

UCH-FC
MAG-B
A 945
C.1



**Caracterización de la respuesta inmune inducida
por TRIMELvax®, una vacuna de lisados
tumorales termoactivados**

**Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas
Facultad De Ciencias**

Por

Ignacio Patricio Avalos Carrasco

Enero, 2017

**Director de Tesis: Dra. María Rosa Bono Merino
Co-Director de tesis: Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

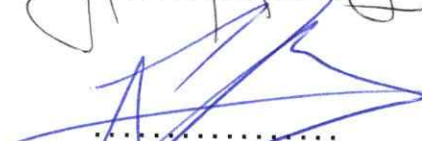
Ignacio Patricio Avalos Carrasco

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día.....

Director de Tesis:
Dra. María Rosa Bono Merino



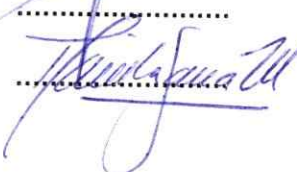
Co-Director de Tesis:
Dr. Flavio Andrés Salazar Onfray



Comisión de Evaluación de la Tesis:
Dra. Verónica Alejandra Palma Alvarado



Dra. Daniela Sauma Mahaluf



DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada a todas las personas que siempre han creído en mi incluso en las peores situaciones, y que me han ayudado a crecer como científico y como persona.

En especial, se la dedico a mis padres, los cuales siempre han estado a mi lado y han apoyado todas y cada una de mis desiciones. Sin ellos, yo no sería ni la cuarta parte de lo que soy ahora.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Ignacio Avalos Carrasco nació el 2 de Abril del año 1991. Estudió desde 1° a 6° básico en el colegio Liahona de La Florida. Continuó sus estudios en el liceo Instituto Nacional José Miguel Carrera hasta 4° medio. Ingresó a la Universidad de Chile el año 2009 a Ingeniería en Biotecnología Molecular, obteniendo el grado de licenciado el 2013. Entre 2013 y 2015 realizó su Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral del Dr. Flavio Salazar Onfray. El año 2014 entró al Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, agradecer a mis padres por todo el apoyo que me han brindado siempre y la preocupación que han tenido conmigo en todas las etapas de mi vida. Ellos siempre han hecho todo lo posible para formarme de la mejor manera posible, siempre respetando mi espacio y mis decisiones. Gracias, de todo corazón.

- También quiero agradecer a mi polola, Anita, por estar siempre conmigo, darme su cariño y confiar en mis capacidades en todo momento. Sin importar, la situación en la que me encuentre o lo estresado que pueda estar, ella siempre ha estado ahí para ayudarme, tranquilizarme y hacerme reír, a pesar de que soy una persona bastante difícil con quien tratar. Muchas gracias por todo.

Gracias también a mis amigos. Todos ellos saben quiénes son y lo mucho que los aprecio. No son muchos, pero son los mejores. Siempre dispuestos a conversar, jugar y pasar un buen rato. Ellos hacen que las preocupaciones desaparezcan por un rato, sin importar lo grandes que sean.

Por último, quiero agradecer a todos los integrantes de los laboratorios de Inmunología Anti Tumoral (LIAT), de Regulación e Inmunología del Cáncer (LREIC) y de Inmunología y Estrés Celular (LIEC), muchos de los cuales han ayudado enormemente en el progreso de esta tesis, además de ser grupos de personas muy agradables y capaces. Sean cuales sean los caminos que tomen de aquí en adelante, les deseo mucha suerte a todos.

ÍNDICE DE MATERIAS

Dedicatoria	ii
Biografía	iii
Agradecimientos	iv
Lista de tablas	vii
Lista de figuras	viii
Lista de abreviaturas	x
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Cáncer y melanoma	1
Respuesta inmune antitumoral	2
Señales de peligro y su rol en el ambiente tumoral	5
Inmunoterapias contra el melanoma	7
TAPCells y nuevas alternativas de vacunas antitumorales	12
Hipótesis	16
Objetivos	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Materiales y Métodos	17
Ratones	17
Generación de lisados tumorales condicionados y de la vacuna	

TRIMELvax®	17
Evaluación del crecimiento tumoral en ratones inmunizados con TRIMELvax®	18
Obtención de leucocitos desde tumor y bazo	19
Citometría de flujo	20
Medición de anticuerpos en suero de ratones inmunizados con la vacuna TRIMELvax®	22
Análisis Estadístico	23
Resultados	24
La vacuna de lisados tumorales condicionados TRIMELvax® disminuye el crecimiento tumoral del melanoma murino B16-F10 en un modelo profiláctico	24
La vacuna TRIMELvax® disminuye el crecimiento tumoral en un modelo terapéutico de melanoma murino B16-F10	26
TRIMELvax® no afecta la infiltración de poblaciones inmunes al tumor, pero sí la activación de linfocitos T CD8+ y células NK	29
Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELvax® aumentan el número y la activación de LT en bazo	36
Animales con melanoma inmunizados con TRIMELvax® o lisados tumorales inducen una respuesta inmune humoral	42
Discusión	47
Conclusiones	57
Bibliografía	58

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos tipos de tratamientos inmunoterapéuticos contra el cancer	11
Tabla 2. Subpoblaciones y características de los LT infiltrantes de tumor de los ratones bajo estudio	36
Tabla 3. Subpoblaciones y características de los LT presentes en bazo de los ratones bajo estudio	41
Tabla 4. Subpoblaciones y características de los LT presentes en bazo de los ratones bajo estudio, expresado en forma de porcentaje	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Generación de una respuesta inmune antitumoral	5
Figura 2. Protocolo de tratamiento profiláctico	24
Figura 3. Eficacia profiláctica de TRIMELvax® en el modelo de melanoma murino B16-F10	25
Figura 4. Protocolo de tratamiento terapéutico	26
Figura 5. Eficacia terapéutica de la vacuna TRIMELvax® en el modelo de melanoma murino B16-F10	28
Figura 6. Progresión del crecimiento tumoral en animales con melanoma inmunizados con TRIMELvax®	29
Figura 7. Estrategia de selección de la población linfóide intratumoral a través de citometría de flujo	30
Figura 8. Infiltración de linfocitos T, células NK y DCs en tumor	31
Figura 9. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales poseen un mayor porcentaje de LT CD8+ activados en el sitio tumoral	33
Figura 10. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales poseen un mayor porcentaje de células NK y NKT-like activadas en el sitio tumoral	35
Figura 11. Estrategia de selección de la población linfóide en bazo	36
Figura 12. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELvax® poseen un mayor número de linfocitos T en bazo	38

Figura 13. Niveles de activación de LT de bazo de ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELvax® o los controles	40
Figura 14. Niveles de activación de células NK y NKT de bazo de ratones con melanoma inmunizadas con TRIMELvax® o los controles	41
Figura 15. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales o con TRIMELvax® inducen una respuesta humoral	44
Figura 16. Ratones con melanoma inyectados con TRIMELvax® o con lisados tumorales poseen anticuerpos contra células de melanoma humanas y células B16-F10	46

ABREVIATURAS

- ACT: Transferencia Adoptiva de Células.
- CAFs: Fibroblastos Asociados a Cáncer.
- cDC: Célula dendrítica convencional.
- CPA: Célula Presentadora de Antígenos.
- CTL: Linfocito T Citotóxico.
- CRT: Calreticulina.
- DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.
- DC: Célula Dendrítica.
- DTH: Hipersensibilidad de Tipo Retardada.
- FDA: Agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos.
- GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias Monocíticas y Granulocíticas.
- HMGB1: Proteína mediadora de inflamación que funciona como "señal de peligro" en la maduración de las células dendríticas.
- Ig: Inmunoglobulina.
- IL: Interleuquina.
- IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.
- IFN- α : Interferón alfa.
- IFN- γ : Interferón gamma.
- kDa: KiloDalton.
- LB: Linfocito B.
- LT: Linfocito T.
- MAA: Antígeno asociado a melanoma.

MDSC: Célula mieloide supresora.

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I.

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II.

NK: Células Natural Killer.

NKT: Células Natural Killer T.

PAMP: Patrón Molecular Asociado a Patógenos.

PBL: Linfocitos de Sangre Periférica.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

pDC: Célula dendrítica plasmocitoide.

PD-L1: Ligando de Muerte Programada 1.

PD-L2: Ligando de Muerte Programada 2.

PGE2: Prostaglandina E2.

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones.

SFB: Suero Fetal Bovino.

TAM: Macrófago asociado a tumor.

TAPCells: Células Presentadoras de Antígenos Tumorales.

TCR: Receptor de Linfocitos T.

Th1: Linfocitos T CD4+ cooperadores de tipo 1.

Th2: Linfocitos T CD4+ cooperadores de tipo 2.

Th17: Linfocitos T CD4+ cooperadores de tipo 17.

TILs: Linfocitos Infiltrantes de Tumor.

TLR: Receptor Tipo Toll.

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral-alfa.

VEGF: Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular.

RESUMEN

El uso clínico de bloqueadores de *checkpoints* del sistema inmune, tales como los anticuerpos anti-CTLA-4 (Ipilimumab) o anti-PD-1 (Nivolumab), ha demostrado ser beneficioso para la supervivencia de pacientes con melanoma u otros tumores sólidos. Sin embargo, un alto porcentaje de los pacientes tratados con estas proteínas no responde al tratamiento. En este contexto, las vacunas contra el cáncer se vuelven una alternativa complementaria para su tratamiento. La óptima entrega de antígenos (Ags) y el uso adecuado de adyuvantes son fundamentales para el éxito de una vacuna. En este trabajo, una nueva vacuna terapéutica para el tratamiento del melanoma maligno, llamada TRIMELvax[®], fue probada en un modelo experimental. Esta vacuna está basada en lisados tumorales de células de melanoma condicionadas junto a un adyuvante específico ya usado en pacientes en el contexto de una vacuna de células dendríticas, sin observarse efectos adversos. La vacuna está hecha para activar directamente la respuesta inmune contra el tumor, inhibiendo su crecimiento. TRIMELvax fue evaluada en términos de su seguridad y eficacia a un nivel pre-clínico, en un modelo C57BL/6 de melanoma murino (B16-F10). Para esto, ratones inmunocompetentes fueron vacunados con tres dosis de TRIMELvax y luego desafiados con células de melanoma B16-F10. De manera alternativa, la inmunización también fue probada de manera terapéutica en ratones con tumor establecido. Nuestros resultados muestran que TRIMELvax fue capaz de reducir drásticamente la aparición del tumor, inhibiendo su crecimiento en los ratones inmunizados. En contraste, el uso por separado de lisados tumorales o el adyuvante no tuvo influencia en el crecimiento tumoral. Este comportamiento fue asociado a una respuesta inmune

mediada por linfocitos T CD8+ y células NK. Finalmente, una terapia con bloqueadores de checkpoints podría verse fuertemente potenciada con la combinación con TRIMELvax, lo que necesita ser probado en futuros ensayos clínicos.

ABSTRACT

Clinical strategies using immune-checkpoint blockers, such as anti-CTLA4, (Ipilimumab) or anti-PD1 antibodies (Nivolumab), have demonstrated durable survival benefits in patients with melanoma and other solid tumors. Nevertheless, an important percentage of patients treated with anti-checkpoint proteins remain refractory. In this context, cancer vaccines become again a complementary alternative to cancer treatment. The optimal delivery of antigens (Ags) and the use of adequate adjuvants are crucial for vaccine success. Here, a prototype of a generic therapeutic vaccine for the treatment of malignant melanoma named TRIMELvax[®] was tested in an experimental model. This vaccine is based on conditioned melanoma tumor lysates combined with a specific adjuvant already used in patients in the context of a DC vaccine, without adverse effects. The vaccine is intended to directly activate *in vivo* the immune response against the tumor inhibiting its growth. TRIMELvax was evaluated in terms of safety and efficacy at pre-clinical level, in C57Bl/6 murine model of melanoma (B16-F10). Briefly, immunocompetent mice were vaccinated with three doses of TRIMELvax, and then challenged with B16-F10 melanoma cells. Alternatively, immunization was also tested therapeutically in tumor bearing mice. Our results showed that TRIMELvax was able to reduce drastically the occurrence of tumor, inhibiting tumor growth in immunized mice. In contrast the separated use of tumor lysate, or adjuvant did not impact tumor growth. This response was associated to CD8+ T cells mediated immune response and NK cells. Immune-checkpoint blockers therapy may be strongly potentiated by the combination with TRIMELvax, which need to be tested in future clinical trials.

INTRODUCCION

Cáncer y melanoma.

El cáncer se define como un conjunto de enfermedades producidas por la proliferación descontrolada de células anormales, las cuales poseen la capacidad de invadir y destruir otros tejidos. Las células cancerosas adquieren características que las hacen muy diferentes de una célula normal: poseen fallas en la regulación de la división celular, en los mecanismos de chequeo de errores en la reproducción, además de la pérdida de especialización y de las uniones que les permiten conformar un tejido. Tanto en Chile como en el mundo, el cáncer aparece como la segunda mayor causa de muerte, precedido solo por las enfermedades cardiovasculares.

De entre los distintos tipos de cáncer, el cáncer de piel es el más frecuente entre la población de piel blanca. Existen tres sub-tipos de cáncer de piel: el carcinoma basocelular, el carcinoma de células escamosas y el melanoma maligno. Los dos primeros son los de mayor frecuencia y presentan baja mortalidad (Lomas y col., 2012). En cambio el melanoma, aunque es el menos frecuente (aproximadamente un 4% de los casos), es el tipo de cáncer que más ha aumentado su incidencia a nivel mundial y es el que posee la mayor tasa de mortalidad (80% de las muertes por cáncer de piel), ya que presenta una alta capacidad metastásica (Miller & Mihm, 2006; Garbe y col., 2012). Entre los factores de riesgo en la aparición del melanoma están el historial familiar de este tipo de cáncer (factores genéticos), inmunosupresión, sensibilidad a la luz del sol y exposición a radiación ultravioleta (UV) (Miller & Mihm, 2006). El melanoma posee buen pronóstico en etapas tempranas, con alta supervivencia de los pacientes mediante cirugía. Sin embargo, esto contrasta con su alta mortalidad en

etapas tardías, debido a que los tratamientos convencionales tales como quimio y radioterapia, poseen una baja efectividad en fases avanzadas de este cáncer, creando la necesidad de generar nuevas terapias alternativas.

Respuesta inmune antitumoral.

El sistema inmune se mantiene en un estado de vigilancia permanente para la destrucción de células tumorales, las cuales son generadas producto de mutaciones en su material genético. En 1909, Paul Ehrlich fue el primero en postular que el sistema inmune poseía un rol crítico en la protección del organismo frente al cáncer, razonando que, de otra manera, los tumores se presentarían en una mucha mayor frecuencia en animales con alta esperanza de vida (Chow y col., 2012). Ya en la década del 50, fue formulada la hipótesis de la "inmunovigilancia", la cual describe que el sistema inmune de un organismo es capaz de reconocer antígenos presentes en células tumorales nacientes y eliminarlas antes de que el tumor se vuelva clínicamente evidente, por lo que el cáncer progresivo representaba un evento raro en donde las células tumorales escapaban del control del sistema inmune (Ochsenbein, 2002). A pesar de ser rechazada en su momento por la falta de evidencia, el conocimiento actual confirma la existencia de la inmunovigilancia y la incluye dentro de un proceso más general denominado "inmunoedición" del cáncer, encargado tanto de prevenir la formación de tumores como de seleccionar aquellos de baja inmunogenicidad y de esta manera promover el crecimiento tumoral (Dunn y col., 2002; Chow y col., 2012).

La respuesta inmune antitumoral es mediada principalmente por linfocitos T (LT), especialmente LT CD8+ o citotóxicos, los cuales requieren de la presentación de antígenos tumorales por parte de células dendríticas (DCs) para su activación. Estas células se localizan en los tejidos periféricos en un estado inmaduro donde capturan

antígenos continuamente (Steinman & Banchereau, 2007), y detectan señales de inflamación o infección, procesos necesarios para inducir la maduración de las DCs. Este proceso incluye la mayor expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) y de coestimulación, y la inducción de su migración hacia órganos linfoides secundarios donde son capaces de presentar antígenos tumorales a LT específicos provocando su proliferación, diferenciación, y migración hacia el sitio tumoral, en donde ejercerán su acción (Steinman & Banchereau, 2007) (Figura 1). Estudios a lo largo del tiempo han demostrado que pacientes con cáncer que presentan una mayor proporción de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), poseen una mejor supervivencia (Yu & Fu, 2006; Thomas y col., 2013; Wang y col., 2016).

Inicialmente, la investigación de la respuesta inmune antitumoral estuvo centrada en los linfocitos T CD8 citotóxicos (CTLs) debido a que son capaces de reconocer los complejos MHC-I-péptido expresados por las células tumorales y provocar su lisis directa. Además, poseen la habilidad para eliminar grandes masas tumorales *in vivo* (Toes y col., 1999). Sin embargo, con el paso del tiempo, numerosos estudios han demostrado la participación de los LT CD4 en la respuesta antitumoral. Su participación en este proceso estaría dada por la secreción de citoquinas como IFN- γ y TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), las cuales potencian la respuesta inmune mediante la inducción de la expresión de MHC de clase I y II en las células tumorales y de presentación de antígenos, aumentando la inmunogenicidad del tumor; y mediante el reclutamiento y activación de células del sistema inmune innato tales como macrófagos y eosinófilos (Ruella & Kalos, 2014). Otro grupo de linfocitos que no ha sido mayormente estudiado, pero que podría tener participación en la respuesta antitumoral son los linfocitos B (LB). Inicialmente se pensó que los LB actuaban como células pro-tumorales, ya que se describió que estas células eran capaces de inhibir

tanto la citotoxicidad de los LT como la respuesta de estas células en vacunas terapéuticas, en modelos tumorales de ratón (Qin y col., 1998). Sin embargo, estudios posteriores han mostrado que los LB podrían tener efectos positivos sobre la respuesta de los LT en modelos tumorales *in vivo* (DiLillo y col., 2010). Esta contradicción se explicaría en parte, por el estado de activación de los LB, ya que en estado de reposo los LB inhibirían la respuesta de los LT, mientras que su activación la facilitaría mediante la producción de anticuerpos, citoquinas y quimioquinas, actuando como células presentadoras de antígenos locales, y organizando la formación de estructuras linfoides terciarias para la mantención de una inmunidad a largo plazo. Esta teoría se ha confirmado con observaciones que indican que los LB en pacientes con cáncer estarían principalmente activadas, aumentando la opción de que estas células tengan un rol positivo en la actividad anti-tumoral (Nelson; 2010).

Para evadir la respuesta inmune, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos, tanto intrínsecos como extrínsecos, como la sobreexpresión de las moléculas inmunoreguladoras PD-L1/L2 en las células tumorales, el aumento en la secreción de prostaglandina E2 (PGE2), arginasa (moléculas supresoras de LT) y VEGF (inhibe la infiltración de los LT al sitio tumoral), la disminución de la expresión de moléculas MHC-I de presentación antigénica, y el reclutamiento de células inmunosupresoras (Grivennikov y col., 2010; Mellman y col., 2011). Debido a esto, una de las claves para una inmunidad antitumoral efectiva es poder superar los mecanismos de evasión presentados por el microambiente tumoral (Figura 1).

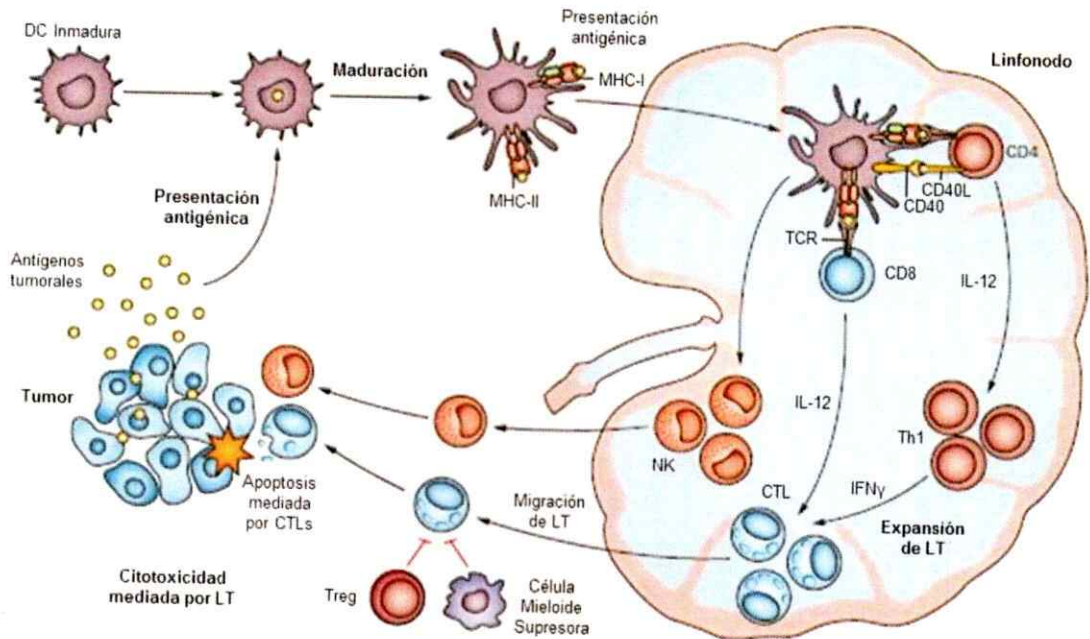


Figura 1. Generación de una respuesta inmune antitumoral. Actualmente, la teoría más aceptada es la que se explica a continuación: inicialmente, las células dendríticas inmaduras presentes en los tejidos capturan antígenos y otras señales del microambiente tumoral lo que conlleva a su maduración, aumentando la expresión de moléculas de histocompatibilidad (MHC) y co-estimuladoras entre otras. Luego, estas células migran hacia el linfonodo drenante del tumor, lugar donde ocurre la presentación antigénica a los LT tanto CD4 como CD8. Posteriormente, los LT activados son capaces de proliferar mediante la acción de citoquinas como la IL-2 y diferenciarse, para luego migrar hacia el tumor y ejercer su acción citotóxica. A pesar de todo esto, en el tumor existe un ambiente principalmente tolerogénico por lo que la acción de los LT activados puede verse disminuida o suprimida por otros tipos celulares tales como LT reguladores o células mieloides supresoras. Figura modificada de Melero y col., 2014.

Señales de peligro y su rol en el ambiente tumoral.

En el sitio tumoral, el proceso de inflamación puede favorecer tanto la eliminación como el crecimiento y propagación del tumor, lo que se ve determinado por el balance de señales anti- o pro-tumorales (Chow y col., 2012). Durante mucho tiempo, antes de conocerse el mecanismo de inducción de la respuesta contra los tumores, una de las mayores interrogantes en la inmunología antitumoral era entender

como un grupo de pacientes con cáncer era capaz de generar una respuesta por parte de sus LT CD8+ contra antígenos tumor-específicos, en ausencia de patógenos. Esto condujo al pensamiento de que podrían existir patrones moleculares asociados a estrés o daño capaces de inducir una respuesta del sistema inmune innato y, a través de éste, activar la respuesta inmune adaptable (Gajewski y col., 2013).

Actualmente sabemos que en ausencia de infección, los factores celulares liberados en condiciones de daño tisular o estrés, entre ellos el calor excesivo, pueden actuar como "señales de peligro", induciendo una respuesta inflamatoria mediada por receptores que reconocen patrones moleculares (PRR) como los TLR (Bianchi, 2007), presentes principalmente en DCs. Estas señales de "cómeme" ("eat-me") incluyen calreticulina (CRT), DAMPs (por "patrones moleculares asociados a daño"), proteínas de shock térmico, ácidos nucleicos y el grupo de alta movilidad 1 (HMGB1); todos reconocidos por TLR, integrinas o receptores tipo scavenger. Se ha demostrado en modelos animales que los DAMPs tendrían un rol beneficioso en terapias contra cáncer debido a su interacción con el sistema inmune y a la generación de una potente inmunidad antitumoral (Krysko y col., 2013).

Entre las señales de peligro más estudiadas y caracterizadas en cáncer está la calreticulina, proteína de unión a calcio presente principalmente en el retículo endoplásmico. Entre sus funciones está el controlar los niveles de calcio en la célula, dirigir la correcta conformación de proteínas y participar en el proceso de fagocitosis. Por mucho tiempo se creyó que la traslocación de calreticulina a la superficie celular se debía a su participación en la fagocitosis, pero evidencia más reciente ha sugerido que esta proteína facilitaría la presentación antigénica y la respuesta citotóxica mediada por linfocitos T tumor-específicos (Chow y col., 2012; Krysko y col., 2012; Krysko y col., 2013).

Otra de las señales de peligro mencionadas anteriormente y estudiadas en cáncer, es la molécula HMGB1, proteína nuclear que participa en facilitar interacciones proteína-proteína y en transcripción génica. Cuando HMGB1 se encuentra en el medio extracelular es capaz de iniciar el proceso de inflamación mediante su unión a receptores del tipo Toll (TLRs) induciendo la maduración de DCs, y siendo indispensable para el eficiente procesamiento y presentación de antígenos tumorales, además de activar células endoteliales para inducir procesos de angiogénesis y migración de células del sistema inmune (Chow y col., 2012).

Considerando el rol que cumplen las "señales de peligro" en la inmunidad antitumoral, principalmente induciendo la maduración de las DCs, estas moléculas podrían transformarse en una importante herramienta en la generación de nuevas terapias contra diferentes tipos de cáncer.

Inmunoterapias contra el melanoma.

Los tratamientos convencionales para combatir el melanoma incluyen cirugía (altamente efectivo en etapas tempranas del cáncer), radioterapia y quimioterapia, los que han mostrado efectos limitados en etapas tardías y donde un alto porcentaje de los pacientes genera efectos secundarios, tales como fatiga, pérdida de cabello, anemia, entre otros (Garbe y col., 2012). El melanoma metastásico pocas veces es curable con este tipo de tratamientos, ya que posee características quimio y radiorresistentes (Joshi y col., 2009), haciendo necesario el desarrollo de nuevos tratamientos.

Uno de los tratamientos alternativos de mayor interés e investigación en los últimos años es la llamada inmunoterapia antitumoral. La inmunoterapia se refiere a la estimulación del propio sistema inmune del paciente para el rechazo y destrucción del tumor. En 1893, William Coley evidenció que la inoculación de extractos bacterianos a

pacientes con cáncer, podía reducir masas tumorales (Cann y col., 2003), sentando las bases de la inmunoterapia. Posteriormente en 1943, se demostró que la inmunización con células tumorales podía prevenir el crecimiento de tumores singénicos en modelos animales (Gross, 1943). Entre las décadas de los 80 y 90, se comprobó que LT CD8 humanos tienen la capacidad de lisar específicamente células tumorales autólogas *in vitro* (Topalian y col., 1989), y que al co-cultivar células tumorales con LT autólogos, estos eran capaces de activarse, proliferar y secretar citoquinas (Barth y col., 1991).

Hoy en día, existen tres aproximaciones para potenciar la respuesta inmune antitumoral mediante el desarrollo de inmunoterapias: (1) la estimulación no específica de la respuesta inmune antitumoral, mediante el uso de citoquinas o por la eliminación de señales inhibitorias para los linfocitos T, entre las que podemos mencionar las llamadas terapias bloqueadoras de *checkpoints*, las cuales utilizan anticuerpos para bloquear moléculas específicas encargadas de suprimir la respuesta de los linfocitos T, las cuales pueden estar presentes ya sea en los mismos linfocitos o en las células tumorales, potenciando y manteniendo activa de esta manera la respuesta inmune contra el tumor (Pardoll, 2012); (2) la transferencia adoptiva de células (ACT), los cuales se seleccionan, se expanden *ex vivo* y posteriormente se transfieren de nuevo al paciente; y (3) la inmunización activa (vacunas) para mejorar las respuestas endógenas antitumorales *in vivo*. Dentro de las primeras, el uso de Ipilimumab, un anticuerpo monoclonal humano que bloquea el receptor inhibitorio CTLA-4, y el anticuerpos anti PD-1 (Nivolumab) ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de pacientes con cáncer metastásico (Hodi y col., 2010; Van den Eertwegh y col., 2012). A pesar de los resultados alentadores existen una serie de desventajas con este tipo de tratamientos como su relativamente baja tasa de respuesta (20-25%), la cual puede deberse a distintos factores como, por ejemplo, una baja infiltración de LT al tumor; y la

presentación de una serie de efectos adversos en los pacientes, provocados por el uso de este anticuerpo, entre los que se encuentran fatiga, diarrea, colitis, toxicidad derivada de eventos autoinmunes, entre otros (Banaszynski & Kolesar, 2013). La transferencia adoptiva de linfocitos T es una forma de terapia de transfusión que consiste en la inyección de distintos subtipos de linfocitos T en pacientes con cáncer, con el fin de eliminar el tumor y prevenir su recurrencia (June, 2007). En 1966, Southam y colaboradores demostraron que pacientes con cáncer avanzado a los cuales se les realizó una transferencia de leucocitos autólogos, presentaban una inhibición del crecimiento de los tumores subcutáneos (Southam y col., 1966). Este hallazgo sugirió la existencia de leucocitos en el paciente con un efecto inhibitorio específico hacia el crecimiento tumoral. Entre todos los distintos tipos de leucocitos, los LT CD8+ son los que atraen mayor atención para su uso en esta terapia debido a su capacidad para destruir directamente las células tumorales. Además, los LT poseen otras características como la facilidad de su manipulación genética y su larga vida, en comparación a otras células del sistema inmune como, por ejemplo, las células NK (June, 2007). El éxito de este tipo de terapias depende principalmente de la óptima selección o modificación genética de LT específicos contra antígenos de tumor, y de inducir su correcta proliferación manteniendo sus funciones efectoras y capacidad de migración (June, 2007). A pesar de que la transferencia adoptiva de LT ha mostrado regresión de algunos tumores, ha fallado en generar una respuesta antitumoral en un alto porcentaje de los pacientes, lo cual podría deberse a una defectuosa migración de las células inyectadas o a la pobre expresión antigénica de los tumores (Rosenberg y col., 2008).

A diferencia de las vacunas profilácticas, las vacunas terapéuticas contra cáncer son administradas a pacientes que ya poseen la enfermedad y están diseñadas

para eliminar el tumor mediante el fortalecimiento del propio sistema inmune del paciente. Los distintos subtipos celulares activados por esta clase de vacunas atacan y destruyen específicamente a las células cancerosas, dejando intactas las células normales. Por lo que, en un comienzo, las vacunas terapéuticas contra cáncer pueden ser utilizadas para detener el crecimiento tumoral en cánceres avanzados o combatir tumores resistentes a las terapias convencionales. Existen diversos tipos de vacunas contra cáncer, entre las que podemos mencionar las vacunas celulares (utilizando células inmunes o tumorales), vacunas conformadas por proteínas o péptidos, y vacunas genéticas (de DNA, RNA o virales); sin embargo, el desafío de producir una vacuna realmente efectiva se mantiene hasta el momento (Guo y col., 2013). Uno de los nuevos enfoques terapéuticos para tratar el cáncer es el desarrollo de terapias basadas en la utilización de vacunas de DCs que sean capaces de generar una respuesta inmune anti-tumoral específica con memoria inmunológica (Gilboa, 2007; Palucka & Banchereau, 2012). El protocolo más utilizado en los ensayos clínicos de pacientes con diferentes tipos de cáncer es el cultivo de monocitos de sangre periférica diferenciados a células dendríticas con GM-CSF e IL-4, las cuales se maduran *ex vivo* y se reinyectan en los pacientes (Palucka & Banchereau, 2012). A pesar de los buenos resultados de algunos de estos ensayos clínicos, la mayoría de ellos han fallado en la correcta evaluación de la respuesta antitumoral y en la identificación de biomarcadores para la predicción de la respuesta clínica de los pacientes (Palucka & Banchereau, 2012), por lo que aún se necesita de nuevos estudios para lograr optimizar este tipo de terapias y aumentar el rango de respuesta en los pacientes.

En la Tabla 1 se resumen las ventajas y desventajas de las diferentes estrategias inmunoterapéuticas que existen en la actualidad.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los distintos tipos de tratamientos inmunoterapéuticos contra el cáncer. Modificada de Farkona y col., 2016.

Estrategia	Ventajas	Desventajas	Referencias
Citoquinas IL-2	-Estimula el sistema inmune del paciente.	-Baja tasa de respuesta. -Alto riesgo de inflamación sistémica grave.	Sharma y col, 2011.
IFN- α	-Estimula el sistema inmune del paciente. -Respuestas duraderas (para pequeño grupo de pacientes con melanoma).	-Baja tasa de respuesta. -Toxicidad a altas dosis.	Sharma y col, 2011.
Terapias celulares Vacunas	-Estimula el sistema inmune del paciente. -Mínima toxicidad. -Administración ambulatoria. -Genera memoria inmunológica y protección a largo plazo	-Falta de antígenos universales y protocolos de inmunización ideales lleva a pobre eficacia y respuesta.	Yaddanapudi y col., 2013.
Transferencia adoptiva	-Omite la tarea de romper la tolerancia a los antígenos tumorales. -Produce alta avidéz en LT efectores. -Mayor efectividad al eliminar los linfocitos del sistema previamente. -Modificación genética amplía los tipos de cáncer posibles de tratar.	-Restringido principalmente a melanoma. -Problemas de seguridad, efectos adversos y falta de respuestas duraderas en muchos pacientes. -Toma tiempo preparar las poblaciones celulares adecuadas. -Costoso.	Klebanoff y col, 2004; Segal y col, 2008; Mellman y col, 2011; Rosenberg y col, 2011; Yee, 2013; Qian y col, 2014; Gilham y col, 2015; Shi y col, 2015; Kazemi y col, 2016.
Bloqueo de "checkpoints" Anticuerpo α -CTLA-4	-Desencadena respuestas antitumorales pre-existentes y nuevas. -Exhibe potentes propiedades antitumorales. -Aumento de la media de supervida.	-Solo un pequeño grupo de pacientes obtiene beneficios clínicos. -Severos efectos adversos observados en hasta un 35% de los pacientes.	Phan y col, 2003; Hodi y col, 2010; Mellman y col, 2011; Ribas, 2015.
Anticuerpo α -PD1 y α -PD-L1	-Respuestas clínicas suficientes y duraderas. -Respuestas terapéuticas en un amplio espectro de tipos de cáncer. -Menor toxicidad que tratamiento con α -CTLA-4.	-Solo un pequeño grupo de pacientes obtiene beneficios clínicos.	Dong y col, 1999; Brahmer y col, 2012; Mahoney y col, 2015.
Inmunoterapias combinadas	-Aumento de respuestas antitumorales.	-Puede llevar a un aumento en la magnitud y frecuencia de efectos adversos.	Palucka & Banchereau, 2012; Palucka & Banchereau, 2013.

TAPCells y nuevas alternativas de vacunas antitumorales.

En el Laboratorio de Inmunología Anti-Tumoral de la Universidad de Chile, se han realizado estudios clínicos de fase I y II, basados en un nuevo tratamiento, el cual consiste en la utilización de DCs cargadas con lisados tumorales alogénicos en pacientes con melanoma avanzado. Las DCs utilizadas, denominadas TAPCells (Tumor Antigen Presenting Cells), son células presentadoras de antígenos autólogas con la capacidad para activar LT antitumorales. Un componente esencial de este tratamiento es la utilización de un lisado tumoral alogénico, obtenido de tres líneas celulares de melanoma. Este lisado, denominado TRIMEL contiene los principales antígenos asociados a melanoma (MAA) tales como MART-1, gp100, tirosinasa, NY-ESO1, MAGE1, MC1R, survivina, Her2/neu, entre otros, y es capaz de inducir una rápida diferenciación de monocitos *in vitro* (Aguilera y col., 2011). Las células que constituyen el lisado son sometidas previamente a un condicionamiento que incluye un shock térmico. Datos obtenidos en nuestro laboratorio indican que este proceso induce la liberación de calreticulina y proteína HMGB1, las cuales actúan como señales de peligro, induciendo la presentación de antígenos y la óptima maduración de las DCs (Aguilera y col., 2011). Los estudios clínicos de fase I y II, demostraron que el 60% de los pacientes con melanoma maligno tratados con TAPCells desarrollaron respuestas inmunológicas contra el tumor, aumentando su supervivencia desde 11 meses (pacientes no respondedores) a 33 meses en promedio (Aguilera y col., 2011).

A pesar de los auspiciosos resultados obtenidos, las respuestas clínicas inducidas en los pacientes son aún insuficientes. Una proporción importante de pacientes no responden o bien sus respuestas inmunológicas y clínicas son demasiado débiles o poco duraderas. Dentro de las limitaciones biológicas y tecnológicas para el uso de este tipo de terapias encontramos la diversidad y complejidad de los subtipos

de DCs (Merad y col., 2013), los cuales varían en su capacidad de procesar y presentar antígenos, y de activar a los LT; la conversión de las DCs inyectadas hacia células tolerogénicas; y la alta complejidad y laboriosidad de los protocolos de generación de DCs *ex vivo* y el alto costo asociado a ellos. Por estas razones es necesario re-diseñar tecnologías para la administración eficiente de antígenos tumorales que conduzcan a la generación de una respuesta inmune anti-tumoral efectiva.

La mayoría de las vacunas celulares desarrolladas actualmente para inmunoterapias se basan en la utilización de DCs cargadas con distintas fuentes de antígenos tumorales (Timmerman & Levy, 1999; Banchereau & Palucka, 2005; Salcedo y col., 2006). Entre otros tipos de vacunas que han sido utilizadas en el pasado están el uso de células tumorales autólogas irradiadas en combinación con un adyuvante, vacunas de proteínas o péptidos recombinantes basados en antígenos asociados a tumores (TAAs) y vacunas de DNA o RNA (Guo y col., 2013). A pesar de esto, existen estudios limitados acerca de la utilización de lisados tumorales inyectados directamente en los pacientes. Entre los años 1987 y 2000, se realizaron varios estudios clínicos con el fin de probar la efectividad de una vacuna basada en la utilización de un lisado de dos líneas celulares con un adyuvante contra melanoma (Sondak & Sosman, 2003). Los resultados mostraron que la terapia no era más efectiva que los tratamientos tradicionales probablemente por la falta de factores que promuevan la maduración de las células presentadoras de antígenos, sin embargo, los efectos adversos eran mucho menores y se potenciaba el efecto de otros compuestos utilizados para combatir el cáncer, como el interferón (Sondak & Sosman, 2003). Investigaciones recientes han mostrado la importancia en la respuesta antitumoral de un proceso llamado "apoptosis inmunogénica" (AI), la cual se caracteriza por la

liberación de señales de peligro (por ejemplo, DAMPs) por parte de las células, lo que conlleva a una potente y duradera respuesta contra el cáncer. Un ejemplo de AI es la llamada necroptosis, o "necrosis programada", la cual al ser inducida en células tumorales las vuelve inmunogénicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que al ser utilizadas como vacuna son capaces de generar una potente respuesta antitumoral (Aaes y col., 2016).

En base a la experiencia obtenida en los estudios realizados con TAPCells, hemos re-diseñado una alternativa para el tratamiento del melanoma. Esta estrategia consiste en la creación de una vacuna compuesta por lisados tumorales condicionados con calor (TRIMELvax), capaz de activar y generar una respuesta inmune tumor específica, y que pueda ser administrada de manera directa en los pacientes. Para la generación de una inmunoterapia exitosa contra cualquier tipo de cáncer, se debe superar la tolerancia del sistema inmune a antígenos tumorales. Para ello, se ha recurrido al uso de adyuvantes, de los cuales se pueden mencionar las hemocianinas. Las hemocianinas son moléculas de alto peso molecular constituidas de varias subunidades, y que tienen como función principal el transporte de oxígeno en la hemolinfa de algunos moluscos. Se ha descubierto que estas moléculas poseen potentes propiedades inmunoestimulantes en mamíferos, siendo capaces de fortalecer tanto la respuesta inmune innata como adaptable. Las hemocianinas se han utilizado principalmente en la producción de anticuerpos (Becker y col., 2014). Clínicamente, la hemocianina más usada es la denominada KLH, proveniente de la lapa californiana (*Megathura crenulata*), sin embargo, su baja solubilidad y tendencia a generar agregados dificultan su utilización como vehículo para antígenos tumorales, haciendo deseable la búsqueda de nuevas alternativas (Gathuru y col., 2005). Más recientemente, se ha descubierto que la CCH, hemocianina proveniente del loco

(*Concholepas concholepas*), posee propiedades inmunoestimulantes similares a la KLH *in vivo*, potenciando respuestas antitumorales en un modelo murino de cáncer de vejiga (Molledo y col., 2006), además de ser una molécula con una alta solubilidad y estabilidad, ideal para su transporte y almacenaje (Idakieva y col., 2008). La CCH ha sido utilizada previamente como adyuvante en estudios clínicos del laboratorio, en vacunas de DCs para el tratamiento de cáncer de próstata. En este estudio se observó que la combinación de DCs tratadas *ex vivo* con CCH fue capaz de inducir respuestas inmunes de memoria en los pacientes tratados con la vacuna, lo que fue comprobado mediante ensayos de hipersensibilidad retardada (DTH) (Reyes y col., 2013), mostrando el potencial de la CCH para ser utilizado como un adyuvante alternativo a la KLH en vacunas para pacientes con variados tipos de cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, los lisados tumorales alogénicos condicionados con calor (TRIMEL) establecidos en nuestro laboratorio son una importante fuente de antígenos y señales de peligro, lo que los convierte en un valioso recurso para la generación de nuevos tratamientos inmunoterapéuticos. La generación de una vacuna de lisados tumorales alogénicos condicionados conlleva múltiples ventajas: estandarización de su preparación, producción a gran escala, el uso de un lote único de vacunas para todos los pacientes, independiente de su haplotipo, y se elimina la variabilidad en la calidad y composición de las vacunas facilitando los análisis clínicos. Finalmente, la creación de una vacuna efectiva en el tratamiento de melanoma, que además sea sencilla de producir y almacenar, podría dar la base para expandir esta clase de vacuna a otros tipos de cáncer.

Hipótesis

La nueva vacuna contra melanoma TRIMELvax[®], en combinación con lisados tumorales murinos condicionados, induce respuestas inmunes celulares y humorales capaces de inhibir específicamente el crecimiento tumoral en un modelo murino.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar la capacidad profiláctica y terapéutica de la vacuna TRIMELvax[®] para generar una respuesta inmune celular y humoral contra antígenos asociados a melanoma e inhibir el crecimiento tumoral *in vivo*, con el fin de estudiar su potencial utilización en futuros estudios clínicos.

Objetivos específicos

1. Evaluar la progresión del crecimiento tumoral del melanoma B16-F10 mediado por TRIMELvax[®] en ratones inmunocompetentes C57BL/6 en un modelo profiláctico y terapéutico.
2. Determinar la respuesta inmune antitumoral generada por TRIMELvax[®] mediante la medición de la activación, proliferación y secreción de citoquinas de linfocitos T en ratones C57BL/6 inmunizados y controles, a través de citometría de flujo.
3. Evaluar la inducción de respuestas inmunes humorales generadas por TRIMELvax[®], mediante mediciones de anticuerpos en el suero de animales inmunizados y controles.

MATERIALES Y METODOS

Ratones.

Para todos los experimentos realizados en este estudio, se utilizaron ratones de la especie *Mus musculus* cepa C57BL/6 adquiridos al Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME, USA) y actualmente presentes en el Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile. Todos los ratones utilizados fueron hembras de 8-12 semanas de edad, y fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos en el Bioterio de Alta Seguridad, ICBM, Facultad de Medicina Norte, Universidad de Chile. Los animales inoculados con células tumorales fueron sacrificados luego de 18-19 días de realizado este procedimiento o cuando el tumor alcanzó un diámetro no superior a 1,5 cm. Todos los procedimientos realizados en los animales fueron aprobados por el Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Generación de lisados tumorales condicionados y de la vacuna TRIMELvax®.

Para la generación de TRIMELvax®, células del melanoma murino B16-F10 fueron crecidas en botellas de cultivo celular en medio RPMI 1640 (Corning Inc.) suplementado con 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB; Corning Inc.) y 1% v/v de Penicilina/Estreptomina (Corning Inc.) hasta confluencia. Luego, las células fueron recuperadas mediante PBS 1X 2mM EDTA, contadas y cultivadas en medio comercial AIM-V (Gibco®, Life Technologies). Las células B16-F10 fueron sometidas a estrés térmico, incubándolas a 42°C por una hora y luego a 37°C por 2 horas. Posteriormente, las células fueron lisadas con tres ciclos de congelación y descongelación en nitrógeno

líquido, y la concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford. Los lisados fueron almacenados a -20°C hasta su utilización. Para la generación de esta nueva vacuna, se generó una mezcla de lisado B16-F10 más TRIMEL, lisado de melanoma humano, más un adyuvante inmunocianina (Biosonda). La composición exacta de TRIMELvax[®] se mantiene en reserva por razones de protección intelectual, y se prepara en un volumen de 160 μl /dosis.

Evaluación del crecimiento tumoral en ratones inmunizados con TRIMELvax[®] de lisados condicionados.

Para evaluar el efecto de TRIMELvax[®] en un protocolo profiláctico, ratones hembras C57BL/6 fueron inyectados de manera subcutánea, y en el flanco izquierdo del lomo, con tres dosis de TRIMELvax[®] a los días 19, 9 y 2 previos a la inyección de las células tumorales B16-F10. Como controles experimentales, ratones hembras fueron inyectados con tres dosis de PBS 1X, sólo adyuvante, y sólo lisados tumorales condicionados con calor (sin adyuvante). Posteriormente, $1,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16-F10 (el cual posee muchos de los antígenos descritos en melanoma humano, como gp100, MART-1 y TRP1 (Overwijk & Restifo, 2001)) fueron inyectadas de manera subcutánea en el flanco derecho del lomo de ratones previamente vacunados. Fueron utilizados cinco ratones por condición en cada experimento.

Para determinar el efecto de TRIMELvax[®] en un protocolo de inmunización terapéutico, ratones hembras C57BL/6 fueron inyectadas de manera subcutánea en el flanco derecho del lomo con $2,5 \times 10^4$ células del melanoma murino B16-F10. Posteriormente, a los días 1, 6 y 12, los ratones fueron inyectados con tres dosis de TRIMELvax[®] de manera subcutánea en el flanco contrario al lugar de inoculación de las células B16-F10. Como controles se utilizó PBS 1X (control positivo de crecimiento)

y los componentes de la vacuna por separado. Fueron utilizados cinco ratones por condición en cada experimento.

En ambos protocolos de vacunación, los tumores se hacen palpables aproximadamente al día 7 y desde ese momento se realizaron mediciones cada 2 o 3 días mediante un calíper digital. El crecimiento tumoral fue analizado hasta el día 18 (modelo profiláctico) o 19 (modelo terapéutico) post-inyección de las células B16-F10. El volumen tumoral fue calculado con la fórmula que se muestra a continuación:

$$\text{Volumen} = \frac{\text{Largo} \cdot \text{Ancho}^2}{2}$$

Obtención de leucocitos desde tumor y bazo.

Al término de los experimentos, los ratones fueron sacrificados y se les extrajo el tumor, el cual fue mantenido y disgregado en medio HBSS 1X (Gibco®, Life Technologies) con 5% SFB (Corning Inc.). La suspensión celular fue traspasada a un tubo de centrifugación de 15 ml y llevado a 4,5 ml con medio HBSS 1X + 5% SFB, para posteriormente agregar 500 ul de Colagenasa D (10 mg/ml, Roche) y 25 ul de DNAsa (10 mg/ml, Roche). El tumor fue incubado bajo estas condiciones por 30 minutos a 37°C.

Luego de la digestión, las células fueron pasadas por un *cell strainer* de 70 um, recibidas en un tubo de 50 ml, y lavadas con medio HBSS 1X + 5% SFB hasta obtener 10 ml totales. Las células fueron centrifugadas a 500g por 5 minutos y luego incubadas por 5 minutos a 4°C en buffer de lisis RBC 1X (Biolegend). Luego, fueron llevadas a 10 ml con HBSS 1X + 5% SFB, centrifugadas a 500g por 5 minutos y resuspendidas en 3 ml de Percoll 40% (GE Healthcare). Las células fueron traspasadas a un tubo de 15 ml y utilizando una pipeta pasteur de vidrio fue adicionado el mismo volumen de Percoll

70% (aproximadamente 3 ml) debajo de las células, lentamente y cuidando de no mezclar ambas fases. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 750g por 20 minutos a temperatura ambiente con aceleración y desaceleración baja (0 y 1, respectivamente). Luego de la generación del gradiente de densidad, los leucocitos fueron recuperados desde la fase intermedia mediante una micropipeta, traspasados a un tubo de 15 ml nuevo y lavadas con medio HBSS 1X + 5% SFB para su posterior utilización.

Para obtener las células del bazo, se realizó el mismo procedimiento, con la excepción de que no se realizó el gradiente de densidad por Percoll.

Citometría de flujo.

Las poblaciones celulares presentes en tumor y bazo fueron analizadas mediante citometría de flujo. Para los marcajes extracelulares, las células obtenidas fueron resuspendidas en PBS 1X (Gibco®, Life Technologies) para el uso del kit de marcaje de células muertas LIVE/DEAD® Fixable Blue (Thermo Fisher), con el cual se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a lavar las células con 500 ul de PBS 1X, centrifugarlas a 2600 rpm por 6 minutos, y resuspenderlas en una solución de PBS 1X + 2% SFB y FcBlock® de ratón (Biolegend) por 15 minutos a 4°C y oscuridad. Posteriormente, las células fueron lavadas, centrifugadas a 2600 rpm por 6 minutos y resuspendidas en 50 ul de PBS 1X + 2% SFB, para ser incubadas por 20 minutos a 4°C (en oscuridad), con los siguientes anticuerpos monoclonales: α -mCD3 (FITC) (Miltenyi), α -mCD4 (APC-Cy7) (Biolegend), α -mCD8 (V500) (Biolegend), α -mCD11c (APC) (eBiosciences), α -mCD25 (APC) (Biolegend), α -mCD44 (PE-Cy7) (Biolegend), α -mCD45RA (PerCP) (BD Biosciences), α -mCD62L (PE) (eBiosciences), α -mCD69 (APC) (Biolegend), α -mNK1.1 (PE-CY7)

(eBiosciences) y α -m-A[b] (FITC) (BD Pharmingen™). Luego, las células fueron lavadas con 700 μ l de PBS 1x + 2% SFB, centrifugadas y resuspendidas en 300 μ l de buffer FACS (BD Biosciences) para finalmente ser analizadas en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences).

Para analizar la presencia de LT reguladores y la expresión de granzima B, se realizó un marcaje extra e intracelular. El marcaje extracelular se realizó como se describió anteriormente (incluyendo el marcaje con LIVE/DEAD® y el paso con Fc Block®), utilizando los siguientes anticuerpos: α -mCD3 (FITC) (Miltenyi), α -mCD4 (APC-Cy7) (Biolegend), α -mCD8 (V500) (Biolegend), α -mCD25 (APC) (Biolegend), α -mCTLA-4 (PerCP) (Biolegend) y α -mLag3 (PE-Cy7) (eBiosciences). Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 300 μ l de buffer Fix/Perm 1X (eBiosciences) e incubadas por 30 minutos a 4°C. Luego, se agregaron 700 μ l de buffer de lavado (eBiosciences) a cada tubo con células, y se centrifugaron a 3200 rpm por 8 minutos. Los leucocitos fueron resuspendidos en buffer de lavado e incubados por 30 minutos a 4°C (en oscuridad), con los siguientes anticuerpos monoclonales: α -mFoxP3 (PE) (eBiosciences), α -mKi67 (PerCP) (eBiosciences) y α -mGranzimaB (APC) (Biolegend). Finalmente, las células fueron lavadas con 700 μ l de buffer de lavado, centrifugadas a 3200 rpm por 8 minutos, y luego resuspendidas en 300 μ l de PBS 1X + 2% SFB para ser analizadas en el citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences).

Por último, se realizó un marcaje para el análisis de la expresión de citoquinas por parte de los linfocitos T tanto en tumor como en bazo. Para ello, fue realizada una activación previa de las células. Éstas fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células por ml en medio RPMI suplementado. Se agregaron a las células; PMA (15 ng/ml; Sigma-Aldrich), Ionomicina (1 μ g/ml; Sigma-Aldrich) y Brefeldina A (1X; eBiosciences), y se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 4 horas. Posterior a ese

tiempo, las células fueron recuperadas y utilizadas en marcaje extracelular con los siguientes anticuerpos: α -mCD3 (FITC) (Miltenyi), α -mCD4 (APC-Cy7) (Biolegend), α -mCD8 (V500) (Biolegend) y α -mCD25 (APC) (Biolegend); y en marcaje intracelular con los anticuerpos mostrados a continuación: α -mIL-17 (V450) (eBiosciences) y α -mIFN-g (PE) (eBiosciences). Ambos procedimientos se realizaron según lo descrito anteriormente. Finalmente, las células fueron analizadas mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo FACSVerse (BD Biosciences).

Medición de anticuerpos en suero de ratones inmunizados con la vacuna TRIMELvax®.

Para analizar la presencia de anticuerpos inducidos por la vacuna, se recolectó la sangre al día 19 de crecimiento tumoral, la cual se dejó coagular a 4°C durante toda la noche, y se centrifugó a 600g por 10 minutos. El suero obtenido fue guardado a -20°C hasta su utilización.

Para la detección de anticuerpos, se utilizaron 1×10^5 células blanco, ya sea B16-F10, linfocitos de sangre periférica (PBL) humanos, o una mezcla de las líneas de melanoma humano utilizadas en la generación de la vacuna. Los sueros fueron agregados sobre las células blanco a una razón de 1:20 (2,5 μ l), y se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos. Posteriormente, se agregaron a los tubos 700 μ l de PBS 1X + 2% SFB y se centrifugaron a 2600 rpm por 6 minutos. Se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en una solución de 50 μ l de PBS 1X + 2% SFB con un anticuerpo α -mIgG (Alexa Fluor 488) (Invitrogen), y se incubaron durante 30 minutos a 4°C, en oscuridad. Finalmente, las células fueron lavadas con 700 μ l de PBS 1X + 2% SFB, centrifugadas a 2600 rpm por 6 minutos y resuspendidas en 300 μ l de PBS + 2% SFB para su análisis por citometría de flujo.

Análisis estadístico.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa computacional GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc.). Para todos los experimentos y análisis realizados se utilizó la prueba ANOVA de una vía con una prueba posterior de Tukey para comparar los distintos pares de condiciones. En todos los casos se fijó el nivel de significancia mínimo en P menor a 0,05.

RESULTADOS

(1) La vacuna de lisados tumorales condicionados TRIMELvax[®] disminuye el crecimiento tumoral del melanoma murino B16-F10 en un modelo profiláctico.

Como primera aproximación, estudiamos el efecto antitumoral de la vacuna TRIMELvax[®] en el modelo de melanoma murino B16-F10 profiláctico, es decir, las inmunizaciones anteriores al desafío con células tumorales. Grupos de cinco ratones recibieron tres dosis de la vacuna según se muestra en la figura 2. Dos días posteriores a la última dosis, los animales fueron desafiados con $1,5 \times 10^5$ células B16-F10 vivas por vía s.c.

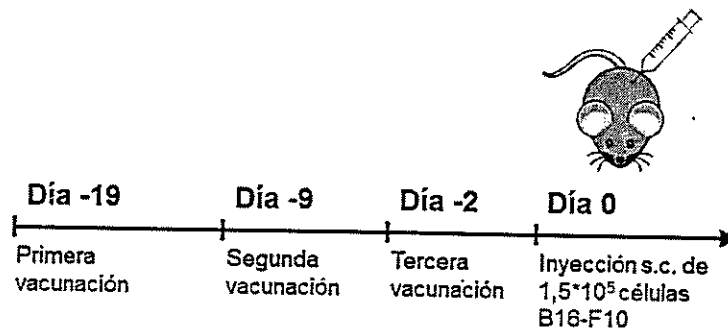


Figura 2. Protocolo de tratamiento profiláctico. Esquema que muestra el protocolo de inmunizaciones utilizado para evaluar el efecto antitumoral de la vacuna TRIMELvax[®]. Ratones hembras C57BL/6 fueron inyectados de manera subcutánea (s.c.), en el flanco izquierdo del lomo, con tres dosis de PBS, adyuvante, lisados tumorales o la vacuna a los días 19, 9 y 2 previos al desafío con las células tumorales. Posteriormente, $1,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16-F10 fueron inyectadas de manera subcutánea en el flanco derecho del lomo.

Los datos presentados en la figura 3 indican que los tumores crecen en todos los grupos de animales experimentales con la misma temporalidad, y que la vacunación sólo con lisado o con adyuvante fallan en generar protección contra el tumor, al compararlos con el control con PBS. Sin embargo, la combinación de ambos componentes induce una significativa disminución del crecimiento tumoral en ratones con melanoma, el cual es especialmente notorio al día 18 post-inyección de las células B16-F10. El efecto producido por la vacuna en el crecimiento tumoral fue significativo a partir del día 14 post-inoculación de las células tumorales.

Estos resultados demuestran que la vacuna de lisados tumorales condicionados genera una efectiva respuesta antitumoral en un modelo de vacunación profiláctico.

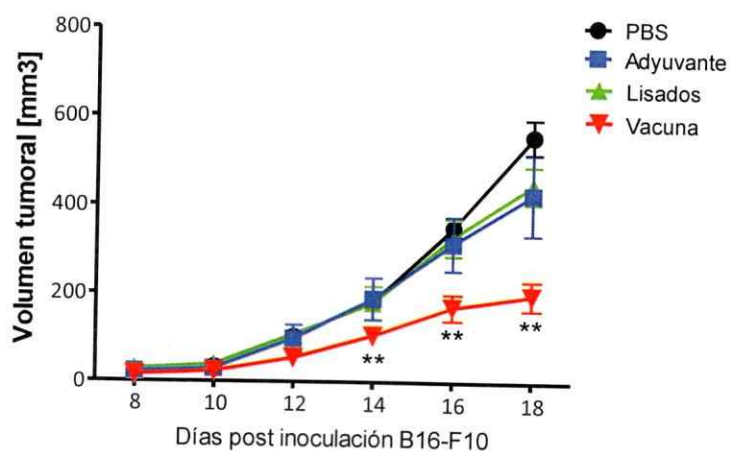


Figura 3. Eficacia profiláctica de TRIMELvax® en el modelo de melanoma murino B16-F10. Ratones C57BL/6 fueron inyectados de manera subcutánea (s.c.) en el lomo, con tres dosis de PBS, adyuvante, lisados tumorales o la vacuna TRIMELvax® a los días 19, 9 y 2 previos a la inyección de las células tumorales. Posteriormente, $1,5 \times 10^5$ células de melanoma murino B16-F10 fueron inyectadas de manera subcutánea en el flanco derecho del lomo. El gráfico muestra los resultados de un experimento representativo, y se utilizaron cinco ratones por condición en cada experimento. Los gráficos muestran la media \pm S.D. (desviación estándar), y las diferencias entre la vacuna y la condición con PBS. ** = $P < 0,01$.

(2) La vacuna TRIMELvax® disminuye el crecimiento tumoral en un modelo terapéutico de melanoma murino B16-F10.

Hemos demostrado que la terapia TRIMELvax® induce una disminución del crecimiento tumoral, estadísticamente significativo en un modelo profiláctico. Nuestra hipótesis busca demostrar que resultados similares pueden ser obtenidos desde un modelo de tratamiento terapéutico en el mismo modelo de melanoma. El protocolo de vacunación utilizado se muestra en la figura 4.

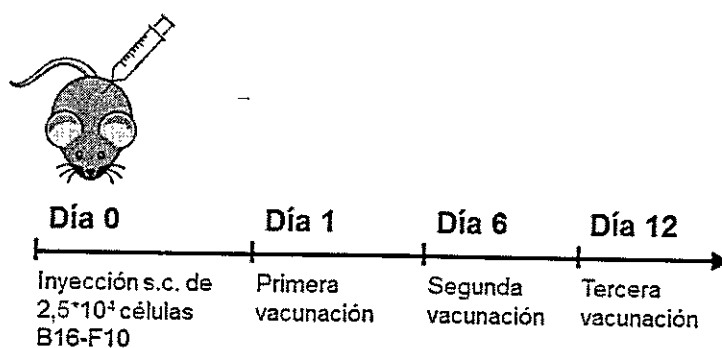


Figura 4. Protocolo de tratamiento terapéutico. Esquema que muestra el protocolo de inmunizaciones utilizado para evaluar el efecto antitumoral de la vacuna TRIMELvax®. Ratones hembras C57BL/6 fueron inyectados de forma s.c. con $2,5 \cdot 10^4$ células B16-F10, y a los días 1, 6 y 12 posteriores se les administró PBS, adyuvante, lisados tumorales o la vacuna de forma s.c. en el flanco opuesto del lomo a la inyección de las células tumorales.

Como se observa en las figuras 5A y 6, correspondientes a dos experimentos independientes, los tumores crecen en todos los grupos de animales con la misma temporalidad, y nuevamente observamos que la vacunación sólo con lisado o con adyuvante fallan en generar protección contra el tumor, al compararlos con el control con PBS. Sin embargo, la combinación de ambos componentes induce una significativa protección en ratones con melanoma, el cual es notorio al día 19 post-inyección de las células B16-F10. En el primer experimento realizado, la media de

volumen tumoral al día 19 para los ratones inyectados con la vacuna fue de $179,9 \pm 91,1 \text{ mm}^3$, mientras que los controles, la media fue de $368,8 \pm 175,9 \text{ mm}^3$ (PBS), $341,8 \pm 99,86 \text{ mm}^3$ (Adyuvante) y $401,4 \pm 169,6 \text{ mm}^3$ (Lisados). A pesar de la tendencia observada, no obtuvimos diferencias significativas con la cantidad de ratones utilizados por condición ($n = 4-5$) en este experimento. En el segundo experimento, la media de volumen tumoral al día 19 para los ratones fue: $211,4 \pm 85,5 \text{ mm}^3$ (Vacuna), $341,6 \pm 47,9 \text{ mm}^3$ (PBS), $397,1 \pm 70,37 \text{ mm}^3$ (Adyuvante) y $509,8 \pm 120,3 \text{ mm}^3$ (Lisados). En este caso, hubo diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre los ratones tratados con la vacuna y los ratones controles inyectados con adyuvante o con los lisados tumorales. No se observaron diferencias significativas al comparar los ratones tratados con la vacuna y los inyectados con PBS (control negativo) con el número de animales analizados, aunque se logra ver una clara tendencia (figuras 5A y 6). En ambos experimentos realizados, observamos un mayor crecimiento tumoral en los ratones inyectados solo con lisados tumorales en comparación a las demás condiciones estudiadas (figura 6).

Tomando en consideración los datos de volumen tumoral para el último día de crecimiento (día 19), de ambos experimentos independientes, observamos una disminución significativa del crecimiento tumoral en los ratones tratados con TRIMELvax® en comparación a todas las condiciones controles (figura 5B). En ambos experimentos realizados, no se observaron diferencias significativas en los días de medición previos al día 19.

Estos datos demuestran fuertemente, que la vacuna basada en lisados tumorales condicionados representa una estrategia promisoriosa y eficaz para el tratamiento terapéutico del melanoma.

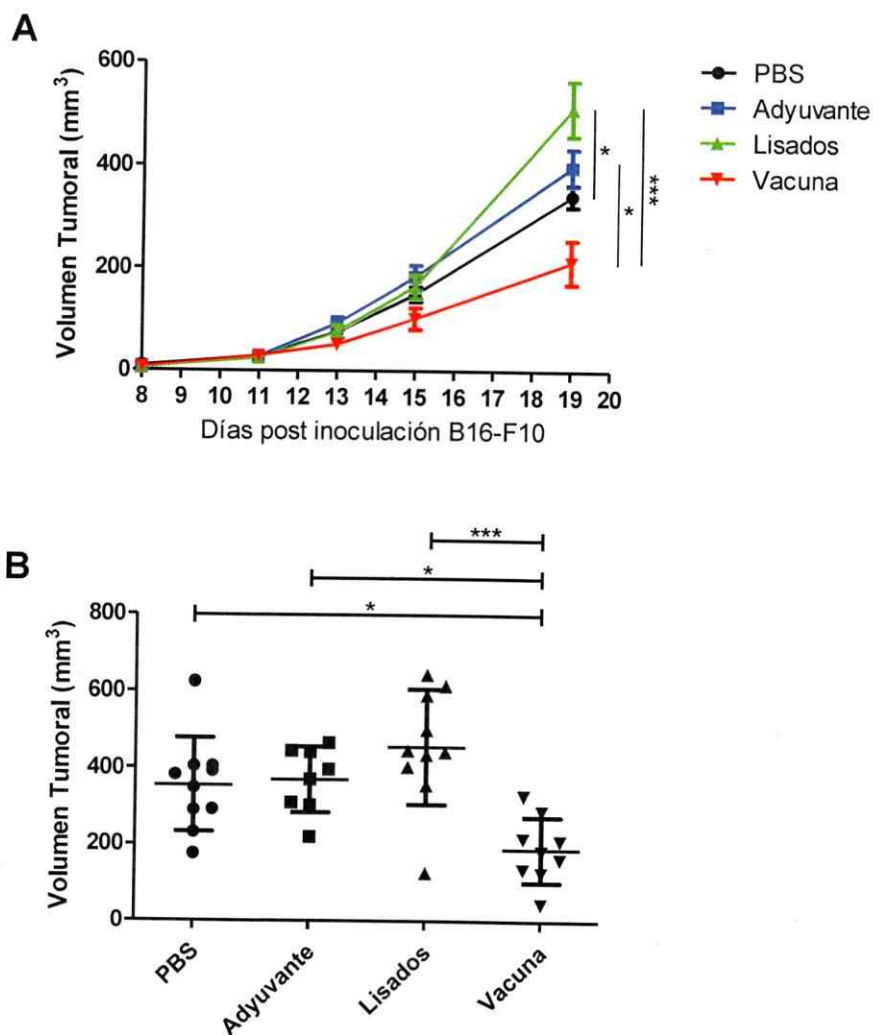


Figura 5. Eficacia terapéutica de la vacuna TRIMELvax[®] en el modelo de melanoma murino B16-F10. Ratones C57BL/6 ($n=10$ ratones/grupo) fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c, y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con TRIMELvax[®]. (A) Gráfico representativo (de dos experimentos independientes) de la progresión del volumen tumoral (mm^3) en el tiempo (días). (B) Análisis de los datos obtenidos en dos experimentos independientes para el día 19 de crecimiento tumoral de los ratones bajo estudio, día en el que se observaron las mayores diferencias entre las distintas condiciones. Los gráficos muestran la media \pm S.D. (desviación estándar). * = $P < 0,05$; *** = $P < 0,001$.

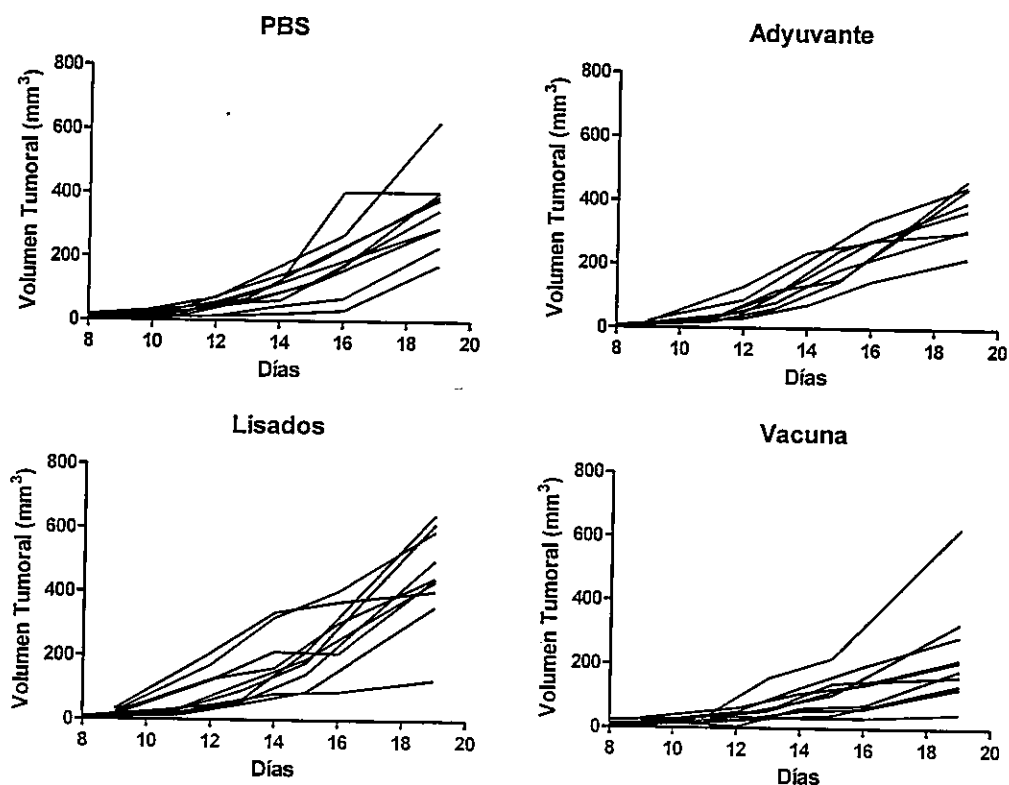


Figura 6. Progresión del crecimiento tumoral en animales con melanoma inmunizados con TRIMELvax®. Los gráficos muestran la progresión del volumen tumoral (mm³) en el tiempo para dos experimentos independientes. Los ratones fueron agrupados por condición experimental.

(3) TRIMELvax® no afecta la infiltración de poblaciones inmunes al tumor, pero sí la activación de linfocitos T CD8+ y células NK.

Para comprender los mecanismos celulares subyacentes al efecto terapéutico observado con TRIMELvax®, analizamos en primera instancia, la abundancia de diferentes poblaciones celulares presentes en los tumores de los ratones en tratamiento. En la figura 7, se muestra la estrategia de selección de la población linfocítica presente en los tumores y el descarte de las células muertas (mediante un marcador de viabilidad comercial).

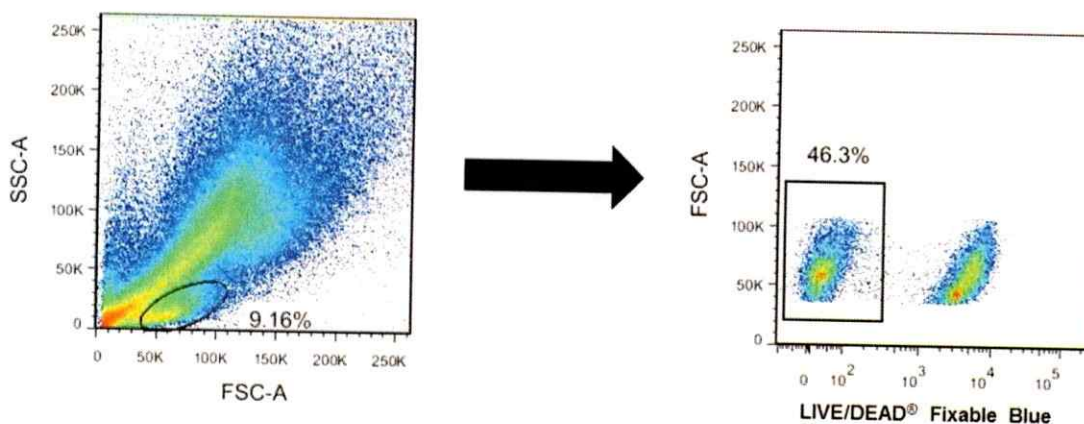


Figura 7. Estrategia de selección de la población linfoide intratumoral a través de citometría de flujo. Mediante un gráfico de tamaño/complejidad (FSC/SSC) se seleccionó la población concordante con las células del sistema inmune (gráfico de la izquierda). Posteriormente, se seleccionaron las células vivas presentes en la población linfoide mediante la utilización de un marcador de viabilidad LIVE/DEAD® comercial (gráfico de la derecha). Las células seleccionadas de esta forma fueron utilizadas para los análisis posteriores.

Posteriormente, dentro de la población linfoide previamente seleccionada, determinamos la presencia de LT CD4+ (figura 8A), LT CD8+ (figura 8B), células NK (figura 8C), células NKT (NKT-like) (figura 8D), y células dendríticas (DCs) (figura 8E), mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 8, en ninguno de los tratamientos realizados obtuvimos diferencias significativas ni tendencias en el porcentaje de las distintas poblaciones celulares analizadas.

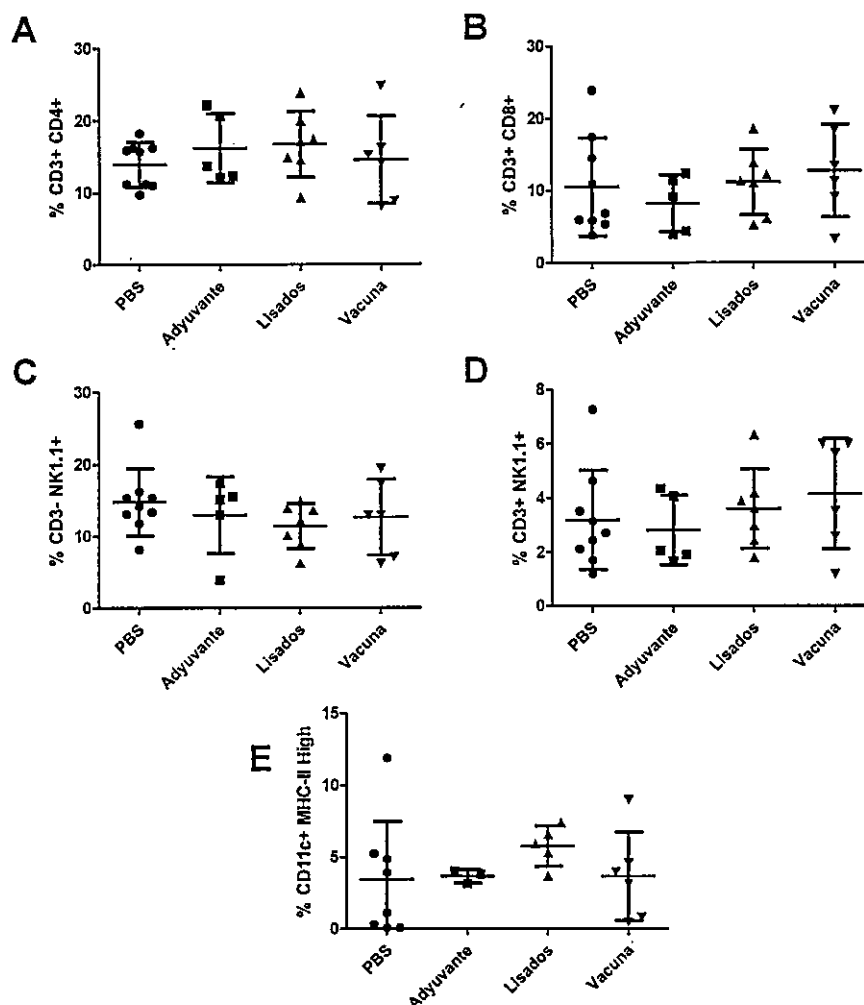


Figura 8. Infiltración de linfocitos T, células NK y DCs en tumores de animales inmunizados. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c. y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con TRIMELvax[®]. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo la abundancia de distintas poblaciones inmunes en el sitio tumoral: (A) LT CD4+, (B) LT CD8+, (C) células NK, (D) células tipo NKT, y (E) células dendríticas. Los gráficos muestran la media \pm S.D. del porcentaje de células positivas para los marcadores respectivos, para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 3 a 9 ratones por condición experimental, de dos experimentos independientes.

Posteriormente, analizamos la presencia en tumor de diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4+, los cuales podrían explicar el efecto protector de la vacuna en

animales con melanoma. Para esto, determinamos la abundancia de LT reguladores, y LT helper de tipo 1 y 17 (Th1 y Th17). Específicamente estudiamos el marcador Foxp3 para LT reguladores, y las citoquinas IFN- γ e IL-17 para los linfocitos Th1 y Th17 respectivamente, todos mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la tabla 2, en ninguno de los casos anteriormente mencionados obtuvimos diferencias significativas entre los ratones inmunizados con TRIMELvax[®] y los controles. Se observa una tendencia al aumento en la población de linfocitos Th17 en el tratamiento con la vacuna respecto a las demás condiciones, pero que no es significativa debido a la variabilidad de los datos obtenidos y a su baja cantidad.

Los LT vírgenes expresan moléculas necesarias para la entrada a los linfonodos tales como CD62L y CD45RA. Una vez dentro, los linfocitos T son capaces de reconocer antígenos específicos presentados por células dendríticas a través de su TCR, provocando la reducción de la expresión de las moléculas descritas, y la expresión de otros marcadores tales como CD69 y CD25 (cadena α del receptor de IL-2), moléculas importantes para la activación y proliferación de estas células. Junto con analizar la infiltración de células del sistema inmune al sitio tumoral, y para descartar que estas se encuentren en un estado de reposo o anergia, estudiamos el estado de activación de los LT mediante los marcadores CD25, CD62L y CD45RA, a través de citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 9A, el porcentaje de LT CD4+CD25+ intratumorales entre las distintas condiciones en estudio se mantiene constante, al igual que el porcentaje de LT CD4+ vírgenes (CD62L+ CD45RA+). Por el contrario, se observa un incremento significativo en el porcentaje de células CD8+ CD25+ en tumores de ratones inyectados con lisados tumorales y una tendencia al aumento en los ratones con adyuvante e inmunizados con la vacuna, en comparación al control con PBS (figura 9B). En adición, observamos una disminución en el

porcentaje de LT CD8+ vírgenes en ratones inmunizados con la vacuna al compararlos con el control con PBS, aunque esta diferencia no llega a ser significativa.

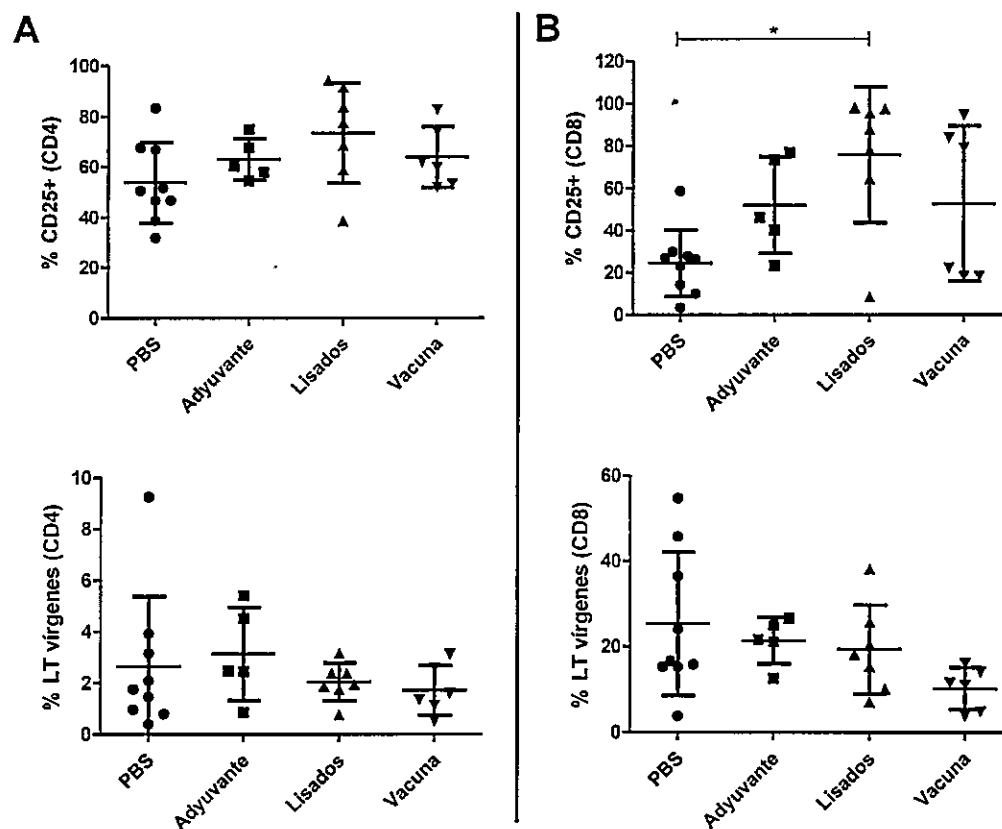


Figura 9. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales poseen un mayor porcentaje de LT CD8+ activados en el sitio tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c, y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo la activación de LT CD4+ (A) y CD8+ (B) en el sitio tumoral. Los gráficos muestran la media \pm S.D. del porcentaje de células positivas para los marcadores respectivos, para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 5 a 9 ratones por condición experimental, para dos experimentos independientes. * = $P < 0,05$.

Debido a que los LT CD8 son importantes en la respuesta inmune antitumoral, analizamos la función de estas células mediante la expresión de granzima B, proteínas

que son liberadas a la superficie de la célula diana desde los gránulos citotóxicos, y que gatillan la muerte celular. Como se puede observar en la tabla 2, animales con melanoma inmunizados con lisados tumorales y con la vacuna poseen un incremento en la abundancia de la población de linfocitos T CD8+ GranzimaB+ (aunque no significativo con el número de datos analizados) comparado con las condiciones con PBS o con adyuvante.

- Debido a que las células NK participan en la respuesta inmune antitumoral, determinamos el estado de activación de estas células en el tumor de los animales con melanoma sometidos a los diferentes tratamientos. Para ello, analizamos la expresión de la molécula CD69, marcador de activación típico de estas células. Como se puede observar en la figura 10, tanto en las células NK (10A) como en las NKT (10B), ratones con tumor B16-F10 inmunizados con lisados tumorales existe un incremento significativo en el porcentaje de células CD69+ comparado con animales controles inmunizados con PBS. Este aumento también se observa en tumores de ratones inmunizados con la vacuna o con el adyuvante, el cual no logra ser significativo con el número de datos analizados.

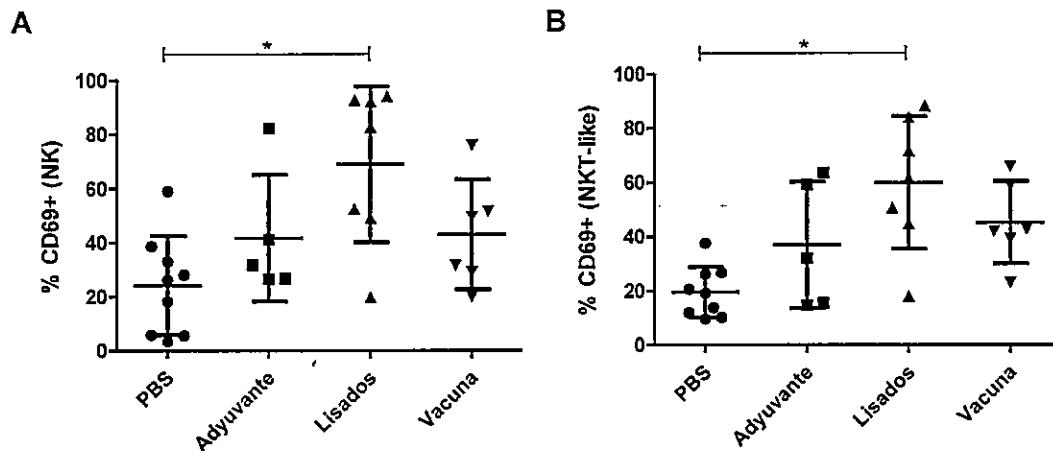


Figura 10. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales poseen un mayor porcentaje de células NK y NKT-like activadas en el sitio tumoral. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c. y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo la abundancia de células NK (A) y tipo NKT (B) activadas dentro del sitio tumoral. Los gráficos muestran la media \pm S.D. del porcentaje de células CD69+ para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 5 a 9 ratones por condición experimental, para dos experimentos independientes. * = $P < 0,05$.

Finalmente, estudiamos la proliferación de los linfocitos infiltrantes de tumor mediante el marcador Ki67, proteína que se expresa en células que se encuentran en mitosis activa, pero no en células en reposo. Como se ve en la tabla 2, no se observan diferencias en la proliferación de linfocitos infiltrantes de tumor entre las distintas condiciones analizadas (LT CD4 y LT CD8).

Tabla 2. Subpoblaciones y características de los LT infiltrantes de tumor de los ratones bajo estudio. Los porcentajes están representados como media \pm SD.

Población celular	Tipo celular	Porcentaje de células presente (%)			
		PBS	Adyuvante	Lisados	TRIMELvax
Foxp3+	LT CD4+	21,96 \pm 4,44	21,85 \pm 4,77	25,62 \pm 6,35	24,80 \pm 3,19
IFN- γ +	LT CD4+	4,16 \pm 1,94	4,11 \pm 0,79	4,77 \pm 1,73	5,27 \pm 4,23
IL-17+	LT CD4+	3,45 \pm 1,75	0,69 \pm 0,08	3,44 \pm 2,70	6,94 \pm 6,84
GranzimaB+	LT CD8+	12,95 \pm 7,71	10,91 \pm 4,22	37,53 \pm 27,13	36,13 \pm 19,73
Ki67+	LT CD4+	61,60 \pm 12,90	57,70 \pm 12,94	63,80 \pm 8,18	58,75 \pm 13,43
	LT CD8+	24,18 \pm 16,93	18,47 \pm 4,90	22,10 \pm 10,16	20,73 \pm 5,96

(4) Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELvax[®] aumentan el número y la activación de LT en bazo.

Motivados por entender la disminución del crecimiento tumoral en animales inmunizados con TRIMELvax[®], quisimos determinar lo que ocurre en bazo de los ratones con diferentes tratamientos, para tener una imagen general de lo que ocurre en la circulación. En la figura 11, se muestra la estrategia de selección de la población linfóide presente en el bazo y el descarte de las células muertas (mediante un marcador de viabilidad comercial).

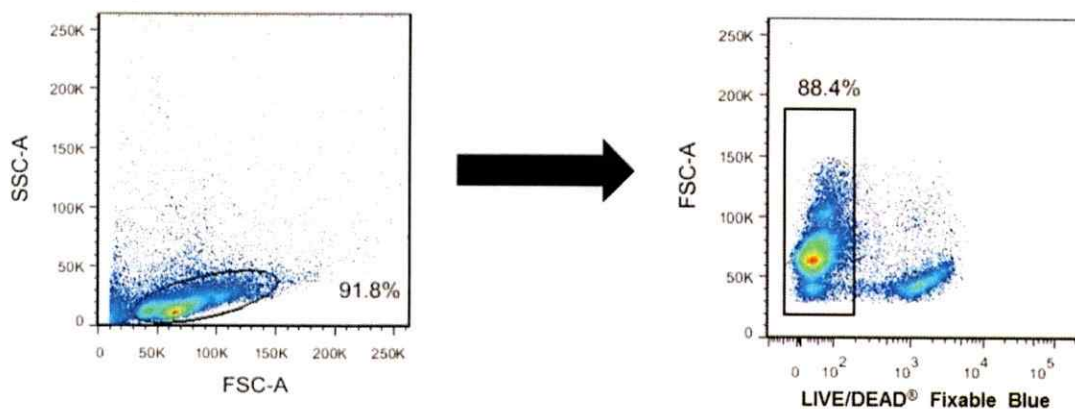


Figura 11. Estrategia de selección de la población linfóide en bazo. Mediante un gráfico de tamaño/complejidad (FSC/SSC) se seleccionó la población concordante con las células del sistema inmune (gráfico de la izquierda). Posteriormente, se seleccionaron las células vivas presentes mediante la utilización de un marcador de viabilidad LIVE/DEAD[®] comercial (gráfico de la derecha). Las células seleccionadas de esta forma fueron utilizadas para los análisis posteriores.

Posteriormente, dentro de la población linfoide previamente seleccionada, analizamos la abundancia de LT tanto CD4+ (figura 12A) como CD8+ (figura 12B), células NK (figura 12C) y tipo NKT (NKT-like) (figura 12D), y DCs (figura 12E), mediante citometría de flujo. En la figura 12, observamos un incremento significativo en el número de LT CD4+ presentes en bazo de ratones inyectados con la vacuna al compararlos con los controles (figura 12A). En el caso de los LT CD8+ y de las células tipo NKT obtuvimos resultados similares, con un aumento de su número en los ratones tratados con la vacuna, el cual es significativo al compararlo con los controles con adyuvante y con lisados tumorales, pero no con PBS, para la cantidad de datos analizados.

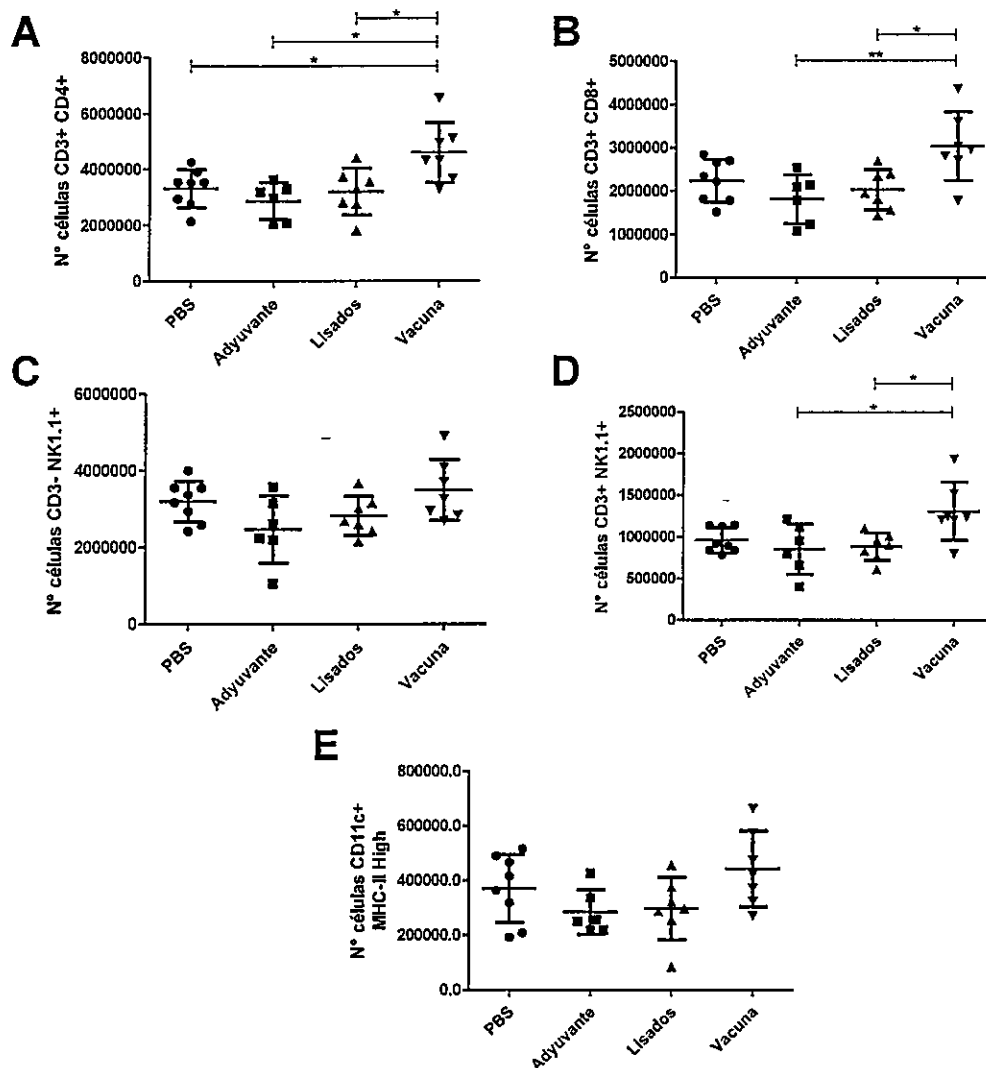


Figura 12. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELvax® poseen un mayor número de linfocitos T en bazo. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c. y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo la abundancia de distintas poblaciones celulares en el bazo de los ratones bajo estudio: (A) LT CD4+, (B) LT CD8+, (C) células NK, (D) células tipo NKT, y (E) células dendríticas. Los gráficos muestran la media \pm S.D. del número absoluto de células positivas para los marcadores respectivos, para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 6 a 8 ratones por condición experimental. * = $P < 0,05$.

Adicionalmente, analizamos la presencia en el bazo de diferentes subpoblaciones de LT CD4+, como LT reguladores (Foxp3), linfocitos Th1 (IFN- γ), y linfocitos Th17 (IL-17). Este análisis se realizó dentro de la población de LT CD4+, mediante la técnica de citometría de flujo. Como se puede observar en la tabla 3, en ninguno de los tratamientos se observaron diferencias significativas.

Debido a que observamos que los LT CD8+ infiltrantes de tumor se encontraban en un mayor estado de activación en los ratones inmunizados con la vacuna en comparación a los controles, quisimos analizar la presencia de LT activados en bazo, para así tener una idea de lo que estaría ocurriendo a nivel sistémico. Para esto, estudiamos mediante citometría de flujo el estado de activación de los LT presentes en el bazo mediante los marcadores CD25, CD62L y CD45RA. Como se puede observar en los resultados mostrados en la figura 13, no encontramos diferencias en el número de células activadas de LT CD4+ ni tampoco en LT CD8+, medido en base a la expresión del marcador CD25+, entre los ratones inmunizados con la vacuna y los con PBS. A pesar de ello, obtuvimos un aumento significativo de LT CD4+ vírgenes (CD62L+ CD45RA+) presentes en el bazo de los ratones a los que se les administró la vacuna en comparación a los controles.

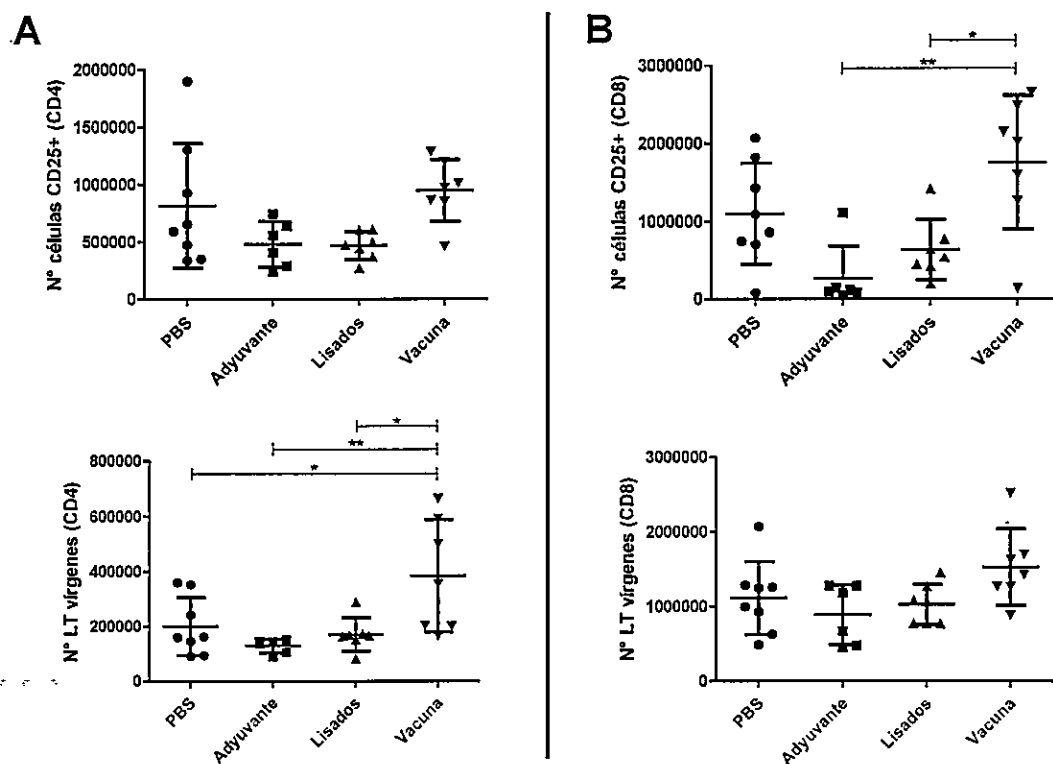


Figura 13. Niveles de activación de LT de bazo de ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con TRIMELVax® o los controles. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c, y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo los niveles de activación de LT CD4+ (A) y CD8+ (B) en bazo de ratones con melanoma inmunizado con los diferentes tratamientos. Los gráficos muestran la media \pm S.D. del número absoluto de células positivas para los marcadores respectivos, para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 6 a 8 ratones por condición experimental. * = $P < 0,05$.

También estudiamos la proliferación de los linfocitos T mediante el marcador intracelular Ki67 en bazo de ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con los diferentes tratamientos. Como se observa en la tabla 3, no observamos diferencias significativas en la proliferación celular de LT CD4+ ni tampoco para LT CD8+ entre las distintas condiciones analizadas.

Con el fin de evaluar la presencia de células NK activadas en lugares alejados

al tumor o que podrían encontrarse en proceso de migración hacia el mismo, analizamos el estado de activación de células NK y tipo NKT presentes en bazo, mediante la medición de CD69. Como se puede observar en la figura 14, no hay diferencias en los niveles de activación de las células NK (14A) y las NKT (14B), entre los ratones inmunizados con la vacuna y los con PBS, aunque se observa cierta tendencia al aumento en el caso de los primeros.

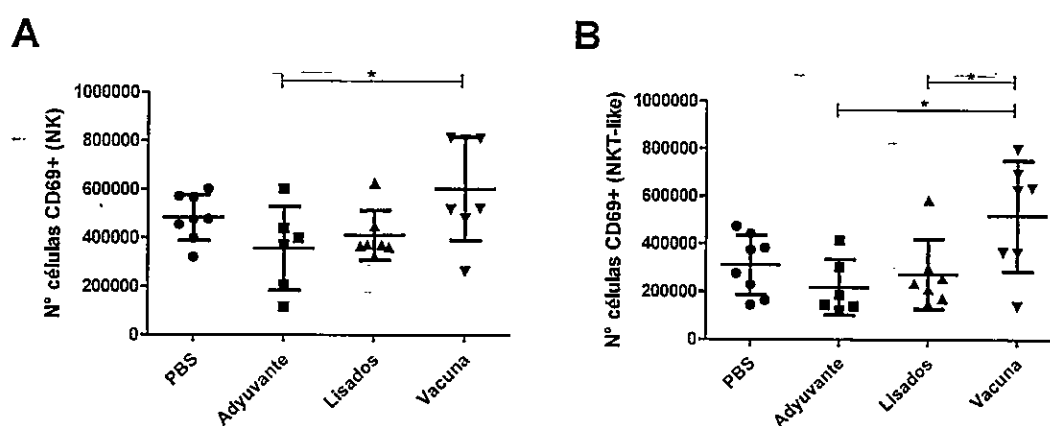


Figura 14. Niveles de activación de células NK y NKT de bazo de ratones con melanoma inmunizadas con TRIMELvax® o los controles. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c, y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales fueron sacrificados y se analizó mediante citometría de flujo los niveles de activación, medido por CD69, en las células NK (A) y tipo NKT (B). Los gráficos muestran la media \pm S.D. del número absoluto de células CD69+ para cada condición en estudio. Se muestran los resultados de entre 6 y 8 ratones por condición experimental.

Tabla 3. Subpoblaciones y características de los LT presentes en bazo de los ratones bajo estudio. Los números absolutos están representados como media \pm SD.

Población	Tipo Celular	Número absoluto de células			
		PBS	Adyuvante	Lisados	Vacuna
Foxp3+	LT CD4+	$1,2 \times 10^5 \pm 5,1 \times 10^4$	$8,2 \times 10^4 \pm 3,9 \times 10^4$	$7,3 \times 10^4 \pm 2,0 \times 10^4$	$8,4 \times 10^4 \pm 3,0 \times 10^4$
IFN- γ +	LT CD4+	$4,0 \times 10^5 \pm 2,3 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 9,6 \times 10^4$	$1,9 \times 10^5 \pm 9,5 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5 \pm 9,7 \times 10^4$
IL-17+	LT CD4+	$1,2 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$	$9,1 \times 10^4 \pm 8,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$
Ki67+	LT CD4+	$1,3 \times 10^5 \pm 4,7 \times 10^5$	$7,6 \times 10^5 \pm 1,0 \times 10^5$	$8,5 \times 10^5 \pm 1,3 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6 \pm 1,6 \times 10^5$
	LT CD8+	$3,6 \times 10^5 \pm 1,1 \times 10^5$	$2,3 \times 10^5 \pm 6,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5 \pm 6,1 \times 10^4$	$3,7 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$

Finalmente, en la tabla 4, se muestran las poblaciones celulares analizadas en bazo en forma de porcentaje, con el fin de complementar la información dada por los números absolutos de células mostrados anteriormente:

Tabla 4. Subpoblaciones y características de los LT presentes en bazo de los ratones bajo estudio, expresado en forma de porcentaje. Los porcentajes están representados como media \pm SD.

Población	Tipo Celular	Porcentaje celular (%)			
		PBS	Adyuvante	Lisados	Vacuna
CD3+CD4+	LT CD4+	10,00 \pm 2,35	10,01 \pm 1,77	10,80 \pm 1,95	13,41 \pm 1,74
CD3+CD8+	LT CD8+	6,74 \pm 1,73	6,29 \pm 1,74	6,87 \pm 1,15	8,82 \pm 1,59
CD3-NK1.1+	NK	9,55 \pm 1,22	8,30 \pm 2,27	9,57 \pm 1,24	10,03 \pm 1,05
CD3+NK1.1+	Tipo NKT	2,90 \pm 0,61	2,92 \pm 0,74	3,04 \pm 0,75	3,76 \pm 0,68
CD11c+MHC-II High	DCs	1,14 \pm 0,42	1,03 \pm 0,22	1,01 \pm 0,38	1,30 \pm 0,34
CD25+	LT CD4+	24,01 \pm 14,10	16,40 \pm 4,59	15,08 \pm 3,69	20,50 \pm 3,60
	LT CD8+	47,46 \pm 23,55	18,64 \pm 21,97	35,07 \pm 17,46	54,86 \pm 23,84
CD62L+CD45RA+	LT CD4+	3,33 \pm 1,49	3,99 \pm 1,17	3,85 \pm 1,56	3,78 \pm 1,34
	LT CD8+	38,66 \pm 12,32	42,32 \pm 15,84	44,89 \pm 15,60	32,57 \pm 22,29
CD69+	NK	15,41 \pm 3,38	12,63 \pm 4,44	14,74 \pm 3,32	16,97 \pm 3,85
	Tipo NKT	35,71 \pm 15,50	25,33 \pm 6,80	31,51 \pm 12,01	38,80 \pm 15,15
Foxp3+	LT CD4+	1,85 \pm 0,53	1,73 \pm 0,69	1,42 \pm 0,26	1,35 \pm 0,34
IFN- γ +	LT CD4+	9,35 \pm 6,22	7,52 \pm 1,61	6,37 \pm 3,33	8,26 \pm 2,39
IL-17+	LT CD4+	3,24 \pm 3,26	2,32 \pm 1,60	3,30 \pm 3,49	4,99 \pm 3,44
Ki67+	LT CD4+	19,96 \pm 7,27	16,73 \pm 2,20	16,78 \pm 2,25	23,53 \pm 5,08
	LT CD8+	9,62 \pm 0,55	7,88 \pm 2,79	8,06 \pm 0,95	10,85 \pm 3,72

(5) Animales con melanoma inmunizados con TRIMELvax[®] o lisados tumorales inducen una respuesta inmune humoral.

Debido a que existen estudios que sugieren un rol beneficioso de los linfocitos B en la respuesta inmune antitumoral (DiLillo y col., 2010, Nelson, 2010) y considerando el aumento inducido por la vacuna de los LT CD4+ presentes en bazo, células clave en la maduración de los LB y en procesos como el cambio de isotipo de los anticuerpos, decidimos evaluar la generación de una respuesta inmune humoral en los ratones

inmunizados con la vacuna.

Para ello, analizamos la presencia de anticuerpos IgG específicos contra células tumorales presentes en el suero de los ratones utilizados en el estudio. Como células blanco para probar la especificidad de los anticuerpos utilizamos: una mezcla de líneas de melanoma humano (Mix Mel), la línea de melanoma murino B16-F10 (usado como modelo tumoral en el experimento), y linfocitos de sangre periférica (PBL) humano (para probar respuesta xenogénica). Como control positivo de producción de anticuerpos IgG, utilizamos suero de ratones inmunizados intraperitonealmente (i.p) con lisados tumorales condicionados.

Como se observa en la figura 15, los sueros de los ratones inmunizados con TRIMELvax[®] o con lisados tumorales poseen un incremento en la cantidad de anticuerpos IgG específicos contra la mezcla de líneas de melanoma utilizada (Mix Mel), reflejado en un aumento en la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la población celular, en comparación a los controles.

Cuando se utilizaron células B16-F10 como blanco para la detección de los anticuerpos, se observó que los sueros de los ratones inmunizados con lisados tumorales o con TRIMELvax[®] poseen anticuerpos contra esta línea, información obtenida desde el aumento en la IMF de los histogramas en la figura 15. Este aumento en la IMF resultó ser más discreto que el observado contra las células de melanoma humano.

Adicionalmente, observamos que los sueros de los ratones inmunizados con lisados tumorales o con TRIMELvax[®] poseen anticuerpos IgG xenogénicos contra células humanas, información obtenida al utilizar PBL humano como células blanco de los anticuerpos. Esto fue evidenciado en el traslado del eje positivo para el anticuerpo α -IgG de toda la población celular de PBL. En contraste, al utilizar los sueros de los

ratones inyectados con PBS o con adyuvante la población se mantiene negativa para el anticuerpo en su totalidad.

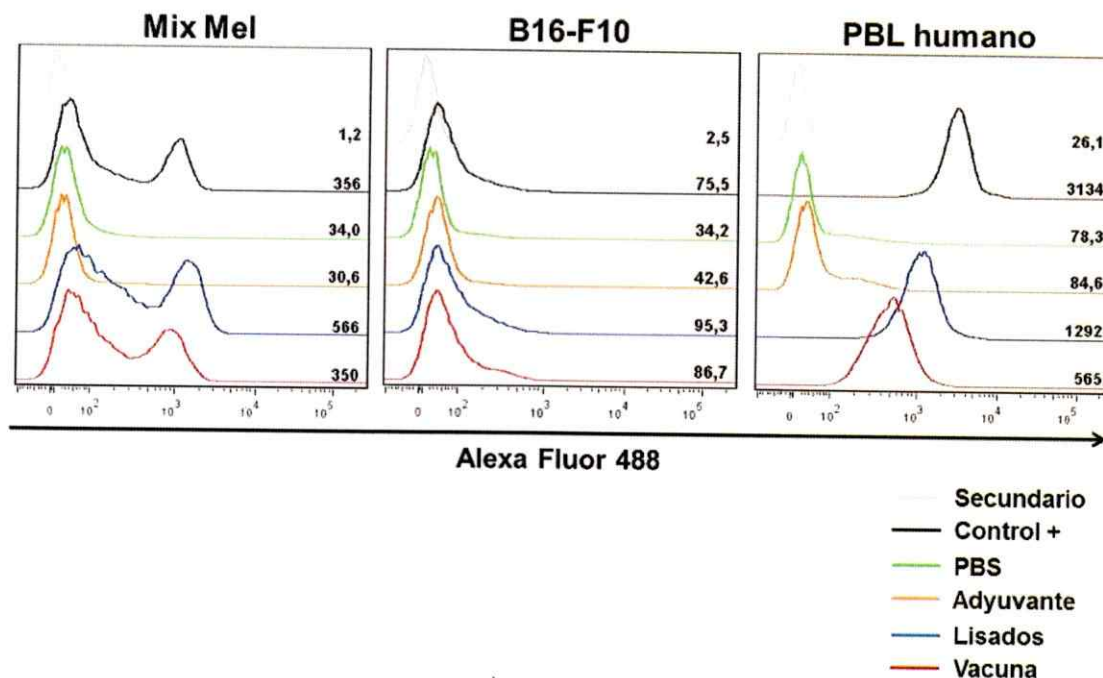


Figura 15. Ratones con melanoma B16-F10 inmunizados con lisados tumorales o con TRIMELvax® inducen una respuesta humoral. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c, y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con TRIMELvax®. Al día 19, los animales de los diferentes grupos de estudio fueron sacrificados y se les extrajo suero, donde se analizó mediante citometría de flujo la presencia de anticuerpos específicos contra células de melanoma o PBL humano (ver Materiales y Métodos). La figura muestra histogramas representativos de la presencia de anticuerpos IgG capaces de reconocer los distintos tipos de células blanco utilizadas, bajo cada condición en estudio, para dos experimentos independientes. Los números al lado derecho de los histogramas muestran la IMF de la población celular para el anticuerpo secundario α -IgG.

A continuación, en la figura 16, podemos observar la agrupación de los datos analizados, confirmando la presencia de anticuerpos contra las células de melanoma

humano y contra células B16-F10 en los sueros de animales inmunizados con lisados tumorales y TRIMELvax[®], comparado con los controles con PBS o con adyuvante. Finalmente, detectamos que sólo los ratones con melanoma inmunizados con lisados o con la vacuna inducen la producción de anticuerpos xenogénicos (PBL), datos obtenidos desde el incremento en la IMF (cantidad de anticuerpos).

En conjunto, estos resultados nos indican que lisados tumorales (también presentes en TRIMELvax[®]) inducen la producción de anticuerpos xenogénicos específicos contra células humanas y, en menor medida, contra células del melanoma murino B16-F10.

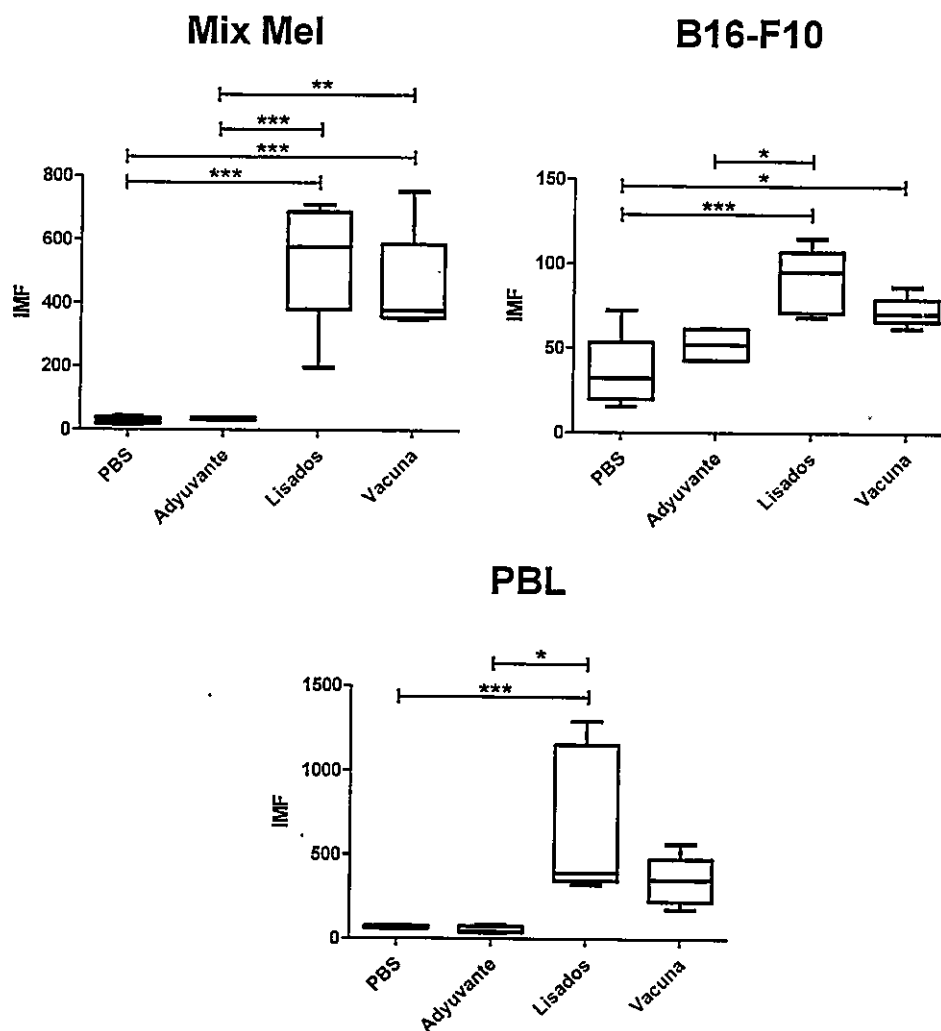


Figura 16. Ratones con melanoma inyectados con TRIMELvax® o con lisados tumorales poseen anticuerpos contra células de melanoma humanas y células B16-F10. Ratones C57BL/6 fueron inyectados con $2,5 \times 10^4$ células B16-F10 de forma s.c. y a los días 1, 6 y 12, fueron inmunizados con PBS, adyuvante, lisados tumorales, o con la vacuna. Al día 19, los animales de los diferentes grupos de estudio fueron sacrificados y se les extrajo suero, donde se analizó mediante citometría de flujo la presencia de anticuerpos específicos contra células de melanoma o PBL humano. La figura muestra gráficos de caja, representativos de dos experimentos independientes, de IMF de las poblaciones celulares en función de los tratamientos realizados a los ratones. Se muestran los resultados de entre 4 a 5 ratones por condición. * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$.

DISCUSIÓN

El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar en un modelo de ratón, la eficacia de la vacuna compuesta de lisados tumorales condicionados con un adyuvante, en los modelos de melanoma profiláctico y terapéutico.

Aunque la mayoría de los estudios sobre vacunas antitumorales utilizan DCs tratadas *ex vivo*, podemos encontrar algunas investigaciones en la literatura que utilizan antígenos o lisados tumorales para inmunizar a los pacientes directamente. Sin embargo, los efectos de estas vacunas han sido limitados y, en la mayoría de los casos, sin lograr retardo en el crecimiento o regresión del tamaño tumoral (Sondak & Sosman, 2003; Melief y col., 2015). Debido a lo anterior, y a pesar de los buenos resultados logrados con la terapia TAPCells, existían dudas sobre la efectividad que pudiera tener la nueva vacuna, las que fueron despejadas con los resultados obtenidos en este trabajo.

En primera instancia se inmunizaron ratones con tres dosis de la vacuna y posteriormente se inyectaron las células de melanoma B16-F10, y observamos una disminución del crecimiento tumoral, siendo estos tumores de la mitad o incluso un tercio del tamaño de los ratones controles para el día 18 post-inyección de las células tumorales. Este efecto sólo se observa cuando se combinan lisados tumorales condicionados con un adyuvante, y no cuando utilizamos los componentes por separado.

El siguiente paso fue comprobar que la vacuna TRIMELvax[®] mostrara similar eficacia cuando se utiliza para tratar el melanoma (modelo terapéutico). Debido

al rápido crecimiento del tumor formado por las células B16-F10 y al tiempo necesario para la inducción de una respuesta antitumoral mediada por el sistema inmune adaptativo, la primera inmunización se realizó el día después de la inyección de las células tumorales. Considerando el rápido crecimiento de los tumores B16-F10 (7 días en llegar a su volumen crítico) se hace difícil pensar en optimizar el protocolo de inmunizaciones para conseguir eventos de regresión tumoral, resultado ideal para una terapia contra cáncer. Debido a esto, se hace necesario probar esta vacuna en otros modelos tumorales de crecimiento más lento, para confirmar su capacidad para generar una disminución del tamaño tumoral. A pesar de esto, los resultados obtenidos tanto en el modelo profiláctico como en el terapéutico muestran que nuestra vacuna genera una respuesta inmune antitumoral protectora, y por ende, cumple con los conceptos necesarios para el desarrollo de nuevas vacunas, las cuales poseen típicamente tres componentes: una fuente de antígenos, los cuales otorgan la especificidad a la respuesta inmune, una modalidad de entrega, que promueve la captura antigénica y la transferencia a moléculas de MHC-I, y un agente que acentúe la inmunogenicidad de la vacuna. Uno de los procesos críticos para el desarrollo de esta vacuna es el condicionamiento por calor al cual son sometidas las células tumorales antes de lisarlas. Se ha comprobado previamente que este shock térmico permite la secreción de DAMPs (por ejemplo, HMGB1 y calreticulina) por parte de las células de melanoma (Aguilera y col., 2011). Estudios recientes han mostrado la importancia de las señales de peligro producidas por las células tumorales en condiciones de estrés o muerte programada para la inducción de una respuesta inmune antitumoral duradera. Un ejemplo de esto es el proceso de necroptosis, caracterizado por generar la producción y liberación de DAMPs, el cual al ser inducido en células tumorales es capaz de aumentar su inmunogenicidad e inducir potentes respuestas del sistema

inmune (Aaes y col., 2016). Las señales de peligro también son importantes en los procesos de maduración y presentación antigénica por parte de las células dendríticas. Un paso clave en la inducción de la respuesta antitumoral es la presentación cruzada, la cual posibilita la activación de LT CD8⁺ o citotóxicos. Estudios han demostrado que distintas señales de peligro son capaces de ayudar en este proceso. Por ejemplo, la molécula HMGB1 es capaz de inducir la presentación cruzada de antígenos tumorales al ser reconocida por TLR4 en las células dendríticas (Spel y col., 2013; Frey y col., 2014); y proteínas de shock térmico (HSP) son capaces de facilitar la presentación cruzada, ayudando a la internalización de proteínas mediante su acción como chaperonas o uniéndose a proteínas de superficie que median la internalización de complejos y el procesamiento antigénico (Murshid y col., 2008; Frey y col., 2014). Por último, existe evidencia de que señales de peligro como el ATP pueden unirse a receptores purinérgicos en las DCs, activando el inflamasoma NLRP3, el cual a su vez puede inducir la activación de la molécula caspasa-1, facilitando la secreción de la citoquina IL-1 β , importante mediadora de la respuesta inflamatoria (Spel y col., 2013). En resumen, y respaldándonos en la literatura, la vacuna generada en nuestro laboratorio sería una fuente ideal de antígenos y señales de peligro para la generación de una respuesta inmune antitumoral efectiva y potente.

Las vacunas para uso terapéutico, están destinadas a generar linfocitos T citotóxicos que puedan infiltrar tumores y eliminar selectivamente a las células malignas. Por esta razón, obtuvimos los leucocitos intratumorales y analizamos la presencia de diversas poblaciones celulares además de su estado de activación y proliferación. De manera interesante, no encontramos diferencias en los porcentajes de linfocitos T CD4 y CD8 infiltrantes de tumor entre los ratones inmunizados con la vacuna y los controles. Lo mismo sucedió al analizar otros tipos de células importantes

en la respuesta inmune antitumoral como las NK o las tipo NKT. Sabemos desde la literatura que la mayor infiltración de LT y NK al sitio tumoral es importante para la supervivencia de los pacientes y está asociada a un buen pronóstico clínico en diversos tipos de cáncer (Gajewski y col., 2013; Melero y col., 2014). Por lo anterior y considerando la disminución del crecimiento tumoral generado por la vacuna, esperábamos encontrar una mayor infiltración de LT o células NK en el sitio tumoral, lo que no ocurrió para este caso. Para este fenómeno existen algunas explicaciones. Estudios en la literatura demuestran que una de las características fundamentales para lograr una regresión tumoral, es que los LT infiltrantes persistan en el tumor, o sea, que tengan la capacidad de sobrevivir al microambiente inmunosupresor del sitio tumoral el suficiente tiempo como para lograr ejercer su acción, ya sea citotóxica o inmunomoduladora (Menger y col., 2016). Por ello, no solo es importante analizar la proporción de LT presentes en el tumor, sino que también el estado de activación en que se encuentran los mismos. En efecto, encontramos que ratones con melanoma inmunizados con lisados tumorales y con TRIMELvax[®] poseen un mayor porcentaje de LT CD8 infiltrantes de tumor activados (CD25+). También, obtuvimos una clara disminución en el porcentaje de los LT vírgenes, sobre todo de los CD8, al utilizar la vacuna en comparación al resto de los controles. Sin embargo, un factor a tener en cuenta es que en el caso de los LT CD8+ intratumorales obtuvimos un porcentaje (10-20%) de LT vírgenes bastante superior al esperado, lo que puede ser explicado por la gran irrigación presente en varios de los tumores analizados, con lo que la fuente de la mayor parte de estos linfocitos podría ser la circulación y no el tumor en sí. A pesar de los resultados obtenidos, son muchos los parámetros que necesitan ser evaluados en los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) para poder demostrar su influencia en la respuesta antitumoral, entre los que podemos mencionar su ubicación dentro del

microambiente tumoral, su número absoluto (dependiente del tamaño del tumor), su capacidad de secretar citoquinas, y los subtipos de LT presentes (Chang y col., 2015; Salgado y col., 2015; Schalper y col., 2015). Por ello, análisis más precisos y sensibles son necesarios para saber la real influencia que estas células estarían teniendo en la terapia.

Otra explicación para entender el efecto protector de la vacuna contra el tumor, fue verificar la funcionalidad de los LT CD8 mediante la medición de la expresión de ciertas moléculas como Granzima B, factor importante en la inducción de apoptosis de las células tumorales. De esta forma, observamos un aumento en el porcentaje de LT CD8 que expresan esta molécula citotóxica al inmunizar los ratones con lisados tumorales o con la vacuna. Por otro lado, al analizar la activación de las células NK y tipo NKT intratumorales (mediante la expresión de CD69) obtuvimos resultados muy similares al de los LT CD8, con aumentos de entre 2 y 3 veces en el porcentaje de células CD69+ en los ratones inmunizados comparados a los controles con PBS. Esto nos muestra que la inmunización de los ratones está generando una activación de células principalmente citotóxicas, como lo son los LT CD8 o las células NK, presentes en el sitio tumoral o una mayor migración de estas células activadas hacia este lugar. Tomando esto en consideración, cabe la posibilidad de que los LT específicos o células NK activadas entren rápidamente en apoptosis luego de llevar a cabo su función y por ello no veamos diferencias en la infiltración de linfocitos al sitio tumoral entre los ratones inyectados con la vacuna y los controles. También existe la posibilidad de que los efectos de TRIMELvax® ocurran más tempranamente que en el día en que se realizaron las mediciones, por lo que se podría considerar la realización de una cinética para medir la infiltración de células del sistema inmune al sitio tumoral a distintos días luego de las inmunizaciones.

En el microambiente tumoral coexisten diferentes células del sistema inmune, algunas de ellas capaces de suprimir la respuesta efectora de las células que atacan al tumor. Nuestros resultados mostraron que tanto la inmunización con la vacuna como con lisados tumorales generan una activación de LT CD8+ y de células NK intratumorales mayor que el control con PBS, pero sólo observamos un efecto protector en animales inmunizados con TRIMELvax®. Es más, los ratones tratados con lisados tumorales, en muchos de los casos, tenían un crecimiento tumoral más acelerado en comparación al control con PBS. Por estas razones, decidimos analizar la presencia de linfocitos T reguladores en el sitio tumoral, la cual esta asociada a un pobre pronóstico clínico debido a sus fuertes propiedades inmunosupresoras (Facciabene y col., 2012).

Cuando analizamos la presencia de LT reguladores en el sitio tumoral no obtuvimos diferencias en el porcentaje de estas células entre las distintas condiciones bajo estudio. A pesar de esto, no podemos descartar que existan diferencias en el número absoluto de LT reguladores presentes en los tumores, correlacionado con el tamaño de los mismos, lo que puede ser abarcado en futuros experimentos. Tampoco podemos eliminar la posibilidad de que otro tipo de células reguladoras puedan estar participando en la inmunosupresión dentro del tumor, generando las diferencias observadas entre TRIMELvax® y los controles, tales como células mieloides supresoras (MDSC) o macrófagos asociados a tumor (TAMs), células que han sido encontradas en una gran variedad de tipos de cáncer y asociadas a procesos como angiogénesis y metástasis (Zou, 2005; Partecke y col., 2013; Alizadeh & Larmonier, 2014). Además, tampoco podemos descartar otros mecanismos de evasión inmune que podrían estar presentes y mayormente activos en los controles con lisados tumorales en comparación a los ratones inyectados con la vacuna, tales como presentación antigénica defectuosa, expresión y secreción de mediadores inmunosupresores

(citoquinas, enzimas u otros factores), o la eliminación e inducción de anergia de LT citotóxicos por parte de las células tumorales (Vinay y col., 2015).

Para complementar nuestros datos, también analizamos las poblaciones celulares presentes en bazo de los ratones bajo tratamiento. En este caso, obtuvimos un aumento en el número absoluto de LT presentes en el bazo de los ratones tratados con la vacuna en comparación a los controles con PBS; así como también una tendencia al aumento en el número de LT CD8⁺ activados. A diferencia de lo que ocurre en tumor, esta tendencia vista en los LT CD8⁺ de bazo es un efecto exclusivo de TRIMELvax[®] y no se observa en los controles con adyuvante o lisados tumorales. Esto podría indicarnos que la vacuna tendría la capacidad de generar una respuesta inmune duradera en los ratones, siendo los LT capaces de sobrevivir y permanecer en circulación por más tiempo. Por otra parte, no observamos diferencias en el número de células NK y DCs, pero si obtuvimos un leve aumento en la cantidad de células tipo NKT, al comparar los ratones inmunizados con la vacuna y los controles. Además, observamos un aumento en la activación de las células NK y tipo NKT, lo que nos mostraría que la vacuna también es capaz de generar una respuesta persistente del sistema inmune innato.

Debido a que desde hace algunos años se ha investigado el papel de los linfocitos B en inmunología de tumores, sugiriendo que podrían tener un rol importante en la respuesta antitumoral, principalmente mediante la regulación de la acción de los linfocitos T y a través de la generación de anticuerpos IgG específicos contra el tumor, lo cual ha sido visto en modelos de cáncer de mama, pulmón, páncreas y melanoma (Fremd y col., 2013; Carmi y col., 2015; Zitvogel & Kroemer, 2015), analizamos la presencia de anticuerpos IgG específicos contra células de melanoma en los sueros de los ratones bajo tratamiento. En un comienzo, utilizamos como células blanco de los

anticuerpos solo la mezcla de líneas de melanoma humano y la línea de melanoma murino B16-F10, observando que en el primer caso aparecía una población positiva al usar los sueros provenientes de los ratones inyectados con lisados o con la vacuna, mostrando la presencia de anticuerpos capaces de reconocer las líneas de melanoma humano, mientras que en el caso de las células B16-F10 solo se observaba un pequeño aumento en la IMF bajo las mismas condiciones, lo que podría indicarnos una producción muy baja de anticuerpos contra este tipo de melanoma murino o que los antígenos reconocidos por los anticuerpos se encuentran en baja cantidad en estas células. La aparición de una población positiva en el caso de las líneas de melanoma humano podría explicarse con el hecho de que solo una de las tres líneas utilizadas en la mezcla expresa MHC-I, uno de los posibles blancos de los anticuerpos generados por estos ratones (posible reacción xenogénica), siendo estas células las que estarían siendo reconocidas por los anticuerpos presentes en el suero de los ratones inyectados con lisados tumorales o la vacuna.

Pasando a los resultados obtenidos con las células B16-F10, estos pueden explicarse debido a que este melanoma murino es poco inmunogénico y, en general, provoca una respuesta pobre del sistema inmune, debido a su baja expresión de MHC-I y nula de MHC-II *in vivo* (Jubin y col., 2012; Jensen y col., 2013). A pesar de ello, observamos un leve aumento en la cantidad de anticuerpos contra este tipo celular presente en los sueros de los ratones tratados con lisados o con la vacuna, sugiriendo una inducción de la respuesta inmune humoral. Otra aproximación que podría utilizarse a futuro para ver este tipo de respuesta en los ratones sería la medición de anticuerpos específicos contra ciertos antígenos tumorales de melanoma de las células B16-F10 (tales como gp100 o MART-1), por ejemplo, mediante ensayos de ELISA o Western Blot (Fiorentino y col., 2013; Yoshida y col., 2014).

Debido a la posible generación de una respuesta inmune xenogénica en los ratones por el uso de lisados provenientes de células humanas, probamos utilizar PBL humano como células blanco de los anticuerpos presentes en los sueros. El PBL no expresa los antígenos tumorales específicos presentes en el melanoma B16-F10, por lo que es el control ideal para probar una respuesta inter-especies. Al analizar los resultados, observamos que al utilizar los sueros provenientes de los ratones inyectados con los lisados o la vacuna, se evidenció que una parte de la producción de anticuerpos generada por los lisados tumorales (también presentes en la vacuna) se debería a una reacción xenogénica por parte del sistema inmune del ratón. Esto también nos da razones para pensar que la presencia de anticuerpos contra las líneas de melanoma humano mencionada anteriormente, podría deberse a esta misma reacción xenogénica, posiblemente, contra la molécula MHC-I humana.

En resumen, nuestros resultados muestran que la nueva vacuna TRIMELvax® generada en nuestro laboratorio es capaz de inducir una respuesta antitumoral efectiva contra melanoma, disminuyendo el crecimiento tumoral de la línea murina B16-F10, tanto en un modelo profiláctico como terapéutico, lo que estaría mediado principalmente por LT CD8 y células NK. Sin embargo, aún se debe investigar más detalladamente sobre la influencia de las células del sistema inmune que estarían involucradas en dicho efecto y los mecanismos de tolerancia presentes en los tumores analizados, elementos clave para mejorar la terapia. Un importante factor a considerar en todos los experimentos realizados son los animales utilizados, debido principalmente a que las condiciones en las cuales fueron mantenidos (libres de patógenos) no representan el ambiente normal en el que se encuentran los pacientes con cáncer, lo que podría influir en la respuesta del sistema inmune generada y en los resultados obtenidos. A pesar de todo esto, desde un punto de vista tecnológico, este

tipo de vacunas posee múltiples ventajas: estandarización de su preparación, producción a gran escala, el uso de un lote único de vacunas para todos los pacientes, independiente de su haplotipo, y la eliminación de la variabilidad en la calidad y composición de las vacunas, facilitando los análisis clínicos.

Por último, la generación de una posible terapia combinada utilizando la vacuna descrita en este trabajo y, por ejemplo, anticuerpos bloqueantes de "checkpoints" del sistema inmune, tales como α -CTLA-4 o α -PD1, podría demostrar ser un tratamiento altamente efectivo contra melanoma y, a futuro, otros tipos de cáncer, además de aumentar el radio de respuesta de los pacientes.

CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado en este trabajo, comprobamos que la vacuna generada en nuestro laboratorio produce una respuesta antitumoral efectiva en un modelo murino de melanoma. Al ser administrada, tanto profiláctica como terapéuticamente, TRIMELvax® fue capaz de reducir drásticamente el crecimiento del tumor en ratones inmunocompetentes. Por otro lado, el uso por separado de lisados tumorales o del adyuvante como agentes de inmunización no generaron ningún efecto positivo en la inhibición del crecimiento tumoral. Este efecto generado por la vacuna fue asociado a una respuesta inmune mediada, principalmente, por linfocitos T CD8+ y células NK, aunque no podemos descartar la participación de otras poblaciones celulares no analizadas en este trabajo. Por último, también obtuvimos un leve aumento en la producción de anticuerpos específicos contra células B16-F10 al utilizar la vacuna TRIMELvax®, indicando una posible participación de la respuesta inmune humoral en la inhibición del crecimiento tumoral.

Con los resultados obtenidos para esta vacuna hemos comprobado que la combinación de lisados de células tumorales condicionadas por calor con un adyuvante potente puede ser utilizada para el tratamiento del melanoma y podría sentar la base para la generación de vacunas contra otros tipos de cáncer. Sin embargo, aún falta por comprobar su efectividad en humanos en futuros ensayos clínicos, además de dilucidar más específicamente los mecanismos por los cuales actúa esta vacuna, con el fin de poder mejorar la terapia y usarla, por ejemplo, en combinación con otros tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

- Aaes, T. L., Kaczmarek, A., Delvaeye, T., De Craene, B., De Koker, S., Heyndrickx, L., ... & Garg, A. D. 2016. Vaccination with Necroptotic Cancer Cells Induces Efficient Anti-tumor Immunity. *Cell reports*. **15**: 274-287.
- Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., González, F. E., Ramírez, M., Reyes, D., ... & Ferreira, A. 2011. Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clinical Cancer Research*. **17**: 2474-2483.
- Alizadeh, D., & Larmonier, N. 2014. Chemotherapeutic targeting of cancer-induced immunosuppressive cells. *Cancer research*. **74**: 2663-2668.
- Banaszynski, M., & Kolesar, J. M. 2013. Vemurafenib and ipilimumab: New agents for metastatic melanoma. *American Journal of Health-System Pharmacy*. **70**: 1205-1210.
- Banchereau, J., & Palucka, A. K. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*. **5**: 296-306.
- Barth Jr, R. J., Mulé, J. J., Asher, A. L., Sanda, M. G., & Rosenberg, S. A. 1991. Identification of unique murine tumor associated antigens by tumor infiltrating lymphocytes using tumor specific secretion of interferon- γ and tumor necrosis factor. *Journal of immunological methods*. **140**: 269-279.
- Becker, M. I., Arancibia, S., Salazar, F., Del Campo, M., & De Ioannes, A. 2014. Mollusk hemocyanins as natural immunostimulants in biomedical applications. In *Immune Response Activation*. **2**: 45-72.
- Bianchi, M. E. 2007. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*. **81**: 1-5.
- Brahmer, J. R., Tykodi, S. S., Chow, L. Q., Hwu, W. J., Topalian, S. L., Hwu, P., ... & Pitot, H. C. 2012. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *New England Journal of Medicine*. **366**: 2455-2465.
- Cann, S. H., Van Netten, J. P., & Van Netten, C. 2003. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgraduate medical journal*. **79**: 672-680.
- Carmi, Y., Spitzer, M. H., Linde, I. L., Burt, B. M., Prestwood, T. R., Perlman, N., ... & Bhattacharya, N. 2015. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature*. **521**: 99-104.
- Chang, C. H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., ... & Tonc, E. 2015. Metabolic competition in the tumor microenvironment is a driver of cancer progression. *Cell*. **162**: 1229-1241.
- Chow, M. T., Möller, A., & Smyth, M. J. 2012. Inflammation and immune surveillance in cancer. In *Seminars in cancer biology*. **22**: 23-32.
- DiLillo, D. J., Yanaba, K., & Tedder, T. F. 2010. B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice. *The Journal of Immunology*. **184**: 4006-4016.
- Dong, H., Zhu, G., Tamada, K., & Chen, L. 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*, **5**.

- Durán-Aniotz, C., Segal, G., Salazar, L., Pereda, C., Falcón, C., Tempio, F., ... & Catalán, D. 2013. The immunological response and post-treatment survival of DC-vaccinated melanoma patients are associated with increased Th1/Th17 and reduced Th3 cytokine responses. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **62**: 761-772.
- Facciabene, A., Motz, G. T., & Coukos, G. 2012. T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer research*. **72**: 2162-2171.
- Farkona, S., Diamandis, E. P., & Blasutig, I. M. 2016. Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer?. *BMC medicine*, **14**: 1.
- Fellner, C. 2012. Ipilimumab (yervoy) prolongs survival in advanced melanoma: serious side effects and a hefty price tag may limit its use. *Pharmacy and Therapeutics*. **37**: 503.
- Fiorentino, D. F., Chung, L. S., Christopher-Stine, L., Zaba, L., Li, S., Mammen, A. L., ... & Casciola-Rosen, L. 2013. Most Patients With Cancer-Associated Dermatomyositis Have Antibodies to Nuclear Matrix Protein NXP-2 or Transcription Intermediary Factor 1 γ . *Arthritis & Rheumatism*. **65**: 2954-2962.
- Fremd, C., Schuetz, F., Sohn, C., Beckhove, P., & Domschke, C. 2013. B cell-regulated immune responses in tumor models and cancer patients. *Oncoimmunology*. **2**: e25443.
- Frey, B., Rubner, Y., Kulzer, L., Werthmüller, N., Weiss, E. M., Fietkau, R., & Gaipl, U. S. 2014. Antitumor immune responses induced by ionizing irradiation and further immune stimulation. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **63**: 29-36.
- Friedman, K. M., Prieto, P. A., Devillier, L. E., Gross, C. A., Yang, J. C., Wunderlich, J. R., & Dudley, M. E. 2012. Tumor-specific CD4+ melanoma tumor-infiltrating lymphocytes. *Journal of Immunotherapy*. **35**: 400-408.
- Gajewski, T. F., Schreiber, H., & Fu, Y. X. 2013. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nature immunology*. **14**: 1014-1022.
- Garbe, C., Peris, K., Hauschild, A., Saiag, P., Middleton, M., Spatz, A., & Eggermont, A. M. 2012. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline—update 2012. *European journal of cancer*. **48**: 2375-2390.
- Gathuru, J. K., Koide, F., Ragupathi, G., Adams, J. L., Kerns, R. T., Coleman, T. P., & Livingston, P. O. 2005. Identification of DHBcAg as a potent carrier protein comparable to KLH for augmenting MUC1 antigenicity. *Vaccine*. **23**: 4727-4733.
- Gilboa, E. 2007. DC-based cancer vaccines. *Journal of Clinical Investigation*. **117**: 1195-1203.
- Gilham, D. E., Anderson, J., Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Exley, M. A., Stauss, H., ... & Lee, S. 2015. Adoptive T-cell therapy for cancer in the United Kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015. *Human gene therapy*. **26**: 276-285.
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell*. **140**: 883-899.
- Gross, L. 1943. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Research*. **3**: 326-333.
- Hadrup, S., Donia, M., & Thor Straten, P. 2013. Effector CD4 and CD8 T cells and their role in the tumor microenvironment. *Cancer Microenvironment*. **6**: 123-133.
- Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., & Urban, W. J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine*. **363**: 711-723.
- Idakieva, K., Nikolov, P., Chakarška, I., Genov, N., & Shnyrov, V. L. 2008. Spectroscopic properties and conformational stability of Concholepas concholepas hemocyanin. *Journal of fluorescence*. **18**: 715-725.

- Jensen, B. A., Pedersen, S. R., Christensen, J. P., & Thomsen, A. R. 2013. The availability of a functional tumor targeting T-cell repertoire determines the anti-tumor efficiency of combination therapy with anti-CTLA-4 and anti-4-1BB antibodies. *PLoS one*. **8**: e66081.
- Joshi, B., Wang, X., Banerjee, S., Tian, H., Matzavinos, A., & Chaplain, M. A. 2009. On immunotherapies and cancer vaccination protocols: a mathematical modelling approach. *Journal of Theoretical Biology*. **259**: 820-827.
- Jubin, R. G., Koltchev, D. H., Vy, D., & Pestka, S. 2012. Relationship Between Antiproliferative Activities and Class I MHC Surface Expression of Mouse Interferon Proteins on B16-F10 Melanoma Cells. *Recent Advances in Cancer Research and Therapy*. **85**.
- June, C. H. 2007. Principles of adoptive T cell cancer therapy. *Journal of Clinical Investigation*. **117**: 1204-1212.
- Kazemi, T., Younesi, V., Jadidi-Niaragh, F., & Yousefi, M. 2016. Immunotherapeutic approaches for cancer therapy: an updated review. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. **44**: 769-779.
- Khalil, D. N., Smith, E. L., Brentjens, R. J., & Wolchok, J. D. 2016. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*. **13**: 273-290.
- Kitano, S., Tsuji, T., Liu, C., Hirschhorn-Cymerman, D., Kyi, C., Mu, Z., ... & Wolchok, J. D. 2013. Enhancement of tumor-reactive cytotoxic CD4+ T-cell responses after ipilimumab treatment in four advanced melanoma patients. *Cancer immunology research*. **1**: 235-244.
- Klebanoff, C. A., Finkelstein, S. E., Surman, D. R., Lichtman, M. K., Gattinoni, L., Theoret, M. R., ... & Tagaya, Y. 2004. IL-15 enhances the in vivo antitumor activity of tumor-reactive CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **101**: 1969-1974.
- Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., & Restifo, N. P. 2006. CD8+ T-cell memory in tumor immunology and immunotherapy. *Immunological reviews*. **211**: 214-224.
- Krysko, D. V., Garg, A. D., Kaczmarek, A., Krysko, O., Agostinis, P., & Vandenabeele, P. 2012. Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. **12**: 860-875.
- Krysko, O., Aaes, T. L., Bachert, C., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. 2013. Many faces of DAMPs in cancer therapy. *Cell death & disease*. **4**: e631.
- Lomas, A., Leonardi-Bee, J., & Bath-Hextall, F. 2012. A systematic review of worldwide incidence of nonmelanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology*. **166**: 1069-1080.
- Mahoney, K. M., Rennert, P. D., & Freeman, G. J. 2015. Combination cancer immunotherapy and new immunomodulatory targets. *Nature reviews Drug discovery*. **14**: 561-584.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., ... & Mellstedt, H. 2014. Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature reviews Clinical oncology*. **11**: 509-524.
- Melief, C. J., van Hall, T., Arens, R., Ossendorp, F., & van der Burg, S. H. 2015. Therapeutic cancer vaccines. *The Journal of clinical investigation*. **125**: 3401-3412.
- Mellman, I., Coukos, G., & Dranoff, G. 2011. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature*. **480**: 480-489.
- Menger, L., Sledzinska, A., Bergerhoff, K., Vargas, F. A., Smith, J., Poirot, L., ... & Quezada, S. A. 2016. TALEN-Mediated Inactivation of PD-1 in Tumor-Reactive

- Lymphocytes Promotes Intratumoral T-cell Persistence and Rejection of Established Tumors. *Cancer research*. **76**: 2087-2093.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual review of immunology*. **31**: 563-604.
- Miller, A. J., & Mihm Jr, M. C. 2006. Melanoma. *New England Journal of Medicine*. **355**: 51-65.
- Molledo, B., Faunes, F., Haussmann, D., De Ioannes, P., De Ioannes, A. E., Puente, J., & Becker, M. I. 2006. Immunotherapeutic effect of Concholepas hemocyanin in the murine bladder cancer model: evidence for conserved antitumor properties among hemocyanins. *The Journal of urology*. **176**: 2690-2695.
- Murshid, A., Gong, J., & Calderwood, S. K. 2008. Heat-shock proteins in cancer vaccines: agents of antigen cross-presentation. *Expert review of vaccines*. **7**: 1019-1030.
- Nelson, B. H. 2010. CD20+ B cells: the other tumor-infiltrating lymphocytes. *The Journal of Immunology*. **185**: 4977-4982.
- Ochsenbein, A. F. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer gene therapy*. **9**: 1043-1055.
- Overwijk, W. W., & Restifo, N. P. 2001. B16 as a mouse model for human melanoma. *Current Protocols in Immunology*. **39**: 1-29.
- Palucka, K., & Banchereau, J. 2012. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. **12**: 265-277.
- Palucka, K., & Banchereau, J. 2013. Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines. *Immunity*. **39**: 38-48.
- Parfecke, L. I., Günther, C., Hagemann, S., Jacobi, C., Merkel, M., Sendler, M., ... & Diedrich, S. 2013. Induction of M2-macrophages by tumour cells and tumour growth promotion by M2-macrophages: a quid pro quo in pancreatic cancer. *Pancreatology*. **13**: 508-516.
- Phan, G. Q., Yang, J. C., Sherry, R. M., Hwu, P., Topalian, S. L., Schwartzentruber, D. J., ... & Morton, K. E. 2003. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **100**: 8372-8377.
- Qian, X., Wang, X., & Jin, H. 2014. Cell transfer therapy for cancer: past, present, and future. *Journal of immunology research*.
- Qin, Z., G. Richter, T. Schöler, S. Ibe, X. Cao, and T. Blankenstein. 1998. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nature Medicine*. **4**: 627-630.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., & Restifo, N. P. 2010. Tumor-reactive CD4+ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of experimental medicine*. **207**: 637-650.
- Reyes, D., Salazar, L., Espinoza, E., Pereda, C., Castellón, E., Valdevenito, R., ... & Salazar-Onfray, F. 2013. Tumour cell lysate-loaded dendritic cell vaccine induces biochemical and memory immune response in castration-resistant prostate cancer patients. *British journal of cancer*. **109**: 1488-1497.
- Ribas, A. 2015. Releasing the brakes on cancer immunotherapy. *N Engl J Med*. **373**: 1490-1492.
- Rosenberg, S. A., Restifo, N. P., Yang, J. C., Morgan, R. A., & Dudley, M. E. 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*. **8**: 299-308.

- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., ... & Morton, K. E. 2011. Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clinical Cancer Research*. **17**: 4550-4557.
- Ruella, M., & Kalos, M. 2014. Adoptive immunotherapy for cancer. *Immunological reviews*. **257**: 14-38.
- Salazar-Onfray, F., Pereda, C., Reyes, D., & López, M. N. 2013. TAPCells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biological research*. **46**: 431-440.
- Salcedo, M., Bercovici, N., Taylor, R., Vereecken, P., Massicard, S., Duriau, D., ... & Bartholeyns, J. 2006. Vaccination of melanoma patients using dendritic cells loaded with an allogeneic tumor cell lysate. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **55**: 819-829.
- Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., ... & Perez, E. A. 2015. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Annals of oncology*. **26**: 259-271.
- Schalper, K. A., Brown, J., Carvajal-Hausdorf, D., McLaughlin, J., Velcheti, V., Syrigós, K. N., ... & Rimm, D. L. 2015. Objective measurement and clinical significance of TILs in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. **107**: dju435.
- Segal, N. H., Parsons, D. W., Peggs, K. S., Velculescu, V., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Allison, J. P. 2008. Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer research*. **68**: 889-892.
- Sharma, P., Wagner, K., Wolchok, J. D., & Allison, J. P. 2011. Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit: recent successes and next steps. *Nature Reviews Cancer*. **11**: 805-812.
- Shi, H., Qi, X., Ma, B., Cao, Y., Wang, L., Sun, L., & Niu, H. 2015. The status, limitation and improvement of adoptive cellular immunotherapy in advanced urologic malignancies. *Chinese Journal of Cancer Research*. **27**: 128.
- Sondak, V. K., & Sosman, J. A. 2003. Results of clinical trials with an allogeneic melanoma tumor cell lysate vaccine: Melacine®. In *Seminars in cancer biology*. **13**: 409-415.
- Southam, C. M., Brunschwig, A., Levin, A. G., & Dizon, Q. S. 1966. Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer*. **19**: 1743-1753.
- Spel, L., Boelens, J. J., Nierkens, S., & Boes, M. 2013. Antitumor immune responses mediated by dendritic cells: How signals derived from dying cancer cells drive antigen cross-presentation. *Oncoimmunology*. **2**: e26403.
- Steinman, R. M., & Banchereau, J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. **449**: 419-426.
- Thomas, N. E., Busam, K. J., From, L., Kricker, A., Armstrong, B. K., Anton-Culver, H., ... & Dwyer, T. 2013. Tumor-infiltrating lymphocyte grade in primary melanomas is independently associated with melanoma-specific survival in the population-based genes, environment and melanoma study. *Journal of Clinical Oncology*.
- Timmerman, MD, J. M., & Levy, MD, R. 1999. Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annual review of medicine*. **50**: 507-529.
- Toes, R. E., Ossendorp, F., Offringa, R., & Melief, C. J. 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *The Journal of experimental medicine*. **189**: 753-756.
- Topalian, S. L., Solomon, D. I. A. N. E., & Rosenberg, S. A. 1989. Tumor-specific cytotoxicity by lymphocytes infiltrating human melanomas. *The Journal of Immunology*. **142**: 3714-3725.

- Van den Eertwegh, A. J., Versluis, J., van den Berg, H. P., Santegoets, S. J., van Moorselaar, R. J. A., van der Sluis, T. M., & Gerritsen, W. R. 2012. Combined immunotherapy with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced allogeneic prostate cancer cells and ipilimumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: a phase 1 dose-escalation trial. *The lancet oncology*. **13**: 509-517.
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., ... & Signori, E. 2015. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. In *Seminars in cancer biology*. **35**: 185-198.
- Wang, K., Xu, J., Zhang, T., & Xue, D. 2016. Tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer predict the response to chemotherapy and survival outcome: A meta-analysis. *Oncotarget*. **7**: 44288.
- Woo, S. R., Corrales, L., & Gajewski, T. F. 2015. Innate immune recognition of cancer. *Annual review of immunology*. **33**: 445-474.
- Yaddanapudi, K., Mitchell, R. A., & Eaton, J. W. 2013. Cancer vaccines: Looking to the future. *Oncoimmunology*. **2**: e23403.
- Yee, C. 2013. Adoptive T-cell therapy for cancer: boutique therapy or treatment modality?. *Clinical Cancer Research*. **19**: 4550-4552.
- Yoshida, T., Kato, J., Inoue, I., Yoshimura, N., Deguchi, H., Mukoubayashi, C., ... & Maekita, T. 2014. Cancer development based on chronic active gastritis and resulting gastric atrophy as assessed by serum levels of pepsinogen and Helicobacter pylori antibody titer. *International Journal of Cancer*. **134**: 1445-1457.
- Yu, P., & Fu, Y. X. 2006. Tumor-infiltrating T lymphocytes: friends or foes?. *Laboratory investigation*. **86**: 231-245.
- Zitvogel, L., & Kroemer, G. 2015. Cancer: Antibodies regulate antitumour immunity. *Nature*. **521**: 35-37.
- Zou, W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Reviews Cancer*. **5**: 263-274.