consistente con lo observado por Bougnères *et al.* Como se había observado aquí previamente, los LB eran liberados por las células irradiadas, pero la escasa transferencia directa de los mismos a las CD no alcanzaba para explicar el aumento total de los LB en las CD. Por lo tanto, éstos debían provenir de la generación endógena de las CD. Esto también fue corroborado en co-cultivos realizados utilizando células Apo-Nec con diferente contenido lipídico. Independientemente de este factor y de la utilización o no del CC, las CD aumentaban sus LB citoplasmáticos al ser co-cultivadas con las células Apo-Nec y mantenían constante la capacidad de incorporar Ag tumorales, seguida a través del destino del Ag MART-1.

En este contexto, se evaluó y comparó la capacidad de la vacuna de estimular linfocitos alogeneicos, en ensayos de MLR, dependiendo de su grado de maduración y del contenido lipídico ofrecido por las células Apo-Nec. Estos resultados mostraron claramente baja respuesta estimuladora de las CD co-cultivadas solamente con las células Apo-Nec, incluso en una relación 10:1 efector:*target*. Este resultado es independiente del contenido lipídico de las

células Apo-Nec y, en ambos casos, la vacuna genera estimulación si fue preparada en presencia del CC. Al inducir la maduración de las CDi con los estímulos LPS y CC solamente, se observa mayor estimulación de los linfocitos alogeneicos, que resulta directamente proporcional al nivel de aumento de los marcadores de maduración, evaluados en los cultivos. De esto se desprende que la baja capacidad estimuladora de la vacuna CD/Apo-Nec sería debida en parte a la menor expresión de moléculas de superficie. Si se tiene en cuenta también otra característica del cultivo, como es la formación de grandes agregados inducidos por las células Apo-Nec, se podría hipotetizar que las CD de la vacuna quedan de alguna manera ‘secuestradas’ y en consecuencia poco disponibles para entrar en contacto suficiente con los linfocitos de baja afinidad y lograr estimularlos en la MLR (Gijzen et al., 2007). Los agregados homotípicos de las células Mel-XY3 irradiadas podrían ser generados por interacciones específicas (Glinsky et al., 2003), ya que han mostrado ser capaces de formar colonias compactas en los ensayos clonogénicos, y por uniones inespecíficas luego del daño celular inducido por la irradiación. Se ha reportado que el estímulo de maduración del CC induce mayor motilidad de las CD, en parte por la secreción aumentada de MMP-9. Estas características podrían estar relacionadas con la menor adherencia y liberación del sustrato de cultivo de las CD y la disgregación de los cúmulos celulares en los co-cultivos de la vacuna CD/Apo-Nec preparada con CC, y por ende, su mayor capacidad estimuladora.

Las características analizadas en esta sección permiten asegurar que las células tumorales de melanoma irradiadas constituyen una fuente de Ag segura, que presenta una inducción de lípidos citoplasmáticos post-irradiación, pero sin consecuencias funcionales sobre las CD luego del co-cultivo. Las células Apo-Nec proveen Ag tumorales a las CD, que pueden capturarlos y procesarlos eficientemente, mientras adquieren un fenotipo maduro durante el co-cultivo a través del agregado del CC. En estas condiciones de co-cultivo, las CD presentan mayor movilidad y existe una menor proporción de agregados celulares, confiriendo mayor ‘libertad’ a las CD para interactuar con otras células inmunes, evitando así la posible generación de un depósito celular en el sitio de inyección de difícil acceso para el SI.



CAPÍTULO II

Capacidad migratoria *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec y distribución a los ganglios linfáticos *in vivo* en el modelo de ratón *nude*

Como se vio anteriormente, el proceso de activación y maduración de las CD conlleva un aumento de la motilidad y migración en respuesta a gradientes quimiotácticos que permiten el *homing* a los GL, entre otras características. Estos procesos pueden ser regulados por el reconocimiento de PAMP, la exposición a DAMP liberados por células dañadas o en proceso de muerte o por mediadores pro-inflamatorios sobre las CD (Escamilla-Tilch 2013). Previamente, se analizó la oferta y disponibilidad antigénica de las células de melanoma irradiadas Apo-Nec, así como su captura y procesamiento en el co-cultivo con las CD. Como fuente de Ag, son fagocitadas por las CD durante las 48 h de co-cultivo y, al ser combinado con el uso del CC, se incrementa significativamente la expresión de moléculas co-estimuladoras y cambian las interacciones celulares en el co-cultivo, favoreciendo su capacidad de estimulación alogénea. Sumado a estas determinaciones, se quería analizar las características migratorias de la vacuna CD/Apo-Nec, evaluando su sensibilidad y capacidad de respuesta frente a señales inflamatorias y de *homing* a los GL. Se caracterizó el efecto sobre estos parámetros migratorios luego del agregado de diferentes agentes de maduración durante la elaboración del co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec. Se investigó la utilización del CC (Jonuleit et al., 1997) junto con el agregado de ligandos de TLR, como el Imiquimod, análogo del ligando de TLR7, o el ligando de TLR4 BCG, utilizada en la vacuna celular VACCIMEL (Barrio et al., 2006). En estas condiciones de maduración, interesaba evaluar parámetros funcionales como la expresión de quimiorreceptores, la motilidad celular y la respuesta quimiotáctica específica, factores que favorecen el *homing* de las CD a los GL para la activación de los linfocitos (Alvarez et al., 2008; Martín-Fontecha et al., 2003).

Por un lado, el estímulo inducido por las células Apo-Nec sobre las CD durante el co-cultivo fue suficiente para generar un cambio en el patrón migratorio *in vitro*. Este efecto fue levemente inferior, aunque similar en magnitud, al inducido por el uso de LPS o CC como agentes madurativos sobre las CD. El receptor de la quimioquina CCL3, CCR5, se reguló negativamente con la maduración y, consecuentemente, disminuyó la migración frente a su ligando. En el caso del receptor CCR7, no se logró detectar una mayor expresión del receptor en la vacuna CD/Apo-Nec aunque, junto con la modulación de otros marcadores de maduración, aumentó la respuesta quimiotáctica frente a su ligando CCL19. Este receptor es muy sensible a su ligando, por lo que una pequeña modulación no detectada, comprendida dentro del error experimental, podría ser responsable de la respuesta quimiotáctica. También está descrito que, con la maduración, las CD pueden producir la quimioquina CCL19 (Alvarez et al., 2008), que induce la internalización de su receptor CCR7 vía Arrestina-3 (Byers et al.,

2008), motivo por el cual podríamos no haber detectado su expresión en la vacuna CD/Apo-Nec. Por su parte, la PGE2 está asociada al aumento de la expresión del receptor CCR7 y la disminución de la producción de CCL19 por las CD (Hansen et al., 2012; Muthuswamy et al., 2010). En el modelo aquí utilizado, el agregado del CC aumentó de manera significativa la expresión del receptor y la respuesta quimiotáctica frente a CCL19 *in vitro*.

La repercusión del estímulo madurativo del CC sobre los parámetros migratorios de la vacuna fue evidente también luego del tratamiento con algunos componentes del CC de manera individual, poniendo atención en los efectos de la IL-6 o la PGE2, ya que poseen algunas funciones inmunosupresoras ya descritas (Hegde et al., 2004; Kalinski, 2012). En el modelo de vacuna CD/Apo-Nec, sólo con la combinación de todos los componentes del CC se logra inducir un fenotipo de maduración completa sobre las CD de la vacuna. Se detectó que la PGE2 induce el aumento de la expresión de CCR7, aunque en ese caso no se alcanza un máximo, mientras que la IL-6 mantiene niveles muy bajos del receptor CCR7. El agregado de adyuvantes del tipo ligandos de TLR ha probado ser efectivo para la maduración de las CD *in vitro* (Boullart et al., 2008; Marongiu et al., 2013; Spranger et al., 2010), pero en el co-cultivo CD/Apo-Nec no tuvo efectos adicionales por sobre el estímulo producido por las células Apo-Nec o los inducidos por el CC. Las vías por las cuales están actuando los adyuvantes podrían superponerse con el estímulo de las Apo-Nec y enmascarar el efecto directo de los adyuvantes (Escamilla-Tilch et al., 2013; Spel et al., 2013). Sin embargo, en todas estas situaciones ensayadas, la utilización del CC completo optimiza los parámetros en cuanto a la expresión de las moléculas de superficie y la respuesta quimiotáctica.

A su vez, el agregado de CC al co-cultivo CD/Apo-Nec también incrementa su migración a través de una matriz proteica en respuesta a la quimioquina CCL19. Durante el estado estacionario o la inflamación, las CD utilizan tanto la movilización ameboide (Renkawitz et al., 2009) como la acción de metaloproteasas, principalmente la MMP-9 (Ratzinger et al., 2002), para alcanzar los vasos linfáticos y migrar a los GL. El aumento en la migración invasiva *in vitro* inducido por el uso del CC está determinado por la actividad de la MMP-9 secretada por las CD, que aumenta con la maduración de la vacuna. La modulación de la actividad de la MMP-9 regula directamente la migración invasiva de la vacuna CD/Apo-Nec. Ya estaba reportado que la PGE2, presente en sitios de inflamación, induce la producción de MMP-9 y que es necesaria para la migración de las CD mediada por el receptor CCR7 (Yen et al., 2008). Además del efecto de la PGE2 sobre la expresión del CCR7, observado anteriormente en el análisis de los componentes separados del CC, se determinó un aumento

de la migración invasiva y de la actividad de la MMP-9, principalmente relacionado a esta citoquina, en el sistema de la vacuna CD/Apo-Nec.

Considerando el fenotipo migratorio inducido por la utilización del CC en la preparación de la vacuna CD/Apo-Nec, se realizó un análisis a corto y mediano plazo de la migración de la vacuna humana a los GL en ratones *nude*. A pesar de las limitaciones que puede traer la utilización de un modelo xenogéneo inmunodeficiente, resultó una herramienta muy útil debido a la alta homología y reactividad cruzada humano-ratón tanto de las quimioquinas de *homing* a los GL, CCL19 y CCL21, como de su receptor CCR7 (Campbell et al., 1998) (BLAST, National Center for Biotechnology Information, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y que, por su carencia de inmunidad celular T, permitía evaluar el desempeño de las células humanas en el corto y mediano plazo sin reacciones de rechazo, detrimentales para las células inoculadas o el ratón. Las técnicas no invasivas de seguimiento celular *in vivo* combinadas con trazadores fluorescentes de espectro de emisión cercano al infrarrojo probaron ser herramientas muy poderosas para la investigación de terapias celulares, entre ellas las basadas en CD (Christian et al., 2009; Somanchi et al., 2012). Estas determinaciones realizadas en el modelo murino permitieron analizar la capacidad migratoria de la vacuna CD/Apo-Nec en un ambiente fisiológico. En este caso, permitió evaluar la dinámica de llegada de la vacuna humana a los GL del ratón luego de una inyección subcutánea y el análisis de su distribución en el tiempo.

De esta manera, al inyectar la vacuna CD/Apo-Nec en la almohadilla plantar trasera del ratón, se detectó la llegada de las células al ganglio poplíteo drenante de manera rápida, determinado en la observación 2-3 h post-inoculación. Esto puede corresponder en parte a un drenaje linfático pasivo desde el sitio de inyección o bien una forma de migración rápida, como se ha descrito previamente (Grayson et al., 2007), debido a la baja adhesión de las CD en el sitio de inyección y en respuesta quimiotáctica hacia el GL. Las células se observaron principalmente en la zona periférica del GL, que correspondería a los senos subcapsulares y, en muchos casos, penetrando dentro de la estructura hacia los folículos y la médula (Kataru et al., 2011; Sainte-Marie and Peng, 1983). Se produjo una migración ipsilateral que fue incrementando gradualmente hasta las 48 h luego de la inyección, punto de evaluación y comparación de la migración a corto plazo. La distribución regional de la vacuna coincidió con los GL mapeados con Azul de Evans (Harrell et al., 2008), previamente a los ensayos de migración *in vivo*.

El grado de maduración de la vacuna se relacionó directamente con la llegada total a los GL al tiempo evaluado. La vacuna CD/Apo-Nec preparada con el CC se observó más distribuida entre los GL locoregionales ipsilaterales, con menor concentración en el primer GL de la vía de distribución linfática. Aún más, en el caso de la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC, se localizó una muy baja pero constante proporción en uno de los ganglios axilares. La combinación de esta vacuna con adyuvantes locales tuvo resultados positivos sobre la migración, mejorando aún más la llegada a los GL. La co-administración de BCG en el sitio de la vacunación mostró una tendencia al aumento de la migración de la vacuna preparada con CC a los ganglios del ratón, aunque no resultó significativo. La utilización del Imiquimod, aplicando una crema tópica localizada de manera diaria (Fehres et al., 2014), incrementó significativamente la migración de la vacuna, independientemente del grado de maduración de la misma. Es importante resaltar que el Imiquimod como adyuvante *in vivo* mostró un efecto aditivo sobre la migración en combinación con el uso del CC en la preparación de la vacuna. Sin embargo, la mayoría de las células inoculadas permanece en el sitio de inyección. La proporción de la vacuna CD/Apo-Nec que alcanzó los GL no superó los niveles reportados en estudios previos de modelos de vacuna con CD. Éstos se encuentran alrededor del 4-5% del total inoculado, determinados con CD marcadas radiactivamente en pacientes con cáncer (Ridolfi et al., 2004; de Vries et al., 2003). No obstante, no es posible descartar que, en nuestro modelo, este valor podría estar siendo subestimado, debido a la reactividad cruzada solamente parcial entre el humano y el ratón de las quimioquinas y de las moléculas de adhesión (Campbell et al., 1998; Park et al., 2001). Recientemente, se ha logrado mayor proporción de migración mediante la combinación de las vacunas de CD con adyuvantes como el toxoide del tétanos. La migración aumentada junto con la mayor sobrevida total se han observado en un modelo murino y en pacientes con glioblastoma tratados con el mismo esquema de inmunización (Mitchell et al., 2015; Sabado and Bhardwaj, 2015).

A diferencia de la migración a través de una matriz proteica *in vitro*, la llegada de la vacuna CD/Apo-Nec a los GL del ratón no depende exclusivamente de la actividad de la MMP-9. Los resultados obtenidos utilizando el Inhibitor I específico *in vivo* sugieren una migración de las CD facilitada parcialmente por la MMP-9, inducida tras la maduración con el CC. Esto indica que hay otros mecanismos involucrados en este proceso, como la sensibilidad de las CD a las quimioquinas y la capacidad de respuesta frente a ellas. Un fenotipo menos adherente de la vacuna y coordinados mecanismos de movimiento ameboide pueden determinar el tránsito entre compartimientos intersticiales frente a un gradiente quimiotáctico (Renkawitz et al.,

2009). Esto además puede facilitar el encuentro de las CPA residentes con los Ag tumorales remanentes en el sitio de inyección.

Por último, se describió la migración y localización de la vacuna CD/Apo-Nec madurada con el CC por *in vivo imaging*, a mayores tiempos de seguimiento. Aquí se observó que había una acumulación progresiva de las CD marcadas en los GL drenantes más cercanos, que alrededor de los cinco días alcanzó una meseta, que comienza a decaer lentamente en los días subsiguientes. Las células de la vacuna se pueden identificar por su morfología y se localizan dentro de la estructura de los GL murinos, incluso a los 9 días post-inoculación. Por este método no se puede determinar si el porcentaje de migración alcanzado corresponde al valor máximo final que se puede obtener, por una senescencia o muerte de las CD inoculadas o si hay una tasa de llegada y recambio de las células en los GL que se estabiliza en ese valor, como ocurre en condiciones de estado estacionario o inflamación (Boltjes and van Wijk, 2014; Kamath et al., 2002). Mediante este seguimiento en el tiempo de la vacuna CD/Apo-Nec por *in vivo imaging*, que permitió cuantificar solamente su presencia en los ganglios poplíteo y ciático, la utilización de Imiquimod de forma tópica parecía no tener un efecto incremental sobre la migración. Cuando se analizó el total de los GL extraídos de los ratones, se pudo observar un aumento en la migración con el adyuvante, que se da a nivel de los otros GL drenantes. Además, el abandono del tratamiento con el Imiquimod al día 2 genera que, con el correr del tiempo, se iguale la distribución entre los GL. Este cambio en la distribución sugiere un efecto directo y necesario del adyuvante que requiere de su administración regular para facilitar la migración, aunque la crema tópica podría tener un efecto de corta duración sobre el sitio de inyección en la piel, con consecuencias durante los primeros días de su aplicación.

Al día 9, la mayoría de las células de la vacuna inoculadas se mantenían en el sitio de inyección en la almohadilla plantar del ratón, con aspecto y morfología normal y viable, sin zonas necróticas evidentes. A pesar de que la mejora del *homing* a los GL puede representar un desafío para el desarrollo de las vacunas basadas en CD, no hay datos suficientes ni claros sobre cuántas CD son necesarias para activar eficientemente a los linfocitos T para generar una respuesta anti-tumoral efectiva. Actualmente es un campo de intensa investigación, principalmente para determinar si el GL es el sitio específico y relevante para que se puedan montar respuestas anti-tumorales efectivas, o si pueden iniciarse también en sitios alternativos (Aris et al., 2015; De Chaisemartin et al., 2011). La controversia sobre este tema se origina principalmente debido a la existencia de un compromiso tanto local como sistémico por la presencia del tumor en el organismo (Soudja et al., 2011). La función inmunológica normal de

los GL drenantes del tumor se ve comprometida por la presencia de metástasis, a través de mecanismos inmunosupresores (Munn and Mellor, 2006), a pesar de que siguen siendo una fuente de células T estimulables (Jeanbart et al., 2014; Zheng and Shu, 2011). Se ha descrito que los Treg FoxP3⁺ presentes en el GL pueden inducir la muerte celular de las CD e impedir su normal motilidad, necesaria para la presentación cruzada de Ag a células T CD8⁺ (Boissonnas et al., 2010). Publicaciones recientes sugieren al sitio de vacunación por sí mismo como un sitio de presentación antigénica, estimulando a los linfocitos T periféricos junto con las CPA residentes de la piel mediante el uso de adyuvantes (Aris et al., 2015; Hailemichael et al., 2013; Harris et al., 2012). De hecho, la inmunización con el modelo murino de la vacuna CD/Apo-Nec (Goldszmid et al., 2003) reveló la presencia de estructuras linfáticas terciarias en el sitio de inoculación, con formación de una pseudocápsula y reclutamiento de macrófagos, células polimorfonucleares y linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Mac Keon et al., 2010). *In vitro*, se ha observado que las células Apo-Nec pueden ser fagocitadas tanto por CD como por macrófagos y ambos son capaces de presentar el Ag MART-1 a células T CD8⁺ de igual manera (Barrio et al., 2012). Estas evidencias sugieren que el éxito terapéutico de la vacuna humana CD/Apo-Nec pueda ser el resultado del sinergismo de eventos que ocurren en la dermis luego de la vacunación y con las CD migrantes en los GL drenantes. Queda aún pendiente determinar la RI que induce la vacuna CD/Apo-Nec *in vivo* en un modelo apropiado. La aproximación con el modelo de ratones humanizados (Inoue et al., 2009) podría resultar útil para evaluar la capacidad de la vacuna de generar inmunidad anti-tumoral capaz de erradicar o cronificar el tumor (Graham et al., 2016; Spranger et al., 2012), junto con la utilización de adyuvantes locales que pueden influir en el destino y la potencia de la RI inducida (Dubensky and Reed, 2010).



CAPÍTULO III

**Interacción de la vacuna CD/Apo-Nec
con células T e inducción de una
respuesta anti-tumoral *in vitro***

En la última parte de esta tesis doctoral, se buscó caracterizar en profundidad el perfil inmunoestimulador de la vacuna y su capacidad de inducir una respuesta celular específica contra células de melanoma. En capítulos previos se han caracterizado las células Apo-Nec como fuente de Ag, el cargado y la maduración de las CD en el co-cultivo de la vacuna en combinación con el CC y la capacidad migratoria resultante. Aquí, por un lado, se hace foco en la expresión de moléculas involucradas en la sinapsis inmunológica y en las citoquinas secretadas por las CD. Por otro, se describe en detalle la capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de activar un clon de células T CD8⁺ para el Ag MART-1, específico para el nonapéptido AAGIGILTV restringido al haplotipo HLA-A*0201 (Yee et al., 2002), en función del cargado antigénico, el grado de maduración de la vacuna y la evolución de la presentación cruzada a lo largo del tiempo. En último término, mostramos a modo descriptivo la capacidad de la vacuna CD/Apo-Nec de inducir una respuesta anti-tumoral sobre linfocitos *naïve*, evaluada en muestras de PBMC provenientes de 2 donantes sanos. Con este objetivo, se utilizó un sistema autólogo de estimulaciones *in vitro* de PBMC con la vacuna (Schnurr et al., 2001). Se describió la activación de los linfocitos estimulados mediante la expresión de diferentes moléculas de superficie y el perfil de respuesta según las citoquinas secretadas, parámetros analizados en ambos donantes. La capacidad proliferativa y citotóxica frente a células de melanoma viables, se analizó sólo en el caso del donante de haplotipo HLA-A*0201. Dado el escaso número de muestras analizadas, estos datos sobre la generación de una respuesta anti-tumoral deben ser considerados preliminares.

En cuanto a las características de las CD de la vacuna, ya se había demostrado que la utilización del CC en el co-cultivo inducía un aumento significativo en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86, que brindan la señal 2, indispensable luego de la interacción de los complejos HLA/Ag con el TCR específico para iniciar una respuesta por parte del linfocito T (Banchereau and Steinman, 1998; Frankenberger and Schendel, 2012). El proceso de maduración de las CD, que las transforma en CPA completamente competentes, involucra la regulación positiva de la expresión de CD40 en la superficie. La vacuna madurada con el CC incrementó significativamente los niveles de CD40. Esto implica una sensibilización de la vacuna CD/Apo-Nec para su activación por CD40L. La interacción CD40/CD40L juega un rol crucial en la iniciación de la mayoría de las RI celulares. La activación vía CD40 induce el aumento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y la liberación de citoquinas inflamatorias en CD y macrófagos, como la IL-12, TNF e IL-1 (Mackey et al., 1998). El aumento de CD40 en las CD lo registramos principalmente por el agregado del CC a la vacuna

CD/Apo-Nec, sin mayores variaciones al combinarlo con los otros adyuvantes ensayados. Además, se detectó un aumento en la expresión de ICOS-L en las CD de la vacuna madurada con CC, otra molécula necesaria para la activación de una respuesta anti-tumoral en los linfocitos (Fu et al., 2011).

La utilización del CC durante la preparación de la vacuna induce un aumento en la secreción de IL-12p70 al medio de cultivo. Para este factor, se observó un efecto aditivo del estímulo generado por las Apo-Nec y el CC sobre las CD, ya que es significativamente mayor en la vacuna que en el control de maduración de las CD, sólo con el CC. Los niveles de secreción de IL-12p70 en las primeras 48 h de cultivo son modestos, con valores menores a los $100\text{pg}/10^6$ de CD, si bien las CD quedan sensibilizadas para ser activadas por CD40L en su interacción con los linfocitos T, en cuyo caso podrían producir mayores niveles de IL-12 (Mackey et al., 1998). Los reportes de una mayor liberación de IL-12 usando otros factores madurativos, como IFN- γ (Dohnal et al., 2007) o poly(I:C) (Mailliard et al., 2004), se han asociado a altos niveles de IL-10 (Zobywalski et al., 2007). En nuestro modelo, la secreción de IL-10 aumenta con el uso del CC pero en nivel absoluto bajo, comparado con otros estímulos, como el LPS. Sumado a este perfil, la vacuna CD/Apo-Nec expresa poco PD-L1, aunque esta molécula puede ser fuertemente inducida en las CD luego de la activación por IFN- γ . Un 15 % de las células Mel-XY3 viables expresan este ligando en la superficie, que sufre un aumento luego de la irradiación. Este incremento podría corresponder a la detección del contenido intracitoplasmático de las células, que presentan pérdida de la integridad de membrana durante el proceso de muerte celular. De cualquier manera, este hecho no tendría un efecto negativo real de la vacuna sobre posibles linfocitos reactivos ya que, por un lado, la proporción de Apo-Nec remanente en la formulación de la vacuna no supera el 15 % y, por otro, estas células luego de 48 h carecen de complejos HLA-I, de manera que no podrían presentar Ag de manera directa a los linfocitos T.

Cabe mencionar nuevamente que la rápida adquisición de un fuerte perfil de diferenciación a CD maduras en la vacuna preparada con CC no afecta la fagocitosis y procesamiento de Ag tumorales como MART-1, provenientes de la captura de las células Apo-Nec en el co-cultivo. Los Ag no sólo son capturados y procesados, sino que también son cargados y presentados de manera eficiente a células T CD8⁺. Esta activación específica de los clones T CD8⁺ generada por la vacuna, que no resulta por estimulación directa por las células Apo-Nec, que poseen el Ag MART-1 pero carecen de HLA-I, corrobora los resultados previos (von Euw et al., 2007), paralelamente a la robusta estimulación alogeneica observada en la

vacuna madurada con el CC. Por lo tanto, la utilización del CC en el modelo de la vacuna humana CD/Apo-Nec preserva el equilibrio requerido para generar una RI anti-tumoral específica (Delamarre et al., 2005b; Savina and Amigorena, 2007), con un perfil que favorecería una estimulación de células T con un perfil de respuesta Th1.

Mediante la estimulación del clon de células T CD8⁺ M26, que reconoce específicamente al Ag MART-1, se pudieron evaluar otros parámetros de la preparación del co-cultivo CD/Apo-Nec, en función de la capacidad de procesamiento y la presentación antigénica por parte de las CD. Las CD co-cultivadas con células Apo-Nec son capaces de activar células T CD8⁺ específicas a partir de las tres horas de co-cultivo, incrementando dicha capacidad hacia las 48 h. La magnitud de la respuesta del clon M26 a ese tiempo no varía con el aumento de la proporción de células Apo-Nec en el cultivo. La preparación de un lisado de las células Apo-Nec, ofrecido a las CD como fuente de Ag para su cargado, generó una menor respuesta del clon M26 frente a la presentación del epítopo específico de MART-1, comparada con el co-cultivo de las CD con las Apo-Nec como fuente de Ag particulada. Esto puede deberse al formato del Ag y su vía de captación por parte de las CD, o bien a que el método de lisis no permite una extracción adecuada del Ag hidrofóbico no soluble, asociado a membranas internas (De Mazière et al., 2002), generando una baja en la cantidad de la proteína MART-1 ofrecida a las CD. La maduración de la vacuna con el CC durante 48 h no disminuye su capacidad de activar al clon M26, a través de la presentación del Ag MART-1, independientemente de la relación de las células Apo-Nec que conformaban el co-cultivo. No obstante, en el caso de la utilización del lisado de las células Apo-Nec, la maduración del cultivo con el CC es capaz de aumentar este proceso a un nivel de activación similar al obtenido con las células Apo-Nec particuladas. La cantidad y la forma en que el Ag MART-1 es ofrecido durante el co-cultivo de la vacuna CD/Apo-Nec es suficiente y necesaria para una presentación cruzada efectiva a un clon T CD8⁺ específico.

Las CD de la vacuna conservan la capacidad de estimular a las células T CD8⁺ a lo largo del tiempo, evaluada durante varios días después del comienzo del co-cultivo, en un período total de 7 días. El nivel de estimulación de la vacuna CD/Apo-Nec alcanzado a las 48 h aumenta ligeramente hacia las 72 h y se mantiene constante a lo largo de los días, mientras que con la maduración con CC el máximo es alcanzado a las 48 h y es igualmente mantenido hasta el séptimo día de evaluación. De acuerdo a estos resultados, en ambos casos, los Ag ofrecidos en el co-cultivo CD/Apo-Nec son internalizados y permanecen retenidos dentro de las CD por largos períodos de tiempo, probablemente consecuencia de una degradación lenta,

característica que las convierte en CPA profesionales (Delamarre et al., 2005a). En la CD/Apo-Nec, por microscopía confocal se pudo detectar el Ag MART-1 localizado dentro de las CD luego de 48 h de co-cultivo con las células Apo-Nec. El hecho de que se pueda recuperar material de células apoptóticas retenido en CD migratorias *in vivo* apoya la evidencia de la limitada capacidad de proteólisis lisosomal (Iyoda et al., 2002). Esto permite la presentación antigénica no inmediata de los Ag retenidos dentro de las CD una vez que éstas migran al GL, un proceso lento que puede extenderse algunos días en total, como fue mostrado anteriormente (Cella et al., 1997; Pierre et al., 1997).

Actualmente, la vacunación terapéutica está diseñada para ser un tratamiento adyuvante para pacientes con baja carga tumoral y alto riesgo de recurrencia, aunque también se utiliza como alternativa terapéutica en estadios avanzados de la enfermedad (Kantoff et al., 2010). La eficacia de la terapia anti-tumoral en estos pacientes depende principalmente de cuatro componentes críticos: la generación de células Teff CD8⁺, la calidad de las células Th CD4⁺, la eliminación y/o la neutralización de los Treg y la disrupción del microambiente tumoral inmunosupresor (Fernández et al., 2014; Le and Jaffee, 2012; Palucka et al., 2010b; Topalian et al., 2015). Las diversas inmunoterapias apuntan a generar nuevos clones reactivos contra TAA o neo-antígenos (Carreno et al., 2015; Rooney et al., 2015) o bien recuperar aquellos que presentan un fenotipo exhausto (Speiser et al., 2014; Utzschneider et al., 2013), hasta ahora considerada una diferenciación terminal inactiva. La activación de clones T específicos *in vitro* resulta un buen parámetro para caracterizar la capacidad de procesamiento y presentación Ag-específica de las CD y por ende, de la respuesta específica que pueden generar. Sin embargo, representa una situación muy artificial a la hora de proyectar la respuesta anti-tumoral que puedan inducir las vacunas basadas en CD en el paciente.

La estimulación *in vitro* de linfocitos *naïve* en un sistema autólogo resulta una buena aproximación a la respuesta que pueden generar *in vivo* estas vacunas sobre los linfocitos del paciente, así como la actividad anti-tumoral que puedan inducir (Schnurr et al., 2001). En nuestro modelo, caracterizamos la respuesta de PBMC provenientes de dos donantes sanos, uno de ellos de haplotipo HLA-A*0201, sometidos a un esquema semanal de estimulación *in vitro* con vacunas CD/Apo-Nec autólogas. A lo largo de las estimulaciones, los PBMC de ambos dadores muestran una tendencia al aumento de la expresión de marcadores de activación, como CD25, CD69 e ICOS, con producción de principalmente de IFN- γ y en menor medida de TNF. La activación comienza a regularse mediante Treg y la expresión de PD-1, que se correlaciona con una tendencia al aumento de IL-10 hacia el final del esquema de

estimulaciones, luego de 4 semanas. En todos los casos la tendencia fue más marcada en el tratamiento con la vacuna madurada con el CC. Estos datos preliminares indican que la vacuna CD/Apo-Nec sería capaz de interactuar con los linfocitos *naïve* autólogos y activarlos durante un período prolongado de tiempo antes de mostrar un fenotipo exhausto y que induzcan células regulatorias. En vacunaciones con péptidos para lesiones asociadas al HPV16, una alta relación de células Teff frente a células Treg Ag-específicos resultó ser predictiva del beneficio clínico de las vacunaciones, así como un perfil inmune *Th1* está asociado a las respuestas clínicas favorables cuando las lesiones son más pequeñas (Welters et al., 2010). Las vacunas basadas en CD cargadas con mezclas complejas de Ag, ya sean lisados tumorales o células irradiadas han demostrado generar respuestas anti-tumorales específicas y algunas respuestas positivas en ensayos clínicos, con bajos efectos secundarios tóxicos, impactando en la supervivencia total, entre las cuales se encuentra la vacuna CD/Apo-Nec (Cornforth et al., 2011; von Eeuw et al., 2008; Palucka et al., 2006; Reyes et al., 2013). Sin embargo, en el sistema de estimulación *in vitro* con la vacuna CD/Apo-Nec no se pudieron detectar cambios relevantes en las poblaciones de linfocitos de memoria, aunque por limitaciones técnicas se evaluaron pocos marcadores específicos.

Los linfocitos estimulados con vacunas CD/Apo-Nec son capaces de proliferar de manera específica en cultivo frente a un nuevo estímulo presentado por CD. En el caso de los PBMC HLA-A*0201 se vio una respuesta proliferativa específica frente a células de melanoma viables. Estos PBMC ‘educados’ por la vacuna CD/Apo-Nec muestran además actividad citotóxica específica frente a las células tumorales. Esta respuesta anti-tumoral de los linfocitos inducida *in vitro* fue notablemente mayor cuando éstos fueron previamente estimulados con la vacuna CD/Apo-Nec madurada con CC. La mera determinación de la frecuencia de las células T CD8⁺ específicas que se generan o que secretan IFN- γ resulta insuficiente para evaluar la inmunidad generada por las vacunas (Palucka et al., 2010b). En los pacientes con cáncer, la localización de los linfocitos efectores tiene alto impacto sobre su fenotipo y función (Gajewski et al., 2013; Rocca et al., 2013). Las células Teff CD8⁺ que infiltran los tumores de melanoma expresan niveles más altos de PD-1 y CTLA-4 que sus contrapartes en tejidos normales y en circulación (Ahmadzadeh et al., 2009), sumado al microambiente tumoral inmunosupresor (Vasaturo et al., 2013), que neutraliza las células T específicas contra el tumor. En algunos pacientes, las MDSC y los Treg se encuentran aumentados no sólo en el microambiente tumoral, sino que también en GL con presencia de metástasis y en la circulación (Idorn et al., 2014; Vence et al., 2007). Todas estas características dificultan la eficiencia de la vacunación

con CD, así como el desarrollo de un modelo *in vitro* o incluso *in vivo*, adecuado para su estudio.

Junto con las células Teff CD8⁺, los linfocitos T CD4⁺ tienen gran influencia en la respuesta anti-tumoral generada. En el modelo de la vacuna CD/Apo-Nec, la utilización de una fuente de Ag particulada, que resulta fagocitada por las CD y que les ofrece proteínas y péptidos completos, permite generar epitopes de un mismo Ag que pueden ser presentados en el contexto del HLA-II, por la vía exógena de procesamiento antigénico, o por HLA-I, a través de la presentación cruzada. Se ha observado que la incorporación de epitopes no relacionados para células T CD4⁺ reconstituye la función *helper* anti-tumoral específica, reactivando células T CD8⁺ Ag-específica latentes y de clones de células B, generando una inmunidad anti-tumoral duradera (Snook et al., 2014). En pacientes con melanoma, la co-activación Ag-específica de células T CD4⁺ con CD cargadas con péptidos para HLA-I/II aumenta las respuestas de células T CD8⁺, que contribuyen a mejores respuestas clínicas (Aarntzen et al., 2013a). Las células T CD4⁺ han probado ser críticas en las etapas iniciales de la RI, colaborando en reducir el agotamiento de las células T CD8⁺ a través de la disminución de la expresión del receptor PD-1 (Church et al., 2014).

Las CD cargadas con células apoptóticas inducen la proliferación de linfocitos T CD4⁺ que, en combinación con adyuvantes que activen fuertemente vías de PAMP/DAMP, superan su perfil inmunosupresor a través de la diferenciación a células Th17 y generan respuestas autólogas (Valente et al., 2014). Sin embargo, cuando se vacuna en presencia de tumor en el organismo, la activación de células T *naïve* se ve inhibida debido a una pequeña pero distintiva población de linfocitos T CD4⁺ generados en los GL drenantes del tumor y redistribuidos de manera sistémica. Este efecto puede ser revertido mediante el aumento de las CD inoculadas en la vacunación (Schiering et al., 2010). Todo este panorama apunta a la necesidad de un abordaje conjunto, no sólo enfocándose en la estimulación y expansión de las células Teff CD8⁺, sino también de las células T CD4⁺, que favorecen el desarrollo de una respuesta efectiva anti-tumoral luego de la vacunación con CD, en combinación con adyuvantes inmunoestimulantes. El uso de diferentes adyuvantes puede determinar el perfil de respuesta Th así como la generación de MDSC y Treg (Dang et al., 2012; Perret et al., 2013). Nuestra vacuna CD/Apo-Nec tendría la capacidad de presentar Ag a ambos subtipos efectores, basados en la fuente de Ag utilizada y los cambios observados en el patrón de liberación de citoquinas de los linfocitos *naïve* estimulados *in vitro*. No obstante, quedaría pendiente analizar en más profundidad esta respuesta.



CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El diseño de las vacunas terapéuticas requiere de un mejor entendimiento de las interacciones entre el SI y las células tumorales, para poder generar un tratamiento inmunogénico que sea capaz de superar la tolerancia inmune local y sistémica y logre montar una RI anti-tumoral efectiva. Hasta ahora, sólo se han conseguido efectos modestos, con tasas de respuestas clínicas objetivas de menos del 7% y con tasas globales de beneficio clínico de sólo el 20% (Romero et al., 2016). Existen múltiples parámetros a considerar durante la formulación de las vacunas, que impactan directamente sobre la RI generada y el resultado clínico final. Entre ellos, se encuentran el tipo y la cantidad de Ag provisto, la vía de administración y la combinación con factores inmunoestimulatorios, que logren establecer finalmente una respuesta *in vivo* capaz de controlar el tumor. Al día de hoy, no existe un consenso sobre ‘*la receta*’ para generar vacunas basadas en CD que puedan proveer un óptimo desempeño en términos del control de la enfermedad. En las últimas décadas, se ha ampliado el conocimiento de la biología de las CD y los mecanismos críticos involucrados en la activación inmune, lo que ha permitido un avance en el diseño de vacunas anti-tumorales y su posicionamiento como estrategia terapéutica en el tratamiento del cáncer (Pizzurro and Barrio, 2015).

El objetivo principal de esta tesis doctoral comprendía la caracterización y optimización de la vacuna CD/Apo-Nec como tratamiento del melanoma humano, ya evaluada en un ensayo clínico de Fase I, de manera tal de lograr un mejor desempeño funcional, que pudiera traducirse eventualmente en respuestas anti-tumorales efectivas en pacientes con melanoma. Este modelo está constituido por células de melanoma alogeneicas, inactivadas mediante radiación- γ (células Apo-Nec), utilizadas para realizar el cargado antigénico *ex vivo* de CD derivadas de monocitos, obteniendo así la vacuna CD/Apo-Nec. Las CD deben capturar y procesar los Ags tumorales, responder a los gradientes quimiotácticos y tener la capacidad migratoria que le permita alcanzar las zonas específicas de los GL drenantes, donde presenten esos Ags a linfocitos *naïve* CD4⁺ y CD8⁺, para iniciar finalmente una inmunidad celular y humoral anti-tumoral (O’Neill et al., 2004).

Cuando se producen vacunas celulares que tienen la capacidad de modular el SI existen dos cuestiones principales que se deben tener en cuenta: su seguridad y su eficacia. En cuanto a la seguridad, el método de preparación de las células Apo-Nec ha probado ser efectivo, aboliendo la capacidad replicativa de las células que la componen, y seguro en su aplicación

en pacientes (Barrio et al., 2006), así como para el cargado de CD derivadas de monocitos utilizada como vacuna (von Euw et al., 2008). Aquí se ha profundizado el análisis de los cambios que se producen en las células de melanoma luego de la radiación- γ en alta dosis, considerando esas características, al momento de ser enfrentadas a las CD, como fuente de Ag. Se ha descripto y analizado la inducción de importantes cambios en la composición lipídica de las células de melanoma, consecuencia de la irradiación ionizante. En ellas, se produce un incremento inmediato y transitorio en la cantidad, tamaño y composición bioquímica relativa de los LB citoplasmáticos. En el co-cultivo de la vacuna, también se produce un aumento significativo de los LB en las CD, como consecuencia principal de la maduración y el proceso fagocítico de la fuente de Ag. No hay una transferencia directa de LB significativa a las CD por parte de las células Apo-Nec. Este aumento de lípidos en las CD no afecta su capacidad de capturar Ags tumorales, procesarlos y presentarlos a células T CD8⁺, así como tampoco su capacidad estimuladora alogeneica, en condiciones óptimas de maduración.

En cuanto a la eficacia, se han mejorado múltiples parámetros funcionales de las CD de la vacuna CD/Apo-nec, mediante la utilización de citoquinas pro-inflamatorias *in vitro*, durante la preparación de la vacuna, y del adyuvante Imiquimod *in vivo*. Con la utilización del CC, logramos modular de manera óptima el delicado balance funcional de la CD *in vitro*, manteniendo la fagocitosis y cargado antigénico, mientras se obtiene una vacuna con alto grado de maduración y un perfil inflamatorio. Luego de su administración subcutánea en forma conjunta con Imiquimod tópico, la vacuna CD/Apo-Nec es capaz de migrar y distribuirse entre múltiples GL drenantes, de manera rápida y prolongada en el tiempo. La proporción de células migrantes se encuentra dentro del rango descripto actualmente para este tipo de vacunas. *In vitro*, la vacuna CD/Apo-Nec con altos niveles de maduración presenta Ags tumorales a linfocitos T CD8⁺ específicos, desde las tres horas hasta una semana después de iniciado el co-cultivo. Los resultados preliminares de la estimulación autóloga *in vitro* de linfocitos *naïve* con la vacuna mostraron activación de células T, con un perfil *Th1* y actividad anti-tumoral específica. Las características logradas sugieren que esta vacuna podría iniciar una RI eficiente, que conlleve a un mejor rendimiento terapéutico. Estos resultados constituyen una evidencia sólida y prometedora, que apoya la utilización del modelo de la vacuna CD/Apo-Nec, en combinación con el CC y el Imiquimod como adyuvante local, para el tratamiento del melanoma.

A través de la historia, se ha comprobado que la vacunación efectiva contra distintas afecciones conlleva beneficios para la salud humana así como también para la economía. En

el futuro cercano, la investigación en inmunología tumoral enfrenta el desafío de integrar todo el conocimiento existente y los avances realizados para un diseño racional de tratamientos inmunoterapéuticos eficientes, que permitan alcanzar respuestas clínicas a largo plazo. En este tema, referentes internacionales del área de la inmunología y la inmunoterapia han comenzado a desarrollar el Proyecto Vacunas Humanas (Koff et al., 2014). Actualmente, el Proyecto está establecido como una asociación pública-privada sin fines de lucro cuya misión es acelerar el desarrollo de vacunas e inmunoterapias contra los más importantes tumores y enfermedades infecciosas a nivel global, a través de la decodificación del SI humano (Romero et al., 2016). Los objetivos principales comprenden: (i) descifrar el inmunoma humano, comprendido por los repertorios de células *naïve* y de la respuesta adaptativa en poblaciones genéticamente heterogéneas, así como el anti-genoma humano, representado por los *targets* del SI en las células infectadas o neoplásicas; (ii) elucidar los principios o las ‘reglas’ de la inmunogenicidad, que permitan determinar cómo generar RI clínicamente efectivas y duraderas; e (iii) identificar las estrategias de vacunación que generen y mantengan respuestas de células Teff en el contexto de una alta y persistente carga tumoral (Romero et al., 2016).

Por un lado, los avances en la descripción de Ag, los análisis genómicos y el monitoreo inmunológico ofrecen un potencial enorme para revolucionar el desarrollo de vacunas e inmunoterapias efectivas en un futuro cercano. Los ensayos clínicos necesarios para evaluar la efectividad de las inmunoterapias son extremadamente costosos y resulta virtualmente inviable probar todas las combinaciones y esquemas posibles de tratamiento para cada patología. En la actualidad, al momento de diseñar la base lógica de una vacuna terapéutica, se cuenta con el acceso a tecnología y conocimientos de biología de sistemas, biología computacional y estructural y otras herramientas informáticas que se han ido desarrollando para abordar diferentes aspectos a considerar en las terapias. Estas estrategias se suman al análisis experimental mediante los métodos tradicionales, basados en los datos de modelos preclínicos y clínicos relacionados.

Así es que, en los últimos años, el análisis de la inmunogenicidad de los neo-antígenos, que surgen de las frecuentes mutaciones que se dan en las células tumorales (Castle et al., 2012), ha reabierto el debate sobre la vacunación personalizada, autóloga y multiantigénica. Se han ido desarrollando técnicas complejas que permiten definir y anticipar aquellos Ag que puedan inducir una RI más robusta. Actualmente, se puede analizar y calcular la carga mutacional del paciente y de esa manera ayudar a decidir cuál sería la terapia más adecuada basada en esa información. Se han desarrollado técnicas que permiten predecir cuáles de las

mutaciones presentes en un tumor pueden resultar inmunogénicas en un paciente dado, combinando la espectrometría de masa y el análisis genómico, mediante la secuenciación completa de exones (Yadav et al., 2014). O bien, el análisis de paneles de expresión génica del tumor más reducidos y el uso de algoritmos permiten correlacionar los datos con el posible éxito de distintas inmunoterapias, mediante un análisis de menor complejidad que la secuenciación de genomas enteros (análisis de perfil respondedor) (Roszik et al., 2016). Esto se suma a las herramientas informáticas que nos permiten analizar grandes volúmenes de datos provenientes de la secuenciación completa de grupos de los TCR (Bolotin et al., 2013) y a aquellas para predecir la asociación de estos neo-epitopes que surgen en los tumores a los complejos de HLA y su posible inmunogenicidad, dada por su interacción putativa con los TCR (Fritsch et al., 2014). Estas tecnologías han ampliado el panorama sobre los neo-antígenos como biomarcadores para las inmunoterapias en cáncer y han sido el incentivo para el desarrollo de abordajes terapéuticos que apunten selectivamente a las respuestas anti-tumorales que se pueden generar *in vivo* (Schumacher and Schreiber, 2015). Los datos recientes sobre el éxito de vacunas con CD cargadas con células autólogas para melanoma, principalmente en estadios avanzados, enfatizan la importancia de las características propias de la fuente de Ag sobre la RI generada (Carreno et al., 2015; Dillman et al., 2012).

En nuestro laboratorio, ya se ha comenzado con el análisis de mutaciones somáticas, a través de una secuenciación exómica completa, y de la expresión génica, por RNAseq, de las líneas celulares de melanoma utilizadas para generar las células Apo-Nec para la elaboración de las vacunas VACCIMEL y CD/Apo-Nec. Con estos métodos se busca encontrar posibles neo-antígenos presentes en el inmunógeno en común, así como también secuenciando los TCR presentes en la sangre y el tumor de aquellos pacientes respondedores luego de la vacunación con la formulación celular CSF-470. Esta última estrategia va a permitir detectar linfocitos reactivos contra Ag específicos de la vacuna y contra neo-epitopes propios de cada tumor. La hipótesis principal de nuestros modelos de vacuna es que se induzca una respuesta citotóxica a través de Ag compartidos entre las células tumorales del paciente y las células alogeneicas utilizadas para la inmunización. La primera acción efectora estimulada por la vacuna puede mediar una lisis tumoral a través de los Ag compartidos, que produzca a su vez una liberación de Ag propios. Esta nueva fuente de Ag podría ser capturada y presentada por CD, generando un nuevo repertorio más amplio de células Teff, específicas contra neo-Ag propios del tumor, fenómeno denominado diseminación antigénica o de epitopes (*epitope spreading*, en inglés), que ha probado ser efectivo en la regresión tumoral, incluso en estadios avanzados (Carreno et

al., 2015; Corbière et al., 2011). La vacuna CD/Apo-Nec, que se prepara con una fuente de Ag alogeneica, podría inducir este mecanismo en los pacientes pudiendo retardar o evitar la aparición de metástasis (von Euw et al., 2008). Los resultados de estos análisis en curso contribuirán a conocer en detalle la carga antigénica presente en las células Apo-Nec y nos permitirían definir posibles biomarcadores de respuesta para realizar el inmunomonitorio de los pacientes e identificar blancos antigénicos para la generación de terapias personalizadas, con CD autólogas cargadas con péptidos que contengan neo-Ag.

Además de los Ag proteicos, el incremento del contenido lipídico en las células de melanoma, inducido por la radiación- γ , brinda una nueva fuente de posibles Ag que puedan ser reconocidos por células del SI y contribuir a la respuesta anti-tumoral. Se ha asociado a los glicosfingolípidos con la protección contra tumores de melanoma en un modelo murino (Kobayashi et al., 1995). El reconocimiento de los glicosfingolípidos está mediado principalmente por células NKT invariantes, con efectos anti-tumorales a través de su actividad citotóxica y liberación de citoquinas como IFN- γ e IL-12. Además de interferir con el crecimiento tumoral, los NKT pueden actuar indirectamente, eliminando macrófagos asociados al tumor (Dowds et al., 2014). A pesar de la optimización general de múltiples parámetros funcionales del modelo de la vacuna CD/Apo-Nec por medio de la combinación de adyuvantes *in vitro* e *in vivo*, estos resultados deben ser validados generando CD provenientes de pacientes, ya que son éstos quienes pueden presentar disfunciones inmunes, que deben ser revertidas (Cao et al., 2014; Herber et al., 2010). Muchas veces, estos cambios representan algunas de las limitaciones encontradas al momento de trasladar a la clínica los avances logrados en la investigación a nivel pre-clínico. Sin embargo, resulta necesario desarrollar y caracterizar estas terapias en el contexto de un SI 'normal', que permita tener un panorama claro del rango de variabilidad entre individuos, dado por múltiples factores ambientales sumados a los heredables (Brodin et al., 2015). Esto permite establecer las características inmunes de base, para poder luego evaluar y comparar la RI generada por las terapias en los pacientes con cáncer (Romero et al., 2016).

Al igual que los experimentos *in vitro*, los modelos animales de genética homogénea han tenido una capacidad predictiva limitada sobre el éxito de las terapias en poblaciones tumorales humanas por demás heterogéneas. A pesar de esto, los modelos murinos siguen siendo una herramienta útil y muy utilizada, con algunos resultados validados en la clínica (Graham et al., 2016; Mitchell et al., 2015; Spranger et al., 2012). No obstante, han aparecido nuevas metodologías que comienzan a reemplazar, o por lo menos a complementar, la

experimentación *in vivo* en animales de laboratorio para el desarrollo de terapias anti-tumorales. Existen algoritmos matemáticos, validados con los resultados clínicos previos, que permiten modelar *in silico* las inmunoterapias y de esa manera poder evaluar posibles combinaciones de tratamientos y poder predecir su efectividad clínica (Davies et al., 2017; Depillis et al., 2013). Estos sistemas reducen elementos complejos, como el efecto de los tratamientos, la RI y los aportes parciales de las terapias combinatorias, a unas pocas ecuaciones matemáticas (Serre et al., 2016).

La presente tesis doctoral se centró en la optimización del diseño de la vacuna CD/Apo-Nec, compuesta por CD y células tumorales enteras irradiadas como fuente de Ag. Los resultados obtenidos representan un aporte dentro de este panorama general en busca de terapias clínicamente efectivas para el tratamiento del cáncer. Los estudios previos *in vitro* de la vacuna CD/Apo-Nec mostraban que las células Apo-Nec inducían una maduración moderada, comparada con el estímulo del LPS. La vacuna presentaba cierta capacidad de respuesta quimiotáctica frente a CCL19 y capacidad de estimular células CD8⁺ específica. En el ensayo clínico de Fase I de la vacuna, se vio que las CD de los pacientes tenían un desempeño *in vitro* similar a las de los donantes sanos y se pudieron determinar respuestas anti-tumorales específicas. Aquí, se ha realizado un análisis del contenido celular de la fuente de Ag, consecuencia de la radiación- γ , y la optimización de la obtención de una vacuna con CD cargadas con Ag tumorales, con un perfil inflamatorio y capacidad estimuladora. Al producirla en presencia de citoquinas y combinarla con la aplicación de adyuvantes locales, se obtiene una vacuna con un fenotipo más maduro, que mejora su migración a los GL y es capaz de estimular eficientemente células T e inducir respuestas anti-tumorales específicas. En estas condiciones, se mejoró la maduración de la vacuna, asegurando la inducción de una respuesta activadora frente al encuentro con los linfocitos. La caracterización de la migración *in vivo* permitió conocer información sobre la cinética de la llegada de la vacuna a los GL y los factores que favorecerían este proceso, como la actividad de la metaloproteasa MMP-9. La permanencia de las células de la vacuna en el GL por varios días permitiría múltiples rondas de interacción con linfocitos *naïve*, facilitando la activación de clones específicos. Esto se comenzó a determinar *in vitro* con un sistema autólogo, generando linfocitos con propiedades citotóxicas frente a células de melanoma. Teniendo en cuenta lo observado en el ensayo clínico de Fase I y los resultados obtenidos en la presente tesis, se puede proyectar que la vacuna CD/Apo-Nec, preparada con el CC y administrada en forma conjunta con la aplicación tópica de Imiquimod, tendría una mejor respuesta clínica en los pacientes, apoyando una futura evaluación clínica de

este esquema de combinación. En un modelo humano, también se podría agregar el efecto inmunomodulador de la BCG sobre las células inmunes residentes, así como la combinación con GM-CSF para favorecer el reclutamiento de CD *in situ*. Estos hallazgos permiten avanzar con el estudio de la vacuna CD/Apo-Nec, modelo que ha probado ser clínicamente seguro, como terapia adyuvante para el melanoma y potencialmente combinable con otros tratamientos.

Cabe destacar que el efecto anti-tumoral de la inmunoterapia puede mejorar sustancialmente con la combinación de tratamientos, dado que esto permite el contraataque simultáneo sobre múltiples mecanismos de evasión tumoral (Moynihan et al., 2016). La caracterización del microambiente tumoral de los pacientes ha revelado distintos fenotipos inmunológicos basados en la presencia o ausencia de inflamación mediada por células T. La determinación de esta característica es necesaria para guiar las intervenciones inmunoterapéuticas (Gajewski et al., 2013; Kang et al., 2013; Vasaturo et al., 2013). Aunque muchas veces no es posible acceder a los eventos que ocurren en el microambiente tumoral o incluso resultan invisibles en las micrometástasis no detectadas. En la actualidad, todo apunta al uso de las vacunas en el marco adyuvante luego del tratamiento con las terapias estándar, usualmente una combinación de cirugía y radioterapia. Luego, se presenta la posibilidad de combinar el uso de las vacunas con inhibidores del control inmune, como los anticuerpos bloqueantes de CTLA-4 y el eje PD-1/PD-L1, y los efectos inmunogénicos de la quimio-radioterapia en baja dosis (Serre et al., 2016).

En conclusión, los aportes generados en esta tesis contribuyen a la caracterización y evaluación de la vacuna CD/Apo-Nec como inmunoterapia. No obstante, hay que continuar evaluando la eficiencia de la respuesta anti-tumoral que la vacuna CD/Apo-Nec pueda inducir, en combinación con los adyuvantes aquí ensayados. Esta tarea requerirá la utilización de los modelos animales pre-clínicos adecuados y las herramientas informáticas disponibles, que permitan generar un diseño racional de los esquemas de tratamiento del melanoma, que tenga finalmente un impacto en la salud y la calidad de vida de los pacientes.



BIBLIOGRAFÍA

- Aarntzen, E.H.J.G., De Vries, I.J.M., Lesterhuis, W.J., Schuurhuis, D., Jacobs, J.F.M., Bol, K., Schreiber, G., Mus, R., De Wilt, J.H.W., Haanen, J.B. a G., et al. (2013a). Targeting CD4(+) T-helper cells improves the induction of antitumor responses in dendritic cell-based vaccination. *Cancer Res.* 73, 19–29.
- Aarntzen, E.H.J.G., Srinivas, M., Bonetto, F., Cruz, L.J., Verdijk, P., Schreiber, G., van de Rakt, M.W.M.M., Lesterhuis, W.J., van Reil, M., Punt, C.J.A., et al. (2013b). Targeting of 111 In-Labeled Dendritic Cell Human Vaccines Improved by Reducing Number of Cells Targeting of 111 In-Labeled Dendritic Cell Human Vaccines Improved by Reducing Number of Cells. *Clin. Cancer Res.* 1525–1533.
- Abbas, A.K., and Lichtman, A.H. (2011). *Basic Immunology*.
- Accioly, M.T., Pacheco, P., Maya-Monteiro, C.M., Carrossini, N., Robbs, B.K., Oliveira, S.S., Kaufmann, C., Morgado-Diaz, J. a, Bozza, P.T., and Viola, J.P.B. (2008). Lipid bodies are reservoirs of cyclooxygenase-2 and sites of prostaglandin-E2 synthesis in colon cancer cells. *Cancer Res.* 68, 1732–1740.
- Aderem, A., and Ulevitch, R.J. (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787.
- Ahmadzadeh, M., Johnson, L. a, Heemskerk, B., Wunderlich, J.R., Dudley, M.E., White, D.E., and Rosenberg, S. a (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537–1544.
- Akbani, R., Akdemir, K.C., Aksoy, B.A., Albert, M., Ally, A., Amin, S.B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J.T., Ayala, B., et al. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 161, 1681–1696.
- Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S. a J.R., Behjati, S., Biankin, A. V, Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.
- Aloisi, J.D., Sherma, J., and Fried, B. (1990). Comparison of Mobile Phases for Separation and Quantification of Lipids by One-Dimensional TLC on Preadsorbent High Performance Silica Gel Plates. *J. Liq. Chromatogr.* 13, 3949–3961.
- Al-Saffar, N.M.S., Titley, J.C., Robertson, D., Clarke, P. a, Jackson, L.E., Leach, M.O., and Ronen, S.M. (2002). Apoptosis is associated with triacylglycerol accumulation in Jurkat T-cells. *Br. J. Cancer* 86, 963–970.
- Alters, S.E., Gadea, J.R., Holm, B., Lebkowski, J., and Philip, R. (1999). IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J. Immunother.* 22, 229–236.
- Alvarez, D., Vollmann, E.H., and von Andrian, U.H. (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity* 29, 325–342.
- Apostolopoulos, V., Thalhammer, T., Tzacos, A.G., and Stojanovska, L. (2013). Targeting Antigens to Dendritic Cell Receptors for Vaccine Development. *J. Drug Deliv.* 2013, 869718.
- Aris, M., Bravo, A.I., Barrio, M.M., and Mordoh, J. (2015). Inoculation site from a cutaneous melanoma patient treated with an allogeneic therapeutic vaccine: A case report. *Front. Immunol.* 6, 1–5.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245–252.
- Barrio, M.M., de Motta, P.T., Kaplan, J., von Euw, E.M., Bravo, A.I., Chacón, R.D., and Mordoh, J. (2006). A Phase I Study of an Allogeneic Cell Vaccine (VACCIMEL) with GM-CSF in Melanoma Patients. *J. Immunother.* 29, 444–454.
- Barrio, M.M., Abes, R., Colombo, M., Pizzurro, G., Boix, C., Roberti, M.P., Gélizé, E., Rodríguez-Zubieta, M., Mordoh, J., and Teillaud, J.L. (2012). Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8+ t cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One* 7.
- Baskar, R., Dai, J., Wenlong, N., Yeo, R., and Yeoh, K.-W. (2014). Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Front. Mol. Biosci.* 1, 24.
- Basler, M., Kirk, C.J., and Groettrup, M. (2013). The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 74–80.
- Benhar, I., London, A., and Schwartz, M. (2012). The privileged immunity of immune privileged organs: The case of the eye. *Front. Immunol.* 3, 1–6.
- Bobanga, I.D., Petrosiute, A., and Huang, A.Y. (2013). Chemokines as Cancer Vaccine Adjuvants. *Vaccines (Basel)* 1, 444–462.
- Boehm, T. (2012). Evolution of vertebrate immunity. *Curr. Biol.* 22, R722–R732.
- Boissonnas, A., Scholer-dahirel, A., Simon-blancal, V., Pace, L., Valet, F., Kissenpfennig, A., Sparwasser, T., Malissen, B., Fetler, L., and Amigorena, S. (2010). Foxp3+ T Cells Induce Perforin-Dependent Dendritic Cell Death in Tumor-Draining Lymph Nodes. *Immunity* 32, 266–278.
- Bolotin, D. a, Shugay, M., Mamedov, I.Z., Putintseva, E. V, Turchaninova, M. a, Zvyagin, I. V, Britanova, O. V, and Chudakov, D.M. (2013). MiTCR: software for T-cell receptor sequencing data analysis. *Nat. Methods* 10, 813–814.
- Boltjes, A., and van Wijk, F. (2014). Human dendritic cell functional specialization in steady-state and inflammation. *Front. Immunol.* 5, 131.
- Boström, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J.,

- Nilsson, T., Borén, J., et al. (2007). SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity. *Nat. Cell Biol.* 9, 1286–1293.
- Bougnères, L., Helft, J., Tiwari, S., Vargas, P., Chang, B.H.-J., Chan, L., Campisi, L., Lauvau, G., Hugues, S., Kumar, P., et al. (2009). A role for lipid bodies in the cross-presentation of phagocytosed antigens by MHC class I in dendritic cells. *Immunity* 31, 232–244.
- Boullart, a C.I., Aarntzen, E.H.J.G., Verdijk, P., Jacobs, J.F.M., Schuurhuis, D.H., Benitez-Ribas, D., Schreibelt, G., van de Rakt, M.W.M.M., Scharenborg, N.M., de Boer, A., et al. (2008). Maturation of monocyte-derived dendritic cells with Toll-like receptor 3 and 7/8 ligands combined with prostaglandin E2 results in high interleukin-12 production and cell migration. *Cancer Immunol. Immunother.* 57, 1589–1597.
- Bouso, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8 + T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat. Immunol.* 4, 579–585.
- Bouvier, I., Jusforgues-Saklani, H., Lim, A., Lemaître, F., Lemerrier, B., Auriau, C., Nicola, M.-A., Leroy, S., Law, H.K., Bandeira, A., et al. (2011). Immunization route dictates cross-priming efficiency and impacts the optimal timing of adjuvant delivery. *Front. Immunol.* 2, 71.
- Bouwer, A.L., Saunderson, S.C., Caldwell, F.J., Damani, T.T., Pelham, S.J., Dunn, A.C., Jack, R.W., Stoitzner, P., and McLellan, A.D. (2014). NK cells are required for dendritic cell-based immunotherapy at the time of tumor challenge. *J. Immunol.* 192, 2514–2521.
- Bover, L., Barrio, M., Slavutsky, I., Bravo, A.I., Quintans, C., Bagnāti, A., Lema, B., Schiaffi, J., Yomha, R., and Mordoh, J. (1991). Description of a new human breast cancer cell line, IIB-BR-G, established from a primary undifferentiated tumor. *Breast Cancer Res. Treat.* 19, 47–56.
- Bozza, P.T., and Viola, J.P.B. (2010). Lipid droplets in inflammation and cancer. *Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids* 82, 243–250.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Bright, J.D., Schultz, H.N., Byrne, J.A., and Bright, R.K. (2013). Injection site and regulatory T cells influence durable vaccine-induced tumor immunity to an over-expressed self tumor associated antigen. *Oncoimmunology* 1–11.
- Brocard, E., Oizel, K., Lalier, L., Pecqueur, C., Paris, F., Vallette, F.M., and Oliver, L. (2015). Radiation-induced PGE2 sustains human glioma cells growth and survival through EGF signaling. *Oncotarget* 6, 6840–6849.
- Brodin, P., Jojic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C.J.L., Furman, D., Shen-Orr, S., Dekker, C.L., Swan, G.E., Butte, A.J., et al. (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* 160, 37–47.
- Van den Broeck, W., Derore, A., and Simoens, P. (2006). Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrI mice. *J. Immunol. Methods* 312, 12–19.
- Brunssen, A., Waldmann, A., Eisemann, N., and Katalinic, A. (2016). Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review. *J. Am. Dermatology*.
- Bürdek, M., Spranger, S., Wilde, S., Frankenberger, B., Schendel, D.J., and Geiger, C. (2010). Three-day dendritic cells for vaccine development: antigen uptake, processing and presentation. *J. Transl. Med.* 8, 90.
- Butterfield, L.H. (2013). Dendritic cells in cancer immunotherapy clinical trials: are we making progress? *Front. Immunol.* 4, 454.
- Byers, M. a., Calloway, P. a., Shannon, L., Cunningham, H.D., Smith, S., Li, F., Fassold, B.C., and Vines, C.M. (2008). Arrestin 3 Mediates Endocytosis of CCR7 following Ligation of CCL19 but Not CCL21. *J. Immunol.* 181, 4723–4732.
- Cambier, J.C., Gauld, S.B., Merrell, K.T., and Vilen, B.J. (2007). B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nat. Rev. Immunol.* 7, 633–643.
- Campbell, J.J., Bowman, E.P., Murphy, K., Youngman, K.R., Siani, M.A., Thompson, D.A., Wu, L., Zlotnik, A., and Butcher, E.C. (1998). 6-C-kine (SLC), a Lymphocyte Adhesion-triggering Chemokine Expressed by High Endothelium, Is an Agonist for the MIP-3^α Receptor CCR7. *J Cell Biol* 141, 1053–1059.
- Cao, W., Ramakrishnan, R., Tuyrin, V.A., Veglia, F., Condamine, T., Amoscato, A., Mohammadyani, D., Johnson, J.J., Zhang, L.M., Klein-Seetharaman, J., et al. (2014). Oxidized Lipids Block Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells in Cancer. *J. Immunol.* 192, 2920–2931.
- Cao, X., Sugita, M., van der Wel, N., Lai, J., Rogers, R.A., Peters, P.J., and Brenner, M.B. (2002). CD1 Molecules Efficiently Present Antigen in Immature Dendritic Cells and Traffic Independently of MHC Class II During Dendritic Cell Maturation. *J. Immunol.* 169, 4770–4777.
- Carbone, B.F.R., and Bevan, M.J. (1990). Class I-restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 171, 377–387.
- Carreno, B.M., Magrini, V., Becker-Hapak, M., Kaabinejadian, S., Hundal, J., Petti, A.A., Ly, A., Lie, W.R., Hildebrand, W.H., Mardis, E.R., et al. (2015). Cancer immunotherapy. A dendritic cell vaccine increases the breadth and diversity of melanoma neoantigen-specific T cells. *Science (80-.)*. 348, 803–808.

- Carsetti, R. (2000). The development of B cells in the bone marrow is controlled by the balance between cell-autonomous mechanisms and signals from the microenvironment. *J. Exp. Med.* *191*, 5–8.
- Castellino, F., Huang, A.Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R.N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naïve CD8 T cells to sites of CD4 T cell – dendritic cell interaction. *Nature* *440*, 890–895.
- Castle, J.C., Kreiter, S., Diekmann, J., Löwer, M., Van De Roemer, N., De Graaf, J., Selmi, A., Diken, M., Boegel, S., Paret, C., et al. (2012). Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Res.* *72*, 1081–1091.
- Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., and Lanzavecchia, A. (1997). Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* *388*, 782–787.
- Cerliani, J.P., Stowell, S.R., Mascanfroni, I.D., Arthur, C.M., Cummings, R.D., and Rabinovich, G.A. (2011). Expanding the universe of cytokines and pattern recognition receptors: Galectins and glycans in innate immunity. *J. Clin. Immunol.* *31*, 10–21.
- De Chaisemartin, L., Goc, J., Damotte, D., Validire, P., Magdeleinat, P., Alifano, M., Cremer, I., Fridman, W.H., Sautès-Fridman, C., and Dieu-Nosjean, M.C. (2011). Characterization of chemokines and adhesion molecules associated with T cell presence in tertiary lymphoid structures in human lung cancer. *Cancer Res.* *71*, 6391–6399.
- Chandra, R.A., Wilhite, T.J., Balboni, T.A., Alexander, B.M., Spektor, A., Ott, P.A., Ng, A.K., Hodi, F.S., and Schoenfeld, J.D. (2015). A systematic evaluation of abscopal responses following radiotherapy in patients with metastatic melanoma treated with ipilimumab. *Oncoimmunology* *4*, e1046028.
- Chang, A.Y., Bhattacharya, N., Mu, J., Setiadi, A.F., Carcamo-cavazos, V., Lee, G.H., Simons, D.L., Yadegarynia, S., Hemati, K., Kapelner, A., et al. (2013). Spatial organization of dendritic cells within tumor draining lymph nodes impacts clinical outcome in breast cancer patients. *J. Transl. Med.* *11*, 1.
- Cheever, M.A., and Higano, C.S. (2011). PROVENGE (sipuleucel-T) in prostate cancer: The first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin. Cancer Res.* *17*, 3520–3526.
- Chen, L., and Flies, D.B. (2013). Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 227–242.
- Christian, N.A., Benencia, F., Milone, M.C., Li, G., Frail, P.R., Therien, M.J., Coukos, G., and Hammer, D.A. (2009). In Vivo Dendritic Cell Tracking Using Fluorescence Lifetime Imaging and Near-Infrared-Emissive Polymersomes. *Mol. Imaging Biol.* *11*, 167–177.
- Church, S.E., Jensen, S.M., Antony, P. a, Restifo, N.P., and Fox, B. a (2014). Tumor-specific CD4+ T cells maintain effector and memory tumor-specific CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* *44*, 69–79.
- Cohn, L., and Delamarre, L. (2014). Dendritic cell-targeted vaccines. *Front. Immunol.* *5*, 255.
- Corbière, V., Chapiro, J., Stroobant, V., Ma, W., Lurquin, C., Lethé, B., Van Baren, N., Van Den Eynde, B.J., Boon, T., and Coulie, P.G. (2011). Antigen spreading contributes to MAGE vaccination-induced regression of melanoma metastases. *Cancer Res.* *71*, 1253–1262.
- Cornforth, A.N., Lee, G., and Dillman, R.O. (2011). Autologous peripheral blood mononuclear cell recognition of autologous proliferating tumor cells in the context of a patient-specific vaccine trial. *J. Biomed. Biotechnol.* *2011*.
- Dang, Y., Wagner, W.M., Gad, E., Rastetter, L., Berger, C.M., Holt, G.E., and Disis, M.L. (2012). Dendritic cell-activating vaccine adjuvants differ in the ability to elicit antitumor immunity due to an adjuvant-specific induction of immunosuppressive cells. *Clin. Cancer Res.* *18*, 3122–3131.
- Dauer, M., Obermaier, B., Herten, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S., and Eigler, A. (2003). Mature Dendritic Cells Derived from Human Monocytes Within 48 Hours: A Novel Strategy for Dendritic Cell Differentiation from Blood Precursors. *J. Immunol.* *170*, 4069–4076.
- Davies, M.N., Pere, H., Bosschem, I., Haesebrouck, F., Flahou, B., Tartour, E., Flower, D.R., Tough, D.F., and Bayry, J. (2017). In Silico Adjuvant Design and Validation. *Methods Mol. Biol.* *1494*, 370–383.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005a). Differential Lysosomal Proteolysis in Antigen-Presenting Cells Determines Antigen Fate. *Science* (80-.). *307*, 1630–1634.
- Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., and Trombetta, E.S. (2005b). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science* *307*, 1630–1634.
- Depillis, L., Gallegos, A., and Radunskaya, A. (2013). A model of dendritic cell therapy for melanoma. *Front. Oncol.* *3*, 1–14.
- Dillman, R.O., Cornforth, A.N., Depriest, C., McClay, E.F., Amatruda, T.T., de Leon, C., Ellis, R.E., Mayorga, C., Carbonell, D., and Cubellis, J.M. (2012). Tumor stem cell antigens as consolidative active specific immunotherapy: a randomized phase II trial of dendritic cells versus tumor cells in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* *35*, 641–649.
- Dohnal, a M., Witt, V., Hügel, H., Holter, W., Gadner, H., and Felzmann, T. (2007). Phase I study of tumor Ag-loaded IL-12 secreting semi-mature DC for the treatment of pediatric cancer. *Cytotherapy* *9*, 755–770.
- Dong, C., and Martinez, G.J. (2010). T cells : the usual subsets. *Nat. Rev. Immunol.* *54*, 77030–77030.

- Dowds, C.M., Kornell, S.C., Blumberg, R.S., and Zeissig, S. (2014). Lipid antigens in immunity. *Biol. Chem.* 395, 61–81.
- Dubensky, T.W., and Reed, S.G. (2010). Adjuvants for cancer vaccines. *Semin. Immunol.* 22, 155–161.
- Duewell, P., Kisser, U., Heckelsmiller, K., Hoves, S., Stoitzner, P., Koernig, S., Morelli, A.B., Clausen, B.E., Dauer, M., Eigler, A., et al. (2011). ISCOMATRIX adjuvant combines immune activation with antigen delivery to dendritic cells in vivo leading to effective cross-priming of CD8+ T cells. *J. Immunol.* 187, 55–63.
- Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991–998.
- Dutton-Regester, K., and Hayward, N.K. (2012). Reviewing the somatic genetics of melanoma: From current to future analytical approaches. *Pigment Cell Melanoma Res.* 25, 144–154.
- Eberl, G., Colonna, M., Di Santo, J.P., and McKenzie, A.N.J. (2015). Innate lymphoid cells: A new paradigm in immunology. *Science* (80-.). 348, aaa6566–aaa6566.
- Escamilla-Tilch, M., Filio-Rodríguez, G., García-Rocha, R., Mancilla-Herrera, I., Mitchison, N.A., Ruiz-Pacheco, J.A., Sánchez-García, F.J., Sandoval-Borrego, D., and Vázquez-Sánchez, E.A. (2013). The interplay between pathogen-associated and danger-associated molecular patterns: an inflammatory code in cancer? *Immunol. Cell Biol.* 91, 601–610.
- von Euw, E.M., Barrio, M.M., Furman, D., Bianchini, M., Levy, E.M., Yee, C., Li, Y., Wainstok, R., and Mordoh, J. (2007). Monocyte-derived dendritic cells loaded with a mixture of apoptotic/necrotic melanoma cells efficiently cross-present gp100 and MART-1 antigens to specific CD8(+) T lymphocytes. *J. Transl. Med.* 5, 19.
- von Euw, E.M., Barrio, M.M., Furman, D., Levy, E.M., Bianchini, M., Peguillet, I., Lantz, O., Vellice, A., Kohan, A., Chacón, M., et al. (2008). A phase I clinical study of vaccination of melanoma patients with dendritic cells loaded with allogeneic apoptotic/necrotic melanoma cells. Analysis of toxicity and immune response to the vaccine and of IL-10 -1082 promoter genotype as predictor of disease. *J. Transl. Med.* 6, 6.
- Fainboim, L., and Geffner, J. (2008). Introducción a la Inmunología Humana (Médica panamericana).
- Farese, R. V., and Walther, T.C. (2009). Lipid Droplets Finally Get a Little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 139, 855–860.
- Fehres, C.M., Garcia-Vallejo, J.J., Unger, W.W.J., and van Kooyk, Y. (2013). Skin-resident antigen-presenting cells: instruction manual for vaccine development. *Front. Immunol.* 4, 157.
- Fehres, C.M., Brujins, S., van Beelen, A.J., Kalay, H., Ambrosini, M., Hooijberg, E., Unger, W.W.J., de Gruijl, T.D., and van Kooyk, Y. (2014). Topical rather than intradermal application of the TLR7 ligand imiquimod leads to human dermal dendritic cell maturation and CD8+ T-cell cross-priming. *Eur. J. Immunol.* 1–36.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D., Forman, D., and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012.
- Fernández, A., Oliver, L., Alvarez, R., Fernández, L.E., Lee, K.P., and Mesa, C. (2014). Adjuvants and myeloid-derived suppressor cells: Enemies or allies in therapeutic cancer vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* 10, 3251–3260.
- Flor, A.C., Doshi, A.P., and Kron, S.J. (2016). Modulation of therapy-induced senescence by reactive lipid aldehydes. *Cell Death Discov.* 2, 16045.
- Folch, J., Lees, M., and Sloan Stanley, G.H. (1956). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226, 497–509.
- Fox, C.B., Moutafsi, M., Vergara, J., Desbien, A.L., Nana, G.I., Vedvick, T.S., Coler, R.N., and Reed, S.G. (2013). TLR4 ligand formulation causes distinct effects on antigen-specific cell-mediated and humoral immune responses. *Vaccine* 31, 5848–5855.
- Frankenberger, B., and Schendel, D.J. (2012). Third generation dendritic cell vaccines for tumor immunotherapy. *Eur. J. Cell Biol.* 91, 53–58.
- Fritsch, E.F., Rajasagi, M., Ott, P.A., Brusic, V., Hacoheh, N., and Wu, C.J. (2014). HLA-binding properties of tumor neopeptides in humans. *Cancer Immunol. Res.* 2, 522–529.
- Fu, T., He, Q., and Sharma, P. (2011). The ICOS/ICOSL pathway is required for optimal antitumor responses mediated by anti-CTLA-4 therapy. *Cancer Res.* 71, 5445–5454.
- Fujimoto, T., Ohsaki, Y., Cheng, J., Suzuki, M., and Shinohara, Y. (2008). Lipid droplets: a classic organelle with new outfits. *Histochem. Cell Biol.* 130, 263–279.
- Gabrilovich, D.I., Ostrand-R., S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 253–268.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* 14, 1014–1022.
- Gallegos, C.E., Michelin, S., Dubner, D., and Carosella, E.D. (2016). Immunomodulation of classical and non-classical HLA molecules by ionizing radiation. *Cell. Immunol.* 303, 16–23.
- Galluzzi, L., Senovilla, L., Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautès-fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Trial Watch: Dendritic cell-based interventions for cancer therapy. *Oncoimmunology*

1111–1134.

Gao, F., Liu, C., Guo, J., Sun, W., Xian, L., Bai, D., Liu, H., Cheng, Y., Li, B., Cui, J., et al. (2015). Radiation-driven lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Sci. Rep.* *5*, 9613.

Garnett, C.T., Palena, C., Chakarborty, M., Tsang, K., Schlom, J., and Hodge, J.W. (2004). Sublethal Irradiation of Human Tumor Cells Modulates Phenotype Resulting in Enhanced Killing by Cytotoxic T Lymphocytes Sublethal Irradiation of Human Tumor Cells Modulates Phenotype Resulting in Enhanced Killing by Cytotoxic T Lymphocytes. *Cancer Res* *64*, 7985–7994.

Gijzen, K., Tacke, P.J., Zimmerman, A., Joosten, B., de Vries, I.J.M., Figdor, C.G., and Torensma, R. (2007). Relevance of DC-SIGN in DC-induced T cell proliferation. *J. Leukoc. Biol.* *81*, 729–740.

Giltiay, N. V., Chappell, C.P., and Clark, E.A. (2012). B-cell selection and the development of autoantibodies. *Arthritis Res. Ther.* *14*, 1–13.

Glinsky, V. V., Glinsky, G. V., Glinskii, O. V., Huxley, V.H., Turk, J.R., Mossine, V. V., Deutscher, S.L., Pienta, K.J., and Quinn, T.P. (2003). Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res.* *63*, 3805–3811.

Gnjatic, S., Sawhney, N., and Bhardwaj, N. (2010). TLR Agonists: Are they good adjuvants? *Cancer J.* *16*, 382–391.

Goldinger, S.M., Dummer, R., Baumgaertner, P., Mihic-Probst, D., Schwarz, K., Hammann-Haenni, A., Willers, J., Geldhof, C., Prior, J.O., Kündig, T.M., et al. (2012). Nano-particle vaccination combined with TLR-7 and -9 ligands triggers memory and effector CD8⁺ T-cell responses in melanoma patients. *Eur. J. Immunol.* *42*, 3049–3061.

Goldszmid, R.S., Idoyaga, J., Bravo, A.I., Steinman, R., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2003). Dendritic Cells Charged with Apoptotic Tumor Cells Induce Long-Lived Protective CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Immunity against B16 Melanoma. *J. Immunol.* *171*, 5940–5947.

Graham, J.P., Authie, P., Yu, C.I., Zurawski, S.M., Li, X.-H., Marches, F., Flamar, A.-L., Acharya, A., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2016). Targeting dendritic cells in humanized mice receiving adoptive T cells via monoclonal antibodies fused to Flu epitopes. *Vaccine* *34*, 4857–4865.

Grayson, M.H., Ramos, M.S., Rohlfing, M.M., Kitchens, R., Wang, H.D., Gould, A., Agapov, E., and Holtzman, M.J. (2007). Controls for lung dendritic cell maturation and migration during respiratory viral infection. *J. Immunol.* *179*, 1438–1448.

Greaves, M., and Maley, C.C. (2012). Clonal evolution in cancer. *Nature* *481*, 306–313.

Guevara-Patiño, J.A., Turk, M.J., Wolchok, J.D., and Houghton, A.N. (2003). Immunity to Cancer Through Immune Recognition of Altered Self: Studies with Melanoma. *Adv. Cancer Res.* *90*, 157–177.

Hailemichael, Y., Dai, Z., Jaffarizad, N., Ye, Y., Medina, M. a, Huang, X.-F., Dorta-Estremera, S.M., Greeley, N.R., Nitti, G., Peng, W., et al. (2013). Persistent antigen at vaccination sites induces tumor-specific CD8⁺ T cell sequestration, dysfunction and deletion. *Nat. Med.* *19*, 465–472.

Hamburger, A. (1987). The human tumor clonogenic assay as a model system in cell biology. *Int J Cell Cloning* *5*, 89–107.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hangalapura, B.N., Oosterhoff, D., Gupta, T., de Groot, J., Wijnands, P.G.J.T.B., van Beusechem, V.W., den Haan, J., Tüting, T., van den Eertwegh, A.J.M., Curiel, D.T., et al. (2011). Delivery route, MyD88 signaling and cross-priming events determine the anti-tumor efficacy of an adenovirus based melanoma vaccine. *Vaccine* *29*, 2313–2321.

Hansen, M., Met, O., Svane, I.M., and Andersen, M.H. (2012). Cellular Based Cancer Vaccines: Type 1 Polarization of Dendritic Cells. *Curr. Med. Chem.* *19*, 4239–4246.

Harrell, M.I., Iritani, B.M., and Ruddell, A. (2008). Lymph node mapping in the mouse. *J. Immunol. Methods* *332*, 170–174.

Harris, R.C., Chianese-Bullock, K.A., Petroni, G.R., Schaefer, J.T., Brill, L.B., Molhoek, K.R., Deacon, D.H., Patterson, J.W., and Slingluff, C.L. (2012). The vaccine-site microenvironment induced by injection of incomplete Freund's adjuvant, with or without melanoma peptides. *J. Immunother.* *35*, 78–88.

Heemskerk, B., Kvistborg, P., and Schumacher, T.N.M. (2013). The cancer antigenome. *EMBO J.* *32*, 194–203.

Hegde, S., Pahne, J., and Smola-Hess, S. (2004). Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB J.* *18*, 1439–1441.

Henrickson, S.E., Perro, M., Loughhead, S.M., Senman, B., Stutte, S., Quigley, M., Alexe, G., Iannaccone, M., Flynn, M.P., Omid, S., et al. (2013). Antigen availability determines CD8⁺ T cell-dendritic cell interaction kinetics and memory fate decisions. *Immunity* *39*, 496–507.

Herber, D.L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V, Nagaraj, S., Tyurin, V. a, Corzo, A., Cho, H.-I., Celis, E., Lennox, B., et al. (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nat. Med.* *16*, 880–886.

Herrlinger, U., Aulwurm, S., Strik, H., Weit, S., Naumann, U., and Weller, M. (2004). MIP-1 α antagonizes the effect of a GM-CSF-enhanced subcutaneous vaccine in a mouse glioma model. *J. Neurooncol.* *147*–154.

- Higham, E.M., Wittrup, K.D., and Chen, J. (2010). Activation of Tolerogenic Dendritic Cells in the Tumor Draining Lymph Nodes by CD8 + T Cells Engineered to Express CD40 Ligand. *J. Immunol.*
- Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J., and Marrack, P. (2007). Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 516–521.
- Huang, Q., Li, F., Liu, X., Li, W., Shi, W., Liu, F.-F., O'Sullivan, B., He, Z., Peng, Y., Tan, A.-C., et al. (2011). Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nat. Med.* *17*, 860–866.
- Hugues, S., Scholer, A., Boissonnas, A., Nussbaum, A., Amigorena, S., and Fetler, L. (2007). Dynamic imaging of chemokine-dependent CD8 + T cell help for CD8 + T cell responses. *Nat. Immunol.* *8*, 921–930.
- Idorn, M., Køllgaard, T., Kongsted, P., Sengeløv, L., and Thor Straten, P. (2014). Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* *63*, 1177–1187.
- Igney, F.H., and Krammer, P.H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J. Leukoc. Biol.* *71*, 907–920.
- Inoue, M., Senju, S., Hirata, S., Irie, A., Baba, H., and Nishimura, Y. (2009). An in vivo model of priming of antigen-specific human CTL by Mo-DC in NOD/Shi-scid IL2rgamma(null) (NOG) mice. *Immunol. Lett.* *126*, 67–72.
- Iyoda, T., Shimoyama, S., Liu, K., Omatsu, Y., Akiyama, Y., Maeda, Y., Takahara, K., Steinman, R.M., and Inaba, K. (2002). The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* *195*, 1289–1302.
- Jarmalavicius, S., Welte, Y., and Walden, P. (2012). High immunogenicity of the human leukocyte antigen peptidomes of melanoma tumor cells. *J. Biol. Chem.* *287*, 33401–33411.
- Jeanbart, L., Ballester, M., de Titta, A., Corthésy, P., Romero, P., Hubbell, J., and Swartz, M.A. (2014). Enhancing efficacy of anti-cancer vaccines by targeted delivery to tumor-draining lymph nodes. *Cancer Immunol. Res.*
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 557–569.
- Johnson, L. a, and Jackson, D.G. (2014). Control of dendritic cell trafficking in lymphatics by chemokines. *Angiogenesis* *17*, 335–345.
- Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitz, E., Knop, J., and Enk, A.H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol.* *27*, 3135–3142.
- Kaech, S.M., Wherry, E.J., and Ahmed, R. (2002). Vaccines: Effector and Memory T-Cell Differentiation: Implications for Vaccine Development. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 251–262.
- Kaiser, a., Donnadieu, E., Abastado, J.-P., Trautmann, a., and Nardin, a. (2005). CC Chemokine Ligand 19 Secreted by Mature Dendritic Cells Increases Naive T Cell Scanning Behavior and Their Response to Rare Cognate Antigen. *J. Immunol.* *175*, 2349–2356.
- Kalchenko, V., Shvitiel, S., Malina, V., Lapid, K., Haramati, S., Lapidot, T., Brill, A., and Harmelin, A. (2006). Use of lipophilic near-infrared dye in whole-body optical imaging of hematopoietic cell homing. *J. Biomed. Opt.* *11*.
- Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *J. Immunol.* *188*, 21–28.
- Kalinski, P., Edington, H., Zeh, H.J., Okada, H., Butterfield, L.H., Kirkwood, J.M., and Bartlett, D.L. (2011). Dendritic cells in cancer immunotherapy : vaccines or autologous transplants ? *Immunol. Res.* 235–247.
- Kamath, A.T., Henri, S., Battye, F., Tough, D.F., and Shortman, K. (2002). Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* *100*, 1734–1741.
- Kang, T.H., Mao, C., Lee, S.Y., Chen, A., Lee, J.-H., Kim, T.W., Alvarez, R.D., Roden, R.B.S., Pardoll, D.M., Hung, C.-F., et al. (2013). Chemotherapy Acts as an Adjuvant to Convert the Tumor Microenvironment into a Highly Permissive State for Vaccination-Induced Antitumor Immunity. *Cancer Res.*
- Kantoff, P.W., Higano, C.S., Shore, N.D., Berger, E.R., Small, E.J., Penson, D.F., Redfern, C.H., Ferrari, A.C., Dreicer, R., Sims, R.B., et al. (2010). Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N. Engl. J. Med.* *363*, 1287–1296.
- Karyampudi, L., Lamichhane, P., Scheid, A.D., Kalli, K.R., Shreeder, B., Krempsi, J.W., Behrens, M.D., and Knutson, K.L. (2014). Accumulation of memory precursor CD8 T cells in regressing tumors following combination therapy with vaccine and anti-PD-1 antibody. *Cancer Res.* *74*, 2974–2985.
- Kataru, R.P., Kim, H., Jang, C., Choi, D.K., Koh, B.I., Kim, M., Gollamudi, S., Kim, Y.-K., Lee, S.-H., and Koh, G.Y. (2011). T lymphocytes negatively regulate lymph node lymphatic vessel formation. *Immunity* *34*, 96–107.
- Mac Keon, S., Gazzaniga, S., Mallerman, J., Bravo, A.I., Mordoh, J., and Wainstok, R. (2010). Vaccination with dendritic cells charged with apoptotic/necrotic B16 melanoma induces the formation of subcutaneous lymphoid tissue. *Vaccine* *28*, 8162–8168.

- Knoechel, B., Lohr, J., Zhu, S., Wong, L., Hu, D., Ausubel, L., and Abbas, A.K. (2006). Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J. Immunol.* *176*, 6473–6483.
- Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H., and Koezuka, Y. (1995). KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* *7*, 529–534.
- Koff, W.C., Gust, I.D., and Plotkin, S.A. (2014). Toward a Human Vaccines Project. *Nat. Immunol.* *15*, 589–592.
- Kono, H., and Rock, K.L. (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 279–289.
- Krengel, U., and Bousquet, P.A. (2014). Molecular recognition of gangliosides and their potential for cancer immunotherapies. *Front. Immunol.* *5*, 1–11.
- Kreutz, M., Tacke, P.J., and Figdor, C.G. (2013). Targeting dendritic cells – why bother? *Blood* *121*, 2836–2844.
- Kyewski, B., and Klein, L. (2006). A Central Role for Central Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 571–606.
- Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W.J., Hill, A.V., and McMichael, A.J. (1997). Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J. Exp. Med.* *186*, 859–865.
- Le, D.T., and Jaffee, E.M. (2012). Regulatory T-cell modulation using cyclophosphamide in vaccine approaches: A current perspective. *Cancer Res.* *72*, 3439–3444.
- Leone, M., and Moreau, R. (2014). Leukocyte Toll-like Receptor 2-mitochondria Axis in Sepsis. *Anesthesiology* *121*, 1147–1149.
- Lesterhuis, W.J., de Vries, I.J.M., Schreiber, G., Lambeck, A.J., Aarntzen, E.H.J.G., Jacobs, J.F.M., Scharenborg, N.M., van de Rakt, M.W.M.M., de Boer, A.J., Croockewit, S., et al. (2011). Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* *17*, 5725–5735.
- Lewis Phillips, G.D., Li, G., Dugger, D.L., Crocker, L.M., Parsons, K.L., Mai, E., Blättler, W.A., Lambert, J.M., Chari, R.V.J., Lutz, R.J., et al. (2008). Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* *68*, 9280–9290.
- Lindenberg, J.J., Oosterhoff, D., Sombroek, C.C., Lougheed, S.M., Hooijberg, E., Stam, A.G.M., Santegoets, S.J., Tijssen, H.J., Buter, J., Pinedo, H.M., et al. (2013). IL-10 conditioning of human skin affects the distribution of migratory dendritic cell subsets and functional T cell differentiation. *PLoS One* *8*, e70237.
- Linette, G.P., and Carreno, B.M. (2013). Dendritic cell-based vaccines Shining the spotlight on signal 3. *Oncoimmunology* *11–12*.
- Liston, A., and Gray, D.H.D. (2014). Homeostatic control of regulatory T cell diversity. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 154–165.
- Liu, K., Idoyaga, J., Charalambous, A., Fujii, S.-I., Bonito, A., Mordoh, J., Wainstok, R., Bai, X.-F., Liu, Y., and Steinman, R.M. (2005). Innate NKT lymphocytes confer superior adaptive immunity via tumor-capturing dendritic cells. *J. Exp. Med.* *202*, 1507–1516.
- Mackey, M.F., Barth, R.J., and Noelle, R.J. (1998). The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* *63*, 418–428.
- Madan, R., Gulley, J.L., Fojo, T., and Dahut, W.L. (2010). Therapeutic cancer vaccines in prostate cancer: the paradox of improved survival without changes in time to progression. *Oncologist* *15*, 969–975.
- Madorsky Rowdo, F.P., Baron, A., Urrutia, M., and Mordoh, J. (2015). Immunotherapy in cancer: A combat between tumors and the immune system; you win some, you lose some. *Front. Immunol.* *6*, 2–13.
- Mailliard, R.B., Wankowicz-kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C.M., Kapsenberg, M.L., Kirkwood, J.M., Storkus, W.J., and Kalinski, P. (2004). α -Type-1 Polarized Dendritic Cells : A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity. *Advances in Brief* α -Type-1 Polarized Dendritic Cells : A Novel Immunization Tool with Optimized CTL-inducing Activity. *Cancer Res.* *64*, 5934–5937.
- Maio, M. (2012). Melanoma as a model tumour for immuno-oncology. *Ann. Oncol.* *23*.
- Mandai, M., Hamanishi, J., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T., and Konishi, I. (2016). Dual faces of ifn-gamma in cancer progression: A role of PD-L1 induction in the determination of pro- and anti-tumor immunity. *Clin. Cancer Res.* *22*, 2329–2334.
- Mandl, J.N., Liou, R., Klauschen, F., Vrisekoop, N., Monteiro, J.P., Yates, A.J., Huang, A.Y., and Germain, R.N. (2012). Quantification of lymph node transit times reveals differences in antigen surveillance strategies of naive CD4+ and CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 18036–18041.
- van Manen, H.-J., Kraan, Y.M., Roos, D., and Otto, C. (2005). Single-cell Raman and fluorescence microscopy reveal the association of lipid bodies with phagosomes in leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 10159–10164.
- Marongiu, L., Donini, M., Toffali, L., Zenaro, E., and Dusi, S. (2013). ESAT-6 and HspX improve the effectiveness of BCG to induce human dendritic cells-dependent Th1 and NK cells activation. *PLoS One* *8*, e75684.
- Marraffini, L.A. (2015). CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature* *526*, 55–61.
- Martin-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U.E., Ugucioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003).

- Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* *198*, 615–621.
- Martín-Fontecha, A., Sebastiani, S., Höpken, U.E., Uguccioni, M., Lipp, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2003). Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. *J. Exp. Med.* *198*, 615–621.
- Maude, S.L., Teachey, D.T., Porter, D.L., and Grupp, S.A. (2016). CD19-targeted chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* *125*, 4017–4024.
- De Mazière, A.M., Muehlethaler, K., Van Donselaar, E., Salvi, S., Davoust, J., Cerottini, J.-C., Lévy, F., Slot, J.W., and Rimoldi, D. (2002). The Melanocytic Protein Melan-A/MART-1 Has a Subcellular Localization Distinct from Typical Melanosomal Proteins. *Traffic* *3*, 678–693.
- Medzhitov, R., and Janeway Jr., C. a (1998). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol* *10*, 351–353.
- Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* *480*, 480–489.
- Miller, M.J., Hejazi, A.S., Wei, S.H., Cahalan, M.D., and Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*.
- Mitchell, D.A., Batich, K.A., Gunn, M.D., Huang, M.-N., Sanchez-Perez, L., Nair, S.K., Congdon, K.L., Reap, E.A., Archer, G.E., Desjardins, A., et al. (2015). Tetanus toxoid and CCL3 improve dendritic cell vaccines in mice and glioblastoma patients. *Nature* *519*, 366–369.
- Mordoh, J., Silva, C., Albarellos, M., Bravo, A.I., and Kairiyama, C. (1995). Phase I clinical trial in cancer patients of a new monoclonal antibody FC-2.15 reacting with tumor proliferating cells. *J. Immunother. with Emphas. Tumor Immunol.* *17*, 151–160.
- Moyer, T.J., Zmolek, A.C., and Irvine, D.J. (2016). Beyond antigens and adjuvants: Formulating future vaccines. *J. Clin. Invest.* *126*, 799–808.
- Moynihan, K.D., Opel, C.F., Szeto, G.L., Tzeng, A., Zhu, E., Engreitz, J.M., Williams, R.T., Rakhra, K., Zhang, M.H., Rothschilds, A.M., et al. (2016). Eradication of large established tumors in mice by combination immunotherapy that engages innate and adaptive immune responses. *Nat. Med.*
- Mukherji, B., Chakraborty, N.G., Yamasaki, S., Okino, T., Yamase, H., Sporn, J.R., Kurtzman, S.K., Ergin, M.T., Ozols, J., and Meehan, J. (1995). Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 8078–8082.
- Mullins, D.W., Sheasley, S.L., Ream, R.M., Bullock, T.N.J., Fu, Y.-X., and Engelhard, V.H. (2003). Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. *J. Exp. Med.* *198*, 1023–1034.
- Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2006). The tumor-draining lymph node as an immune-privileged site. *Immunol. Rev.* *213*, 146–158.
- Munoz, M. a, Biro, M., and Weninger, W. (2014). T cell migration in intact lymph nodes in vivo. *Curr. Opin. Cell Biol.* *30C*, 17–24.
- Muthuswamy, R., Mueller-Berghaus, J., Haberkorn, U., Reinhart, T.A., Schadendorf, D., and Kalinski, P. (2010). PGE 2 transiently enhances DC expression of CCR7 but inhibits the ability of DCs to produce CCL19 and attract naive T cells. *Blood* *116*, 1454–1459.
- Nakayamada, S., Takahashi, H., Kanno, Y., and O’Shea, J.J. (2012). Helper T cell diversity and plasticity. *Curr. Opin. Immunol.* *24*, 297–302.
- Neidhardt-Berard, E.-M., Berard, F., Banchereau, J., and Palucka, a K. (2004). Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res.* *6*, R322–R328.
- Nestle, F.O., Figueira, L., Nickoloff, B.J., and Burg, G. (1998). Human dermal dendritic cells process and present soluble protein antigens. *J. Invest. Dermatol.* *110*, 762–766.
- O’Neill, D.W.O., Adams, S., and Bhardwaj, N. (2004). Manipulating dendritic cell biology for the active immunotherapy of cancer. *Blood* *104*, 2235–2246.
- Ochsenbein, A.F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin. Immunopathol.* *27*, 19–35.
- Ohlfest, J.R., Andersen, B.M., Litterman, A.J., Xia, J., Pennell, C. a, Swier, L.E., Salazar, A.M., and Olin, M.R. (2013). Vaccine injection site matters: qualitative and quantitative defects in CD8 T cells primed as a function of proximity to the tumor in a murine glioma model. *J. Immunol.* *190*, 613–620.
- Oncología, P. en (2015). Diagnóstico, tratamiento y seguimiento del cáncer (Universidad de Buenos Aires).
- Palucka, A.K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-norvell, F., Blanck, J., Johnston, D.A., Fay, J., and Banchereau, J. (2006). Dendritic Cells Loaded With Killed Allogeneic Melanoma Cells can Induce Objective Clinical Responses and MART-1 Specific CD8+ T-cell Immunity. *J. Immunother.* *29*, 545–557.

- Palucka, K., Banchereau, J., and Mellman, I. (2010a). Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity* 33, 464–478.
- Palucka, K., Ueno, H., Roberts, L., Fay, J., and Banchereau, J. (2010b). Dendritic cells: are they clinically relevant? *Cancer J.* 16, 318–324.
- Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807–839.
- Parish, C.R. (2003). Cancer immunotherapy: The past, the present and the future. *Immunol. Cell Biol.* 81, 106–113.
- Park, C.G., Takahara, K., Umemoto, E., Yashima, Y., Matsubara, K., Matsuda, Y., Clausen, B.E., Inaba, K., and Steinman, R.M. (2001). Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int. Immunol.* 13, 1283–1290.
- Du Pasquier, L., and Litman, G.W. (1992). Origin and evolution of the vertebrate immune system. *APMIS* 248, 383–392.
- Peguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D., and Portoukalian, J. (2003). Gangliosides from Human Melanoma Tumors Impair Dendritic Cell Differentiation from Monocytes and Induce Their Apoptosis. *J. Immunol.* 170, 3488–3494.
- Perret, R., Sierro, S.R., Botelho, N.K., Cognac, S., Donda, A., and Romero, P. (2013). Adjuvants that improve the ratio of antigen-specific effector to regulatory T cells enhance tumor immunity. *Cancer Res.* 73, 6597–6608.
- Pierre, P., Turley, S.J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, a, Inaba, K., Steinman, R.M., and Mellman, I. (1997). Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells. *Nature* 388, 787–792.
- Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., and López, J.A. (2005). Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol. Cell Biol.* 83, 451–461.
- Pizzurro, G.A., and Barrio, M.M. (2015). Dendritic cell-based vaccine efficacy: Aiming for hot spots. *Front. Immunol.* 6, 1–8.
- Playfair, J.H., Papermaster, B.W., and Cole, L.J. (1965). Focal antibody production by transferred spleen cells in irradiated mice. *Science* 149, 998–1000.
- Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive Strategies that are Mediated by Tumor Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 267–296.
- Ratzinger, G., Stoitzner, P., Ebner, S., Lutz, M.B., Layton, G.T., Rainer, C., Senior, R.M., Shipley, J.M., Fritsch, P., Schuler, G., et al. (2002). Matrix Metalloproteinases 9 and 2 Are Necessary for the Migration of Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells from Human and Murine Skin. *J. Immunol.* 168, 4361–4371.
- Reichardt, P., Dornbach, B., and Gunzer, M. (2010). APC, T cells, and the Immune Synapse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 340, 229–249.
- Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., Groothuis, T.A., Chakraborty, M., Wansley, E.K., Camphausen, K., Luiten, R.M., de Ru, A.H., Neijssen, J., et al. (2006). Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* 203, 1259–1271.
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lämmermann, T., Pflücke, H., Piel, M., Polleux, J., Spatz, J.P., and Sixt, M. (2009). Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nat. Cell Biol.* 11, 1438–1443.
- Reyes, D., Salazar, L., Espinoza, E., Pereda, C., Castellón, E., Valdevenito, R., Huidobro, C., Inés Becker, M., Lladser, A., López, M.N., et al. (2013). Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *Br. J. Cancer* 109, 1488–1497.
- Reynders, K., Illidge, T., Siva, S., Chang, J.Y., and De Ruyscher, D. (2015). The abscopal effect of local radiotherapy: Using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat. Rev.* 41, 503–510.
- Ridgway, D. (2003). The First 1000 Dendritic Cell Vaccinees. *Cancer Invest.* 21, 873–886.
- Ridolfi, R., Riccobon, A., Galassi, R., Giorgetti, G., Petrini, M., Fiammenghi, L., Stefanelli, M., Ridolfi, L., Moretti, A., Migliori, G., et al. (2004). Evaluation of in vivo labelled dendritic cell migration in cancer patients. *J. Transl. Med.* 2, 27.
- Robinson, J., Halliwell, J.A., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P., and Marsh, S.G.E. (2013). The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res.* 41, 1222–1227.
- Rocca, Y.S., Roberti, M.P., Arriaga, J.M., Amat, M., Bruno, L., Pampena, M.B., Huertas, E., Loria, F.S., Pairola, A., Bianchini, M., et al. (2013). Altered phenotype in peripheral blood and tumor-associated NK cells from colorectal cancer patients. *Innate Immun.* 19, 76–85.
- Romero, P., Valmori, D., Pittet, M.J., Zippelius, A., Rimoldi, D., Lévy, F., Dutoit, V., Ayyoub, M., Rubio-Godoy, V., Michielin, O., et al. (2002). Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol. Rev.* 188, 81–96.
- Romero, P., Banchereau, J., Bhardwaj, N., Cockett, M., Disis, M.L., Dranoff, G., Gilboa, E., Hammond, S.A., Hershberg, R., Korman, A.J., et al. (2016). The Human Vaccines Project : A roadmap for cancer vaccine development. *Sci. Transl. Med.* 8, 1–8.
- Rooney, M.S., Shukla, S.A., Wu, C.J., Getz, G., and Hacohen, N. (2015). Molecular and genetic properties of tumors associated with local immune cytolytic activity. *Cell* 160, 48–61.

- Rosalía, R. a, Quakkelaar, E.D., Redeker, A., Khan, S., Camps, M., Drijfhout, J.W., Silva, A.L., Jiskoot, W., van Hall, T., van Veelen, P. a, et al. (2013). Dendritic cells process synthetic long peptides better than whole protein, improving antigen presentation and T-cell activation. *Eur. J. Immunol.* *43*, 2554–2565.
- Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A., and Dudley, M.E. (2008). Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* *8*, 299–308.
- Roszik, J., Haydu, L.E., Hess, K.R., Oba, J., Joon, A.Y., Siroy, A.E., Karpinets, T. V., Stingo, F.C., Baladandayuthapani, V., Tetzlaff, M.T., et al. (2016). Novel algorithmic approach predicts tumor mutation load and correlates with immunotherapy clinical outcomes using a defined gene mutation set. *BMC Med.* *14*, 1–8.
- Russ, B.E., Prier, J.E., Rao, S., and Turner, S.J. (2013). T cell immunity as a tool for studying epigenetic regulation of cellular differentiation. *Front. Genet.* *4*, 1–10.
- Sabado, R.L., and Bhargwaj, N. (2015). Cancer immunotherapy: dendritic-cell vaccines on the move. *Nature* *519*, 300–301.
- Sainte-Marie, G., and Peng, F.-S. (1983). Structural and cell population changes in the lymph nodes of athymic nude mice. *Lab. Investig.* *49*, 420.
- Samsa, M.M., Mondotte, J. a, Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., and Gamarnik, A. V (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* *5*, e1000632.
- Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., and Rodriguez-Fernandez, J.L. (2006). The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells. *J. Immunol.* *176*, 5153–5159.
- Savina, A., and Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunol. Rev.* *219*, 143–156.
- Schiering, C., Guarnerio, J., Basso, V., Muzio, L., and Mondino, A. (2010). Antigen-experienced CD4(+) T cells limit naïve T-cell priming in response to therapeutic vaccination in vivo. *Cancer Res.* *70*, 6161–6170.
- Schnare, M., Barton, G.M., Holt, A.C., Takeda, K., Akira, S., and Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* *2*, 947–950.
- Schnurr, M., Galambos, P., Scholz, C., Then, F., Dauer, M., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Tumor Cell Lysate-pulsed Human Dendritic Cells Induce a T-Cell Response against Pancreatic Carcinoma Cells : an in Vitro Model for the Assessment of Tumor Vaccines Tumor Cell Lysate-pulsed Human Dendritic Cells Induce a T-Cell Response against Pancreatic. *Cancer Res* *61*, 6445–6450.
- Schreiber, R.D. (2005). Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Cancer Immun. a J. Acad. Cancer Immunol.* *5 Suppl 1*, 1.
- Schumacher, T.N., and Schreiber, R.D. (2015). Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science (80-.)*. *348*, 69–74.
- Senovilla, L., Vacchelli, E., García, P., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial watch: DNA vaccines for cancer therapy. *Oncoimmunology* *2*.
- Serre, R., Benzekry, S., Padovani, L., MEILLE, C., Andre, N., Ciccolini, J., Barlesi, F., Muracciole, X., and Barbolosi, D. (2016). Mathematical modeling of cancer immunotherapy and its synergy with radiotherapy. *Cancer Res.* 1–27.
- Shih, N., Yang, H., Cheng, H., Hung, Y., and Yao, Y. (2009). MIP-3 a – transfected Tumor Cells Enhances Efficacy of Dendritic Cell-based Cancer Vaccine. *J. Immunother.* *32*, 363–369.
- De Snoo, F.A., and Hayward, N.K. (2005). Cutaneous melanoma susceptibility and progression genes. *Cancer Lett.* *230*, 153–186.
- Snook, A.E., Magee, M.S., Schulz, S., and Waldman, S. a (2014). Selective antigen-specific CD4(+) T-cell, but not CD8(+) T- or B-cell, tolerance corrupts cancer immunotherapy. *Eur. J. Immunol.* *44*, 1956–1966.
- Sologuren, I., Rodríguez-gallego, C., and Lara, P.C. (2014). Immune effects of high dose radiation treatment : implications of ionizing radiation on the development of bystander and abscopal effects. *Biol. Basis IORT* *3*, 18–31.
- Somanchi, S.S., Somanchi, A., Cooper, L.J.N., and Lee, D. a (2012). Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood* *119*, 5164–5172.
- Soudja, S.M., Henri, S., Mello, M., Chasson, L., Mas, A., Wehbe, M., Auphan-Anezin, N., Leserman, L., Van den Eynde, B., and Schmitt-Verhulst, A.-M. (2011). Disrupted lymph node and splenic stroma in mice with induced inflammatory melanomas is associated with impaired recruitment of T and dendritic cells. *PLoS One* *6*, e22639.
- Sparber, F., Tripp, C.H., Hermann, M., Romani, N., and Stoitzner, P. (2010). Langerhans cells and dermal dendritic cells capture protein antigens in the skin: possible targets for vaccination through the skin. *Immunobiology* *215*, 770–779.
- Speiser, D.E., Utzschneider, D.T., Oberle, S.G., Münz, C., Romero, P., and Zehn, D. (2014). T cell differentiation in chronic infection and cancer: functional adaptation or exhaustion? *Nat. Publ. Gr.* 1–7.
- Spel, L., Boelens, J., Nierkens, S., and Boes, M. (2013). Antitumor immune responses mediated by dendritic cells How signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation. *Oncoimmunology* 1–10.
- Spranger, S., Javorovic, M., Bürdek, M., Mosetter, B., Tippmer, S., Bigalke, I., Geiger, C., Schendel, D.J., and

- Frankenberger, B. (2010). Generation of Th1-Polarizing Dendritic Cells Using the TLR7/8 Agonist CL075. *J. Immunol.*
- Spranger, S., Frankenberger, B., and Schendel, D.J. (2012). NOD/scid IL-2Rg(null) mice: a preclinical model system to evaluate human dendritic cell-based vaccine strategies in vivo. *J. Transl. Med.* *10*, 30.
- St John, A.L., Chan, C.Y., Staats, H.F., Leong, K.W., and Abraham, S.N. (2012). Synthetic mast-cell granules as adjuvants to promote and polarize immunity in lymph nodes. *Nat. Mater.* *11*, 250–257.
- Steinman, R.M., Hawiger, D., and Nussenzweig, M.C. (2003). Tolerogenic Dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *21*, 685–711.
- Sterin-Speziale, N., Kahane, V.L., Setton, C.P., Fernandez, M.C., and Speziale, E.H. (1992). Compartmental study of rat renal phospholipid metabolism. *Lipids* *27*, 10–14.
- Stewart, B.W., and Wild, C.P. (2014). World Cancer Report 2014. World Heal. Organ.
- Swinnen, J. V, Brusselmans, K., and Verhoeven, G. (2006). Increased lipogenesis in cancer cells: new players, novel targets. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* *9*, 358–365.
- Swirski, F.K., Nahrendorf, M., Etzrodt, M., Wildgruber, M., Cortez-Retamozo, V., Panizzi, P., Figueiredo, J.-L., Kohler, R.H., Chudnovskiy, A., Waterman, P., et al. (2009). Identification of Splenic Reservoir Monocytes and Their Deployment to Inflammatory Sites. *Science* (80-.). *325*, 612–616.
- Sylvester, R.J. (2011). Bacillus Calmette-Guérin treatment of non-muscle invasive bladder cancer. *Int. J. Urol.* *18*, 113–120.
- Takeshima, T., Chamoto, K., Wakita, D., Ohkuri, T., Togashi, Y., Shirato, H., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2010). Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res.* *70*, 2697–2706.
- Tapia, I.J., Aris, M., Arriaga, J.M., Blanco, P.A., Mazzobre, F., Vega, J., Mordoh, J., and Barrio, M.M. (2013). Development of a novel methodology for cryopreservation of melanoma cells applied to CSF470 therapeutic vaccine. *Cryobiology* *67*, 163–169.
- Taylor, C., Hershman, D., Shah, N., Suci-Foca, N., Petrylak, D.P., Taub, R., Vahdat, L., Cheng, B., Pegram, M., Knutson, K.L., et al. (2007). Augmented HER-2-specific immunity during treatment with trastuzumab and chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* *13*, 5133–5143.
- Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune checkpoint blockade: A common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* *27*, 451–461.
- Ueno, H., Klechevsky, E., Morita, R., Asford, C., Cao, T., Matsui, T., Di Pucchio, T., Connolly, J., Fay, J.W., Pascual, V., et al. (2007). Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* *219*, 118–142.
- Utzschneider, D.T., Legat, A., Fuertes Marraco, S. a, Carrié, L., Luescher, I., Speiser, D.E., and Zehn, D. (2013). T cells maintain an exhausted phenotype after antigen withdrawal and population reexpansion. *Nat. Immunol.* *14*, 603–610.
- Vacchelli, E., Martins, I., Eggermont, A., Fridman, W.H., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2012). Trial watch: Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* *1*, 1557–1576.
- Valente, M., Baey, C., Louche, P., Dutertre, C.-A., Vimeux, L., Marañón, C., Hosmalin, A., and Feuillet, V. (2014). Apoptotic cell capture by DCs induces unexpectedly robust autologous CD4+ T-cell responses. *Eur. J. Immunol.* *44*, 2274–2286.
- Vasaturo, A., Di Blasio, S., Peeters, D.G. a, de Koning, C.C.H., de Vries, J.M., Figdor, C.G., and Hato, S. V (2013). Clinical Implications of Co-Inhibitory Molecule Expression in the Tumor Microenvironment for DC Vaccination: A Game of Stop and Go. *Front. Immunol.* *4*, 417.
- Veiga-Fernandes, H., Walter, U., Bourgeois, C., McLean, A., and Rocha, B. (2000). Response of naïve and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo. *Nat. Immunol.* *1*, 47–53.
- van de Ven, R., van den Hout, M.F.C.M., Lindenberg, J.J., Sluijter, B.J.R., van Leeuwen, P.A.M., Lougheed, S.M., Meijer, S., van den Tol, M.P., Scheper, R.J., and Gruijl, T.D. De (2011). Characterization of four conventional dendritic cell subsets in human skin-draining lymph nodes in relation to T-cell activation. *Blood* *118*, 2502–2510.
- Vence, L., Palucka, a K., Fay, J.W., Ito, T., Liu, Y.-J., Banchereau, J., and Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 20884–20889.
- Verdegaal, E.M.E., de Miranda, N.F.C.C., Visser, M., Harryvan, T., van Buuren, M.M., Andersen, R.S., Hadrup, S.R., van der Minne, C.E., Schotte, R., Spits, H., et al. (2016). Neoantigen landscape dynamics during human melanoma-T cell interactions. *Nature* *536*, 91–95.
- Verdijk, P., Aarntzen, E.H.J.G., Punt, C.J. a, de Vries, I.J.M., and Figdor, C.G. (2008). Maximizing dendritic cell migration in cancer immunotherapy. *Expert Opin. Biol. Ther.* *8*, 865–874.
- Verdijk, P., Aarntzen, E.H.J.G., Lesterhuis, W.J., Boullart, a C.I., Kok, E., van Rossum, M.M., Strijk, S., Eijckeler, F., Bonenkamp, J.J., Jacobs, J.F.M., et al. (2009). Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin. Cancer Res.* *15*, 2531–2540.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., and Ugolini, S. (2011).

- Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* (80-.). *331*, 44–49.
- Vogelstein, B., and Kinzler, K. (2004). Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* *10*, 789–799.
- de Vries, I.J.M., Krooshoop, D.J.E.B., Scharenborg, N.M., Lesterhuis, W.J., Diepstra, J.H.S., van Muijen, G.N., Strijk, S.P., Ruers, T.J., Boerman, O.C., Oyen, W.J.G., et al. (2003). Effective Migration of Antigen-pulsed Dendritic Cells to Lymph Nodes in Melanoma Patients Is Determined by Their Maturation State. *Cancer Res* *63*, 12–17.
- Vultur, A., and Herlyn, M. (2013). SnapShot: Melanoma. *Cancer Cell* *23*, 706.
- Walker, L.S.K., and Abbas, A.K. (2002). The Enemy Within: Keeping Self-Reactive T Cells At Bay in the Periphery. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 11–19.
- Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.-Y., Mendrzyk, R., et al. (2012). Multi-peptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat. Med.* *18*, 1254–1261.
- Wan, S., Pestka, S., Jubin, R.G., Lyu, Y.L., Tsai, Y.C., and Liu, L.F. (2012). Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS One* *7*.
- Wang, B., Zaidi, N., He, L.-Z., Zhang, L., Kuroiwa, J.M.Y., Keler, T., and Steinman, R.M. (2012). Targeting of the non-mutated tumor antigen HER2/neu to mature dendritic cells induces an integrated immune response that protects against breast cancer in mice. *Breast Cancer Res.* *14*, R39.
- Welters, M.J.P., Kenter, G.G., de Vos van Steenwijk, P.J., Löwik, M.J.G., Berends-van der Meer, D.M. a, Essahsah, F., Stynenbosch, L.F.M., Vloon, A.P.G., Ramwadhoebe, T.H., Piersma, S.J., et al. (2010). Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 11895–11899.
- Wolchok, J.D., Hoos, A., O'Day, S., Weber, J.S., Hamid, O., Lebbé, C., Maio, M., Binder, M., Bohnsack, O., Nichol, G., et al. (2009). Guidelines for the evaluation of immune therapy activity in solid tumors: immune-related response criteria. *Clin. Cancer Res.* *15*, 7412–7420.
- Wong, J.L., Muthuswamy, R., Bartlett, D.L., and Kalinski, P. (2013). IL-18-based combinatorial adjuvants promote the intranodal production of CCL19 by NK cells and dendritic cells of cancer patients. *Oncoimmunology* *1*–8.
- Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J. Exp. Med.* *198*, 173–181.
- Yadav, M., Jhunjhunwala, S., Phung, Q.T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T.K., Fritsche, J., Weinschenk, T., et al. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature* *515*, 572–576.
- Yee, C., Thompson, J.A., Byrd, D., Riddell, S.R., Roche, P., Celis, E., and Greenberg, P.D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 16168–16173.
- Yen, J.-H., Khayrullina, T., and Ganea, D. (2008). PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration. *Blood* *111*, 260–270.
- Yin, X., Johns, S.C., Kim, D., Mikulski, Z., Salanga, C.L., Handel, T.M., Macal, M., Zúñiga, E.I., and Fuster, M.M. (2014). Lymphatic specific disruption in the fine structure of heparan sulfate inhibits dendritic cell traffic and functional T cell responses in the lymph node. *J. Immunol.* *192*, 2133–2142.
- Zheng, R., and Shu, S. (2011). Immune Response to Cancer and Its Regulation in Regional Lymph Nodes. *J. Surg. Oncol.* *550*–554.
- Zobywalski, A., Javorovic, M., Frankenberger, B., Pohla, H., Kremmer, E., Bigalke, I., and Schendel, D.J. (2007). Generation of clinical grade dendritic cells with capacity to produce biologically active IL-12p70. *J. Transl. Med.* *5*, 18.