



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **SRTA. MARÍA CAROLINA ORTIZ ROJO**

“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE QUIMIOQUINA CCR7 Y CAPACIDAD MIGRATORIA DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS TUMORALES (TAPCells)”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Dr. Flavio Salazar-Onfray
Director Seminario de Título

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dra. Verónica Palma Alvarado
Presidenta Comisión

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Dr. Mario Roseblatt Silber
Corrector

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line.

Santiago de Chile, Diciembre de 2011

UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



**“EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE QUIMIOQUINA CCR7 Y CAPACIDAD
MIGRATORIA DE CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENOS
TUMORALES (TAPCells)”**

Seminario de Título entregado a Universidad de Chile en cumplimiento
parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología
Molecular

MARÍA CAROLINA ORTIZ ROJO

Dr. Flavio Salazar- Onfray
Director de Seminario de Título

Dr. Fermín González
Co-Director de Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono Merino
Patrocinante Facultad de Ciencias

Diciembre de 2011

Santiago – Chile

BIOGRAFÍA

Qué difícil es hablar de uno mismo, no sé por dónde empezar, supongo que desde el principio. Soy Carolina, nací en Antofagasta en 1986. Por cosas de la vida, antes de cumplir un año, mis papás se trasladaron a Santiago con Francisco, mi hermano mayor, y conmigo. Cuatro años después nació Juanito, mi hermano menor. Estudié en el San Gabriel, primero la Básica en la Sede Pastene, un lugar pequeño, pero hermoso y acogedor, donde pasé momentos inolvidables y conocí a mis grandes amigas: Camilits, Jime y Margarita. Hoy puedo decir que en Pastene viví mis mejores años de colegio. Al terminar 8° había que emigrar a la sede Bilbao, donde conocí gente nueva, crecí como persona y descubrí que me encantaba la ciencia. Nunca olvidaré las clases de Biología con la Miss Beatriz, ella me hizo enamorar de todo ese mundo y quizás si no fuera por ella no estaría escribiendo estas líneas. Al finalizar el colegio no sabía qué estudiar pero sí tenía claro qué no me gustaba. Prefería algo dinámico, que no tuviese mucho de rutinario, que permitiera estar en suspenso todo el tiempo, algo que es casi imposible de conseguir, la verdad, pero intuía que me gustaba la ciencia, quería investigar, encontrar la cura de alguna enfermedad, quería aportar al mundo. Así fue como elegí esta profesión de nombre tan rimbombante, que casi tienes que pensarlo antes de decirlo: Ingeniería en Biotecnología Molecular, más conocida como Biotec. Sin embargo, entrar no fue fácil. Mi puntaje PSU no me alcanzó para quedar seleccionada en dicha Carrera en la Universidad de Chile, donde yo quería estudiar. Fue así como opté por entrar al Programa de Bachillerato en Ciencias, y con esa decisión definitivamente mi vida dio un vuelco, mi paso por la universidad no hubiera sido el mismo, sin haber estado primero en Bachillerato, ahí aprendí a ser luchadora, a tener un pensamiento propio, a ser fuerte y no rendirme. Si bien fue un camino lleno de desafíos, al mismo tiempo maravilloso, viví mis mejores momentos de universidad, el mechoneo insuperable, pastawa, los paros, las asambleas, los carretes en los pastos, los recreos en el quiosco, las amanecidas estudiando, las idas a cartawa, las clases, en fin, todo. El primer semestre junto con mis amigos Romina, Kike, Peón, Barbarilla, Pato, Nachito, Kabir, Felipe Cara de Pato, Barbarilla, sin duda fue el mejor, pero tanto relax nos pasó la cuenta con las notas y muchos de mis compañeros optaron por irse. El segundo semestre tuve que ponerme las pilas y conocí a mis grandes amigas, estudiosas y responsables, andábamos para todas partes juntas y por este motivo nos bautizaron como “el pack”, ellas me ayudaron, subí las notas y fue así como logré un cupo en Biotecnología. Si bien había



alcanzado un hito fundamental en mi trayectoria académica, me costaba aceptar que no se repetirían los momentos con mis inseparables compañeros de Bachi, aunque allí conocí también a Feño, con quien entramos juntos a Biotec, y desde entonces nos hemos apoyado entre los dos. Cuando recién llegamos no conocíamos a nadie, salvo a los *bachitec*, los ramos eran difíciles, pero con el tiempo fuimos descubriendo a nuestros compañeros y personas de otras carreras de ciencias y me di cuenta de que había mucha gente parecida a mí y buena onda, imposible nombrarlos a todos, pero sin duda los tengo grabados en mi memoria y en mi corazón. Además, conocí a mis grandes amigas, Eli, Marielilla, Fabi, Gabi, quienes junto con Feño llenaron mi vida universitaria, muchos momentos que vivimos y seguiremos viviendo juntos. En lo académico, persistía mi interés en investigar algo relacionado con medicina y que ayudara a las personas. Llegué, entonces, al Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, al Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral, donde me entrevisté con el Dr. Flavio Salazar para solicitar me permitiera realizar allí mi tesis. Y él me brindó una muy buena acogida, en un principio costó adaptarse al ritmo de un laboratorio, pero ese período duró poco y terminé sintiéndome muy contenta de trabajar ahí, especialmente por las personas que conocí. El proceso no estuvo exento de dificultades, sobretodo por la situación monetaria del laboratorio, pero aún así, tuvo mucho más de dulce que de agraz, todo el tiempo que estuve ahí, sentí el cariño y apoyo de las personas, no solo del laboratorio, sino también de todo el Programa de Inmunología. De hecho no fue una despedida fácil, pero entiendo que es necesario seguir creciendo y buscando nuevas oportunidades, y como dicen por ahí, “la vida es un círculo” y espero que tarde o temprano nos volvamos a encontrar.



AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Flavio Salazar, por haber confiado en mí y haberme dado la oportunidad de estar en su laboratorio. A mi cotutor, Fermín González, por haberme guiado en este camino de la mejor manera posible, por haber compartido conmigo sus conocimientos y por su sentido del humor y paciencia al momento de enseñarme el arte laboratorístico. A Mercedes "Meche" López, por haberme acogido tan bien, y estado ahí cada vez que tuve alguna duda inmunológica. A mis amigos del alma "mis favoritos", Eli, Marielilla y Feño por darme ánimo en los momentos difíciles e inundarme con su alegría en los felices, a Fabi, Gabi, a mis amigos y compañeros universidad, a mis amigas del pack. A mis yuntas de laboratorio Gaby, Carito, Ana Adelia y Patty, gracias por haber estado ahí para mí todo el tiempo, a la Xime. A los mechesísticos Fabián, Falcón, Feña, Polilla, por la buena onda dentro y fuera del laboratorio. Saffie, por hacerme reír, ayudarme en tantas oportunidades y no dudar en prestarme reactivos cada vez que te lo pedí. A Pereda por alegrarme con tus chistes, acompañarme al citómetro, darme leucos, el data, etc etc etc. Tammy, por todos momentos en que estuviste ahí, no sólo para cosas experimentales con la mejor disposición, sino también por haberme escuchado y aconsejado. Marisol, por haber sido mi mamá postiza todo este tiempo. Dago, por haberme cuidado a mí y a mis ratones y por todos los momentos que compartimos. Gracias también a Lore Salazar, Doguis, Tita, Marquitos, Paula Fluxá por haber sido parte de todo este proceso. Juani, por haberme aguantado cada vez que te molesté para pedirte cosas y nunca haberme dicho que no, por el cariño que me brindaste todo este tiempo. Rut, por haberme enseñado gran parte de lo que hoy sé de ratones con la mejor disposición y buena onda. Al laboratorio del doctor Ferreira, por las innumerables veces en que me salvaron prestándome materiales, Isma, Fran, Leito, Paula, Lore, Andrea, etc. A las niñas del laboratorio de MCM, mención especial para mi amiga Karina y a la Garotiña, gracias Carito por guiarme, por tus sabias palabras y por darme ánimo cuando no veía la luz. Por supuesto, a todos los Aguillones, me llevo el mejor recuerdo de ustedes, Robert, gracias por tu ayuda purificando el tan fundamental anticuerpo, Lore, Nicole, Pauli, Asunción, gracias por la buena onda siempre y nunca haberme puesto una mala cara cuando iba a pedirles hasta tubos Eppendorf! Norbit, gracias por tu alegría, chispa y conversaciones varias. Don Félix, don Pato, señora Nancy, Orito, señora Inelia y señora Gladys, gracias por haberme ayudado cada vez que lo necesité. Gracias a todos y cada uno de los miembros del programa, sin duda los recordaré siempre...Y para el final dejo lo más importante, a mi familia maravillosa, de la cual me siento tan orgullosa, tíos, primos, abuelito, abuelita hermosa que me acompañas desde el cielo, a mis hermanos que los amo con el alma y por supuesto a mis padres y a Dios, porque sin ellos no sería la persona que soy hoy, gracias por darme las herramientas y guiarme en el camino de la vida con tanto amor.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>ii</i>
<i>ÍNDICE DE CONTENIDOS</i>	<i>iii</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>v</i>
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	<i>vi</i>
<i>ABREVIATURAS</i>	<i>vii</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>x</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>xi</i>
<i>1. INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
<i>2. HIPÓTESIS</i>	<i>13</i>
<i>3. OBJETIVOS</i>	<i>13</i>
3.1 OBJETIVO GENERAL	<i>13</i>
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	<i>13</i>
<i>4. MATERIALES Y MÉTODOS</i>	<i>14</i>
4.1 Preparación del lisado tumoral de melanoma (TRIMEL)	<i>14</i>
4.2 Obtención de PBMC de sangre periférica desde concentrados leucocitarios de donantes sanos	<i>15</i>
4.3 Generación de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM	<i>15</i>
4.4 Fenotipificación de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM.....	<i>16</i>
4.5 Ensayo de trans migración <i>in vitro</i>	<i>16</i>
4.6 Cepas animales usadas en ensayos de migración <i>in vivo</i>	<i>18</i>
4.7 Purificación de anticuerpo anti NK1.1 desde líquido ascítico.....	<i>18</i>
4.8 Ensayo de migración <i>in vivo</i>	<i>18</i>
4.9 Inmunohistoquímica.....	<i>19</i>

4.10 Análisis estadístico.....	20
5. <i>RESULTADOS</i>	21
5.1 Evaluación fenotípica de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM.....	21
5.2 Evaluación de la capacidad migratoria de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados en respuesta a CCL19 en ensayos de quimiotaxis <i>in vitro</i>	24
5.3 Evaluación de la capacidad migratoria <i>in vivo</i> de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados hacia nodos linfáticos en el modelo C57/BL6J.....	26
6. <i>DISCUSIÓN</i>	35
7. <i>CONCLUSIONES</i>	41
8. <i>BIBLIOGRAFÍA</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de las secuencias aminoacídicas humanas y murinas para CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21	4
Figura 2. Diferenciación y activación <i>ex vivo</i> de DCs para inmunoterapia del cáncer. ...	6
Figura 3. Inmunoterapia con células dendríticas	8
Figura 4. Sobrevida post-inmunoterapia, sobrevida libre de progresión (PFS), y respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH) en pacientes con MM etapa IV.....	11
Figura 5. Generación del lisado tumoral TRIMEL.....	14
Figura 6. Ensayo de quimiotaxis <i>in vitro</i> en cámara de Transwell.....	17
Figura 7. Morfología de DCs vistas al microscopio luego de 48 horas de cultivo.....	21
Figura 8. Density plots representativos de al menos 6 análisis de fenotipificación independientes.	22
Figura 9. El TRIMEL induce un fenotipo de DC madura en TAPCells y TAPCells + IFN- α	23
Figura 10. Ensayo de trans migración <i>in vitro</i> en cámara de Transwell.....	25
Figura 11. Estandarización de la concentración de PKH67.....	27
Figura 12. Gel de electroforesis de las fracciones eluidas.	28
Figura 13. Depleción de células NK mediante anticuerpo anti-NK1.1	29
Figura 14. Ensayo de migración <i>in vivo</i> en ratones depletados de células NK.....	30
Figura 15. Dots plots representativos de nodos linfáticos extraídos de ratones C57/BL6J 24 horas después de la inyección ectópica de las distintas APCs.	32
Figura 16. Migración de APCs <i>in vivo</i> en ratones C57/BL6J depletados de NK.....	33
Figura 17. Presencia de células dendríticas humanas en nódulos linfáticos de ratones C57 inyectados con AM, TAPCells o TAPCells + IFN- α	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estandarización y toxicidad de PKH67	33
--	----

ABREVIATURAS

APC	: Célula presentadora de antígenos
BSA	: Albúmina de suero bovino
CCR	: Receptor de quimioquina CC
CCL	: Ligando de quimioquina CC
DAMP	: Patrón molecular asociado a daño
DC	: Célula dendrítica
DITC	: Dicarbazina
DTH	: Hipersensibilidad cutánea de tipo retardada
ELC	: Quimioquina ligando de EB11 (CCL19)
GMCSF	: Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
IFN- γ	: Interferón gama
IFN- α	: Interferón alfa
kDa	: Kilo Dalton
IL-4	: Interleuquina 4
LPS	: Lipopolisacárido
LN	: Nodo linfático
MAA	: Antígeno asociado a melanoma
MHC-I	: Molécula de histocompatibilidad clase I
MHC-II	: Molécula de histocompatibilidad clase II
mDC	: Célula dendrítica madura
MM	: Melanoma maligno
moDCs	: Células dendríticas derivadas de monocitos
NK	: Natural killer
PAMP	: Patrón molecular asociado a patógeno
PBMC	: Células mononucleares derivadas de sangre periférica
PBS	: Buffer fosfato salino
TLR	: Receptor de tipo Toll
TRIMEL	: Lisado de melanoma

SFB : Suero fetal bovino
SLC :Quimioquina de nodo linfático secundario (CCL21)
rpm : Revoluciones por minuto
 μ M : Micromolar

"If you don't know where you are, you don't know who you are...Migratoriness has its dangers." The sense of place, Wallace Stenger (Random House, 1992)

RESUMEN

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígenos profesionales derivadas de la médula ósea. Debido a su rol como potentes inductores de la respuesta inmune, estas células son ampliamente usadas en contextos clínicos experimentales en inmunoterapias anti-tumorales. Recientemente ha sido desarrollada una vacuna basada en DCs usando monocitos autólogos cargados con lisados tumorales alogénicos de tres líneas de melanoma diferentes (TRIMEL) para el tratamiento de pacientes con melanoma maligno (MM). Estas DCs, denominadas TAPCells, tienen la propiedad de ser altamente eficientes en la presentación de antígenos asociados a melanoma (MAAs) y por lo tanto son eficaces en generar una respuesta inmune anti-tumoral. Una de las propiedades que deben tener estas células es la capacidad de migrar de manera eficiente a los nodos linfáticos, de manera que puedan presentar antígenos tumorales a las células T que allí residen. Se ha demostrado que una de las moléculas involucradas en el proceso de migración es el receptor de quimioquina 7 (CCR7), el cual es regulado positivamente durante el proceso de maduración de las DCs. En este trabajo se determinó la expresión de este receptor en TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados (AM), mediante citometría de flujo, y se observó que este receptor es regulado positivamente durante el proceso de maduración inducido por TRIMEL. También se estudió su capacidad de migración a través de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Se demostró que tanto TAPCells y TAPCells + IFN- α como monocitos activados son capaces de migrar *in vivo* hacia nodos linfáticos en un período de 24 horas. Sin embargo, en ensayos *in vitro*, se demostró que TAPCells y TAPCells + IFN- α migran significativamente más que monocitos activados en respuesta a la quimioquina CCL19. Todos estos resultados sugieren la habilidad migratoria de estas células dendríticas, importante para el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral efectiva.

ABSTRACT

Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells derived from the bone marrow. Because of their role as potent inducers of the immune responses, these cells are widely used as adjuvants in clinical experimental anti-tumor immunotherapies. Recently, a vaccine based on DCs derived from autologous monocytes loaded with allogeneic tumor lysates from three different melanoma lines (TRIMEL) has been developed for the treatment of patients with malignant melanoma (MM). These DCs, named TAPCells, have the property of being highly efficient in presenting melanoma-associated antigens (MAAs) and therefore are effective in generating an anti-tumor immune response. One of the properties that these cells must have is the ability to efficiently migrate to lymph nodes, so that they can present tumor antigens to T cells that reside there. It has been shown that one of the molecules involved in the migration process is the chemokine receptor 7 (CCR7), which is upregulated during the maturation of DCs. In this work we determined the expression of this receptor in TAPCells, TAPCells + IFN- α and activated monocytes (AM) by flow cytometry, and we found that this receptor is upregulated during the maturation process induced by TRIMEL. We also studied the migration ability through *in vitro* and *in vivo* assays. We showed that both TAPCells and TAPCells + IFN- α and activated monocytes are able to migrate *in vivo* to lymph nodes in a period of 24 hours. However, *in vitro* assays showed that TAPCells and TAPCells + IFN- α migrate significantly more than activated monocytes in response to the CCL19 chemokine. All these results, suggest the migratory ability of these dendritic cells, which is critical for the development of an effective anti-tumor immune response.

1. INTRODUCCIÓN

a) Células presentadoras de antígenos

Las células presentadoras de antígenos (APCs) son células esenciales en la respuesta inmune, ya que actúan como puente entre la inmunidad innata y la adaptativa. Dentro de las APCs se encuentran macrófagos, linfocitos B y células dendríticas (DCs), siendo estas últimas las más potentes. Las DCs son células presentadoras de antígenos especializadas que juegan un rol dual al inducir por un lado respuestas inmunes adaptativas hacia antígenos extraños y por el otro mantener la tolerancia hacia antígenos propios (Steinman & Banchereau, 2007).

En la periferia las DCs juegan un rol crítico en la detección de patógenos y células neoplásicas así como en la inducción de la respuesta inmune adaptativa a través de la estimulación de células T en los nodos linfáticos regionales (LNs). Para las DCs se han descrito dos estadios de desarrollo principales: DCs inmaduras y DCs maduras. Las DCs inmaduras, presentan una alta tasa de endocitosis, resultando en una alta captura de antígenos. Su migración hacia los sitios de inflamación es regulada por receptores de quimioquinas inflamatorias como CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1 y CXCR2. Al mismo tiempo, las DCs secretan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias que reclutan otras DCs inmaduras, monocitos y macrófagos (Sallusto y col, 1998).

Cuando las DCs adquieren un fenotipo maduro, producto de las señales de peligro asociadas a patógenos (PAMPs) o a células dañadas (DAMPs), las DCs disminuyen la expresión de los receptores de quimioquinas CCR1, CCR2, CCR5, y CCR6, y aumentan la expresión de CCR7, haciéndose sensibles a las quimioquinas CCL21 y CCL19 (Ritter y col, 2004; Sallusto y col, 1999; Sozzani y col 1998; Yanagihara y col, 1998).

b) Migración de DCs desde la periferia hacia LNs

Sin duda una etapa de crítica importancia para la orquestación de la respuesta inmune es la migración de las células dendríticas desde el tejido inflamado/infectado o maligno y a través de las vías linfáticas aferentes, hacia los nodos linfáticos secundarios más cercanos, donde va a ocurrir la presentación antigénica a los linfocitos T vírgenes, encargados en último término de eliminar al agente extraño o célula tumoral (Alfaro y col, 2011).

Las quimioquinas son mediadores críticos del *homing* celular, es decir, el proceso mediante el cual una célula determinada alcanza su tejido blanco, durante la vigilancia inmune de rutina, la inflamación y el desarrollo. Dentro de un tejido específico, la migración celular ocurre a través de la generación de un gradiente de quimioquinas e involucra el sensar sutiles diferencias de concentraciones de éstas, así como la polarización de las células que migran. Esta polarización es seguida del movimiento direccional de la célula, a través de re-ordenamientos de su citoesqueleto, cambios en la afinidad de la integrina (inducidos por la activación) e interacciones de tipo adhesivas con la matriz extracelular. Todos estos procesos ocurren de manera coordinada con extensión y retracción de protrusiones de la membrana celular (pseudópodos) (Rodríguez-Frade y col, 1999). En su mayoría, los ligandos quimioquinas son proteínas de 8 a 12kDa que contienen 1 a 3 (usualmente 2) puentes di-sulfuro.

Si bien su homología de secuencia es altamente variable, sus estructuras terciarias son muy similares. Una vez que son secretadas hacia el exterior, se unen a receptores acoplados a proteínas G causando cambios conformacionales que gatillan vías de señalización intracelulares involucradas en la activación y el movimiento de las células hacia los sitios donde son requeridas. Entre estos receptores de quimioquinas, CCR7 expresado en células dendríticas maduras (mDCs) así como linfocitos T, B y células natural killer (NK), es de suma importancia en la respuesta inmune, debido a su rol central en el *homing* o migración diferencial de linfocitos y mDCs a través de vénulas a los órganos linfoides secundarios (Sallusto y col, 1998; Stein y col, 2003). Más

aún, en ratones deficientes en CCR7 se ha demostrado que algunos LNs están desprovistos de linfocitos T vírgenes y DCs, mientras que la población de células T se encuentra expandida en sangre, bazo y la médula ósea. Además, estos ratones knock-out (KO) muestran cinéticas severamente retardadas en cuanto a respuestas de anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad retardadas concierne. De manera interesante, las células dendríticas maduras de estos ratones KO fallan en migrar a los nodos linfáticos drenantes (Forster y col 1999; Ohl y col, 2004). A través de estos estudios, se da cuenta del rol crítico que tiene este receptor en las respuestas inmunes primarias.

CCR7 es activado por dos ligandos diferentes, CCL19 (ELC, Exodus-3, MIP-3 β , CK β 11) y CCL21 (SLC, Exodus-2, 6Ckine, TCA-4), ambas quimioquinas CC son altamente expresadas por las células estromales en el área de células T de los LNs (Willmann y col, 1998; Luther y col, 2000). La activación de este receptor mediada por estas dos quimioquinas gatilla la re-organización de los filamentos de actina, el flujo de calcio hacia el interior, la activación de MAPK, y Erk1/1, resultando en la migración de la célula hacia la quimioquina (Scandella y col, 2004; Sanchez-Sanchez y col, 2006). Experimentos en ratones *plt/plt* que carecen de CCL19 y uno de los dos genes que codifican para CCL21 muestran que estos ligando son esenciales para el *homing* a LNs (Gunn y col, 1999; Luther y col, 2000).

La función de estas quimioquinas en el proceso de *homing* ha sido también corroborada en ratones transgénicos donde la expresión ectópica de CCL19 muestra que las células presentadoras de antígenos son retenidas en la periferia, impidiendo su migración a los nodos linfáticos drenantes, lo cual resulta en una respuesta inmune totalmente impedida (Krautwald y col, 2004).

En general las secuencias aminoacídicas de quimioquinas y sus receptores son conservadas en humanos y murinos. Tal es el caso de CCR7 y sus ligandos CCL19 y CCL21. En la figura 1 se muestra el alineamiento de secuencias aminoacídicas humana y murina para las proteínas CCR7, CCL19 y CCL21 y los porcentajes de homología entre dichas secuencias que son 87, 83 y 86% respectivamente.

manipulación del sistema inmunológico de manera de poder controlar y disminuir la progresión de la enfermedad. A diferencia de los patógenos infecciosos que son inmediatamente reconocidos por el sistema inmune como agentes extraños, las células tumorales, al ser células anormales pero propias, no siempre son capaces de inducir una respuesta inflamatoria efectiva que conduzca a una activación óptima de las células dendríticas DCs y como resultado la respuesta inmune anti-tumoral es a menudo débil e inefectiva (Gilboa, 2007).

La incapacidad del sistema inmune de eliminar todas las células cancerosas o precancerosas favorece el crecimiento de tumores con inmunogenicidad reducida, es decir, la progresión o escape tumoral puede ocurrir a pesar de la inducción de respuestas inmunes. Por esta razón, la administración de vacunas que estimulen respuestas tumorales endógenas representa una alternativa beneficiosa y que podría eventualmente llevar a la erradicación efectiva de tumores. (Lubong & Bhardwaj, 2011). Actualmente numerosos estudios demuestran el potencial terapéutico de las células dendríticas en vacunas anti-tumorales.

El propósito primordial de vacunar individuos con cáncer es entregar directamente antígenos tumor-específicos a las células dendríticas y así proveer las condiciones para su maduración hacia potentes APCs desde el punto de vista inmunestimulador (Gilboa, 2007). Hasta la fecha se han realizado estudios clínicos con DCs de este tipo en pacientes con variados tipos de cáncer, incluyendo cáncer de mama, mieloma múltiple, cáncer de próstata, carcinoma de célula renal, melanoma maligno, cáncer colo-rectal y cáncer pulmonar entre otros.

El enfoque más comúnmente usado en vacunas basadas en células dendríticas es la diferenciación de DCs a partir de células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC) obtenida desde sangre total o mediante el procedimiento de leucoaféresis, en el cual, se extraen los glóbulos blancos presentes en la sangre de forma selectiva. Estas DCs son llamadas DCs derivadas de monocitos (moDCs). Tal protocolo se muestra en la figura 2.

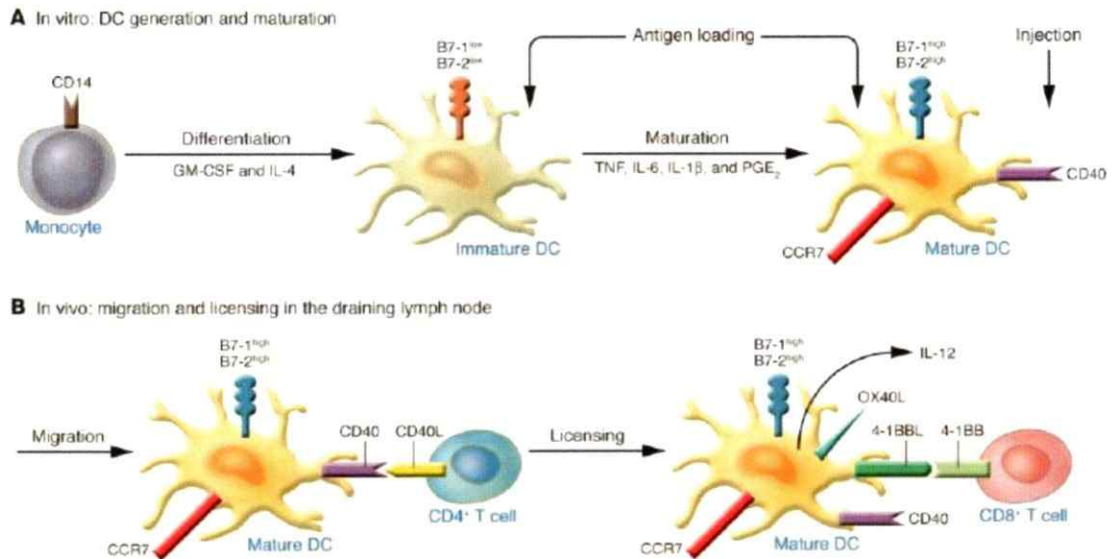


Figura 2. Diferenciación y activación *ex vivo* de DCs para inmunoterapia del cáncer. **A** Monocitos CD14⁺ son cultivados en medio libre de suero y en presencia de GM-CSF e IL-4, diferenciándose a DCs inmaduras. La maduración de las DCs se logra cultivando DCs inmaduras por otras 24-48 horas adicionales en presencia de agentes biológicos, siendo el más popular, una combinación de TNF, IL-6, IL-1 β , y PGE₂. DCs maduras expresan aún más CD40, CD80, y CD86 e inducen la expresión de receptor de quimioquina 7 de *homing* a linfonodo (CCR7). La carga de antígeno ocurre ya sea en estado maduro o inmaduro. **B** *In vivo* migran a nodos linfáticos donde presentan antígenos a sus linfocitos T-CD4 específicos. El cross-linking de CD40 presente en las células dendríticas con CD40L expresado por células T CD4 activadas por antígeno, induce a las DCs maduras a diferenciarse aún más en un proceso conocido como licenciamiento. Las DCs licenciadas, presentan antígenos a sus células CD8⁺ afines. (Modificado de Gilboa, 2007).

La mayoría de los estudios clínicos que utilizan inmunoterapia basada en DCs usan un cóctel de citoquinas proinflamatorias para madurar las DCs (Lee y col, 2003). CD40 ligando (CD40L) también ha sido utilizado para madurar DCs. CD40L se expresa en células T CD4⁺ y cuando se une a CD40 expresado en las DCs, induce su maduración, luego de lo cual estas son capaces de efectuar el "priming" a células T CD8⁺ y transformarlas en células efectoras, es decir, con la capacidad de identificar y eliminar células neoplásicas mediante citotoxicidad. CD40L ha sido usado para madurar DCs usadas en vacunas en estudios clínicos (Palucka y col, 2006) y en combinación con TNF o IFN- α . Esta última citoquina, pertenece a la familia de interferones tipo I producidos en respuesta a una infección, en particular una infección viral. Como parte del sistema inmune inhiben la replicación viral y activan la citotoxicidad dependiente de

NK. Sin embargo, pueden tener acciones indirectas y modular las DCs para facilitar la diferenciación hacia un perfil Th1 y presentación CTL (Svane IM y cols, 2005). Más aún, varios estudios indican que puede ser importante para la diferenciación y maduración de DCs. El agregar IFN- α al coctel estándar resulta en la sobreexpresión de CD38 y CD83 y una capacidad aumentada de inducir respuestas de células T autólogas. Estas y otras observaciones sugieren que esta citoquinas debería ser incluida en protocolos de maduración de células dendríticas usadas en inmunoterapias anti-tumorales (Trepiaikas y col, 2009).

Los receptores de tipo Toll (TLRs) son receptores de reconocimiento de patógenos que se unen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). La activación de los TLRs induce la maduración en DCs y la sobreexpresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citoquinas y quimioquinas (Schnare y col, 2001). Además, la activación simultánea de diferentes TLRs presentes en las DCs puede tener efectos sinérgicos en su función.

El mecanismo más común por el cual las DCs son cargadas es pulsándolas con péptidos, proteínas o las mismas células tumorales irradiadas. La preparación para cargar los péptidos, proteínas o células tumorales es un proceso relativamente sencillo, e involucra la incubación de las DCs, antes o después de la maduración con los péptidos, células o proteínas elegidas (O'Neill & Bhardwaj, 2005b). Los péptidos son cargados directamente en las moléculas MHC clase I o II en la superficie de las DCs mientras que el uso de proteínas y células tumorales requieren el procesamiento inicial y presentación por las DCs para estimular las células CD4⁺ y CD8⁺. Una vez cargadas con antígenos, las DCs pueden ser congeladas en alícuotas, y descongeladas a medidas que se requieran para la vacunación (O'Neill & Bhardwaj, 2005b).

Las células tumorales expresan antígenos que son reconocidos por el sistema inmune. Hay un número de antígenos asociados a tumor (TAAs) caracterizados para células CD4⁺ y CD8⁺ que pueden ser explotados para inmunoterapia. La principal desventaja de usar péptidos es que es necesario conocer el conjunto de alelos MHC presente en el paciente. En el caso de las MHC de clase I, estas están codificadas en tres genes presentes en el cromosoma 6 (A, B y C) y se heredan de manera codominante, por

lo cual cada persona tiene como máximo 6 moléculas MHC-I distintas, y cada una de ellas, un grupo de péptidos específicos que se le unen (restricción MHC). Por lo tanto, dado que es probable que en algunos pacientes, los péptidos usados no encajen en ninguno de sus MHC, una terapia con dichos péptidos, no les sería útil (Speetjens y col 2009; Melief y col, 2008). En el caso del uso de células dendríticas cargadas con proteínas y tumor/líneas tumorales alógenicas o autólogas, este no está limitado a un haplotipo determinado (Lubong & Bhardwaj, 2008).

Con respecto al uso terapéutico de las vacunas con DCs, el éxito clínico de dichas vacunas ha sido limitado. A pesar de la inducción de respuestas de células T específicas contra tumor, en muchos pacientes y la regresión ocasionalmente completa de tumores, la mayoría de las vacunas de DCs no se han traducido en respuestas terapéuticas significativas. Casi 200 estudios con vacunas han sido reportados hasta la fecha siendo el melanoma el cáncer más comúnmente a tratar (www.mmri.mater.org.au). De manera global, los ensayos clínicos han demostrado la viabilidad y seguridad de las vacunas DC. Las DCs más comúnmente usadas para estos estudios son las moDCs generadas a partir de monocitos con GM-CSF e IL-4 (Lubong & Bhardwaj, 2008). En la figura 3, se muestra una representación de la inmunoterapia basada en DCs, usadas en la mayoría de los estudios clínicos actuales.

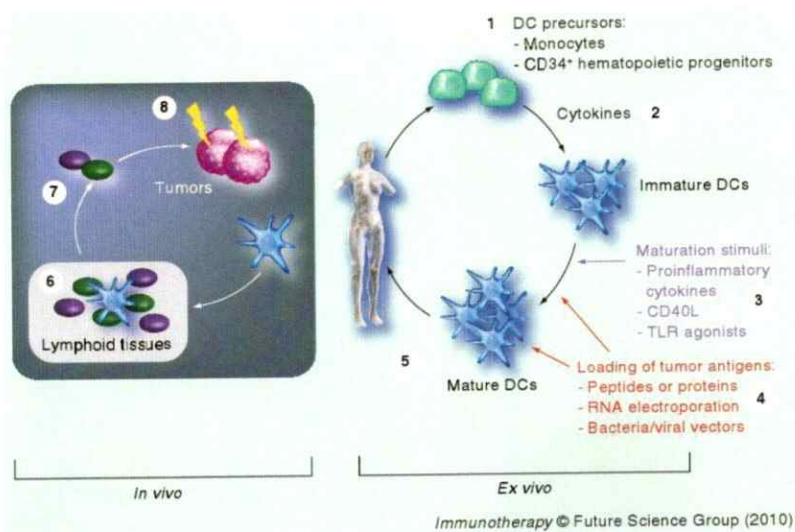


Figura 3. Inmunoterapia con células dendríticas. La mayoría de las vacunas basadas en DCs actualmente exploradas para inmunoterapia en estudios clínicos consisten en DCs autólogas maduras cargadas con antígenos que son administradas a los pacientes con la intención de potenciar sus respuestas inmunes antígeno-específicas. CD40L: CD40 ligando; DC: célula dendrítica; TLR: Toll-like receptor (Modificado de

Lubong & Bhardwaj, 2008)

El melanoma es un tumor maligno de origen ectodérmico, derivado de la transformación de las células productoras de melanina, llamadas melanocitos. El melanoma es de los cánceres de piel más graves y agresivos que existen. En muchos de los casos consigue atravesar la barrera epitelial y a través de la sangre o del sistema linfático logra diseminarse rápidamente a los nodos linfáticos regionales y posteriormente a los distintos órganos, principalmente pulmones, piel, hígado, cerebro y hueso (Herlyn, 1990).

Como la mayoría de los cánceres, el melanoma puede ser tratado cuando se detecta en etapas tempranas, principalmente cuando el tumor está restringido a la epidermis. Más aún, con la extracción quirúrgica del tumor más del 95% de los pacientes sobreviven. Sin embargo, en etapas tardías, esto es, cuando el melanoma se encuentra diseminado por el organismo (etapa IV), es altamente resistente a los tratamientos convencionales como la cirugía, radioterapia y quimioterapia. La mediana de supervivencia de estos pacientes es de aproximadamente 10 meses (Seetharamu, 2009).

Desde el punto de vista inmunológico, el melanoma maligno, es un cáncer relativamente inmunogénico, expresa varios antígenos asociados a melanoma (MAAs) de carácter conocido y que son detectados por el sistema inmune (Boon y col, 2006). A pesar de que tiene una tasa de respuesta relativamente baja (15,3%) con una mediana global de supervivencia de entre 6 a 11 meses, la quimioterapia basada en dacarbazina (DTIC) es comúnmente usada para tratar el melanoma diseminado (Eigentler y col, 2003; Eggermont, 2006; Quirt y col, 2007). Diversos estudios etapa III han explorado el beneficio de combinar drogas citostáticas o citoquinas recombinantes, tales como IFN- α e IL-2 con DTIC, y si bien se ha observado mayor toxicidad esta no se ha traducido en respuestas mejoradas (Eigentler y col, 2003; Eggermont, 2006; Quirt y col, 2007; Falkson y col, 1998; Keilholz y cols, 2005).

En nuestro laboratorio se ha desarrollado una metodología experimental para el tratamiento de pacientes con melanoma avanzado, el cual se basa en la inyección de células dendríticas pulsadas con lisados de melanoma alogénicos. Estudios clínicos etapa

II realizados con esta terapia, confirman la efectividad de las células dendríticas cargadas con TRIMEL para tratar pacientes con melanoma etapa III y IV. Se ha observado un aumento significativo en la producción de IFN- γ *ex vivo* en la mitad de los pacientes tratados. Además de una correlación significativa entre los pacientes que presentan reacción de hipersensibilidad retardada tipo IV positiva (DTH+) contra TRIMEL y su sobrevida corto plazo post-vacunación y sobrevida libre de progresión (López y col, 2009). Específicamente, se define como reacción positiva el desarrollo de un eritema o induración igual o mayor a 5mm 48 horas después de la inyección de TRIMEL. Del total de pacientes vacunados, el 62,2% presentó una reacción DTH+, el resto, no tuvo reacción o ésta fue menor a 5mm. De manera interesante, las curvas de sobrevida de los pacientes en etapa IV DTH+ fueron tres veces más prolongadas que las de los pacientes DTH-. Estos últimos tuvieron una mediana de sobrevida de 11 meses, mientras que en aquellos DTH+ la mediana de sobrevida fue de 33 (figura 4).

Este es el primer artículo donde se demuestra esta correlación entre respuestas inmunes positivas inducidas por la vacuna con células dendríticas y la sobrevida largo plazo de pacientes con melanoma de etapa tardía. Más aún, los resultados sugieren que la reacción DTH contra los antígenos del TRIMEL, constituyen un excelente predictor clínico de la respuesta, dado que esta reacción inmune se correlaciona directamente con la sobrevida de los pacientes y la ausencia de progresión de la enfermedad (López y col, 2009). Por esta razón, en nuestro laboratorio se ha diseñado el protocolo de generación de células dendríticas basadas en el lisado de melanoma TRIMEL, el cual no sólo provee una fuente estandarizada y ampliamente aplicable de MAAs específicos, sino que además induce maduración de DCs *in vitro* como ha sido previamente descrito (Escobar y col, 2005; Mendoza-Naranjo, 2007).

Recientemente han aparecido numerosas evidencias que indican que las señales de peligro mediadas por los DAMPs, son liberadas por las células estresadas o moribundas del tumor o del estroma que lo rodea, activando así a células dendríticas (Matzinger, 2007; Sauter y col 2000; Bianchi, 2007; Chen y col, 2009). La presencia de DAMPs en el TRIMEL puede explicar en parte la mejora en la inmunogenicidad

observada *in vivo* e inducida por nuestras DCs en varios de los pacientes tratados. De hecho, el 62% de los pacientes tratados mostraron una reacción DTH hacia el TRIMEL luego de un ciclo completo de vacunación. La reactividad DTH hacia los antígenos controles descarta que la ausencia de DTH asociada a TRIMEL esté relacionada a un estado de inmunosupresión generalizado (López y col, 2009).

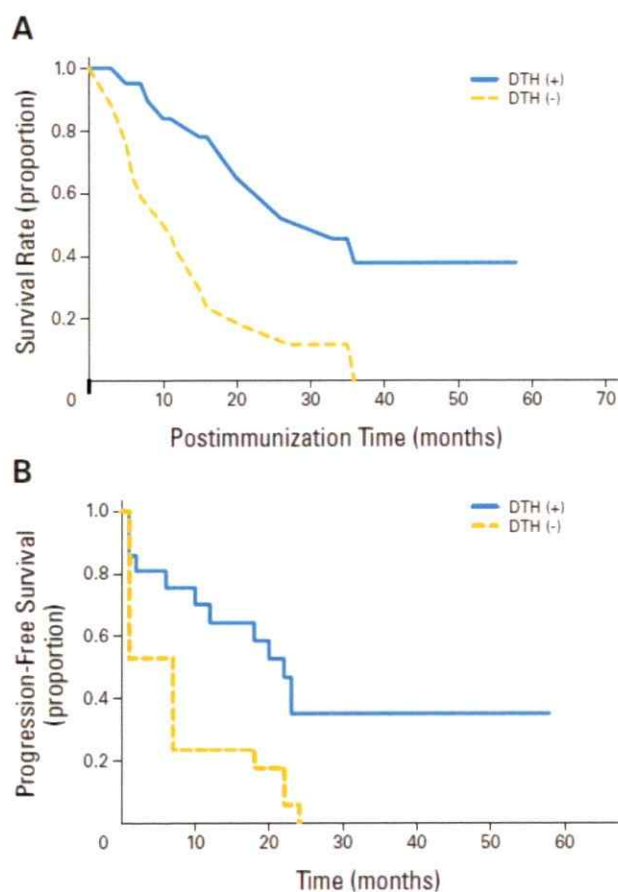


Figura 4. Sobrevida post-imunoterapia, sobrevida libre de progresión (PFS), y respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH) en pacientes con MM etapa IV. A Curva de sobrevida de pacientes con MM etapa IV. **B** Curva de progresión libre de tumor de los pacientes luego del tratamiento con células dendríticas (DCs) autólogas pulsadas con TRIMEL y agrupadas de acuerdo a su respuesta DTH; n=21 DTH positivos; n=17 DTH negativos. Las diferencias entre las curvas de sobrevida en ambos gráficos son estadísticamente significativas ($P < 0.01$) (López y col, 2009).

A pesar de que la sobrevida aumentada parece ser independiente de las regresiones tumorales inducidas por la vacuna, los pacientes DTH positivos con masa tumoral mínima, tales como pacientes etapa III, o quirúrgicamente tratados mostró el mejor resultado clínico, apoyando otros hallazgos de la resección del tumor combinada con inmunoterapia adyuvante (Young, 2006). Cabe destacar de este estudio el hecho de que siete pacientes etapa III permanecieron libre de tumor por una mediana de 48 meses luego de las inmunizaciones, cuando según el AJCC (American Joint Committee on Cancer), se espera que solo el 30-40% de los pacientes sobrevivan en esta etapa. Estas evidencias sugieren que la respuesta inmune específica inducida por las vacunas con TAPCells impacta la condición general de los pacientes y su calidad de vida al controlar la diseminación de la metástasis del tumor más que por la destrucción misma del tumor establecido (López y col, 2009).

A partir de lo anteriormente descrito queda establecido que la migración de las células presentadoras de antígenos, y particularmente las TAPCells, a los sitios de encuentro con linfocitos T (nodos linfáticos secundarios) es uno de los requisitos para que se produzca una respuesta inmune eficiente. Es por esta razón que este estudio, pretende caracterizar fenotípicamente la expresión de CCR7 en DCs de diferenciación rápida actualmente utilizadas en inmunoterapia contra melanoma, así como, la eficiencia en la migración de las mismas, usando para ello análisis *in vitro* e *in vivo*.

2. HIPÓTESIS

Las células presentadoras de antígenos tumorales denominadas TAPCells durante su maduración regulan positivamente la expresión del receptor de quimioquina CCR7, lo cual les confiere la capacidad de migrar hacia tejidos linfáticos secundarios.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión del receptor de quimioquina CCR7 en TAPCells y el efecto en su capacidad de migración en ensayos *in vitro* e *in vivo*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterizar fenotípicamente TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados (AM). En relación a su expresión de las moléculas MHCII, CD80, CD86, CD83 y CCR7.

3.2.2 Evaluar la capacidad migratoria *in vitro* de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados (AM) en respuesta al ligando de CCR7, CCL19 mediante ensayos *Transwell* de doble cámara.

3.2.3 Analizar la migración *in vivo* a órganos linfoides secundarios de TAPCells y TAPCells + IFN- α y AM mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparación del lisado tumoral de melanoma (TRIMEL)

El lisado TRIMEL proviene de tres líneas celulares de melanoma cutáneo establecidas en nuestro laboratorio a partir de melanoma maligno. Estas líneas celulares han sido seleccionadas principalmente por sus altos niveles de expresión de marcadores asociados a melanoma como MC1R, MART-1 y S-100. Para su preparación, las líneas celulares MEL1, MEL2 y MEL3 previamente descongeladas fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation) suplementado con 10 % SFB por separado en botellas T 175. El medio de cultivo fue reemplazado cada 2-3 días, según el requerimiento de cada línea celular. Una vez alcanzada una confluencia de 95 %, las células de las tres líneas fueron cosechadas mecánicamente y mezcladas en proporciones iguales. A continuación, se incubó la mezcla a 42°C por una hora y luego a 37°C durante dos horas. Finalmente, se lisaron las células utilizando tres ciclos de congelación y descongelación rápida en nitrógeno líquido. La concentración de proteínas del lisado tumoral fue determinada por el método de Bradford (Bio-Rad) en un biofotómetro Eppendorf (ver figura 5).

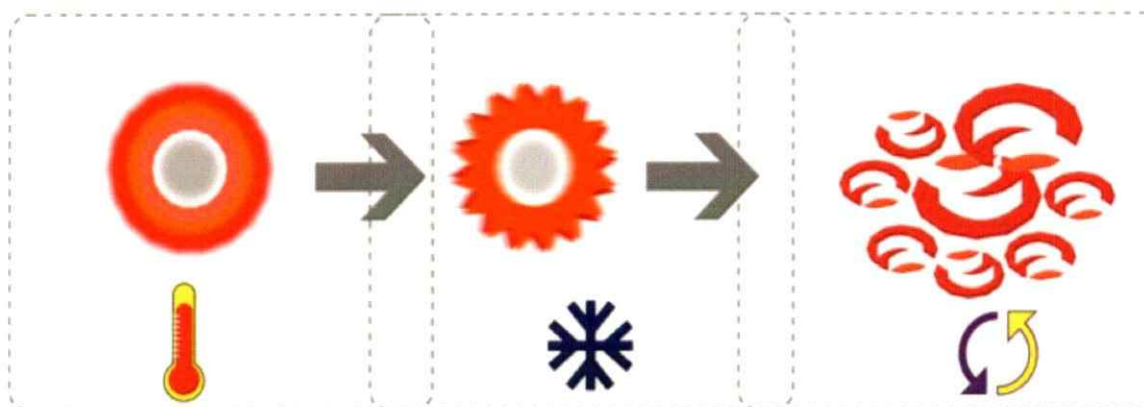


Figura 5. Generación del lisado tumoral TRIMEL. Las células provenientes de las líneas de melanoma Mel1, Mel2 y Mel3 son sometidas a estrés térmico durante tres horas luego de lo cual son lisadas mediante ciclos rápidos de congelación y descongelación en nitrógeno líquido.

4.2 Obtención de PBMC de sangre periférica desde concentrados leucocitarios de donantes sanos

La sangre obtenida desde *buffy coats* donados por Banco de Sangre del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, fue traspasada a tubos cónicos de 50ml. A continuación se mezclaron 25ml de sangre con 10ml de PBS 1X para lograr un volumen final de 35ml. Se agregaron 12ml de Ficoll-Hypaque (Axis-Shield, Oslo, Norway) usando pipeta serológica y se introdujo cuidadosamente hasta el fondo del tubo, una vez adentro se depositó lentamente el Ficoll. Se centrifugó durante 20min a 1200rpm. Transcurrido ese tiempo, se rescató mediante pipeta serológica la capa celular de PBMC correspondiente a la interfase entre el plasma y la fracción leucocitaria. Luego se lavó con PBS 1X dos veces, centrifugando entre cada lavado a 1200rpm durante 5 minutos a 4°C. Después del último lavado se resuspendió el pellet y se adicionaron 5ml de buffer de lisis ACK 1X. Se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente y se lavó con PBS 1X.

4.3 Generación de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM

Para la producción de células dendríticas de generación rápida, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) obtenidas desde leucoféresis de pacientes o separadas desde *buffy coats* mediante gradiente de densidad con Ficoll-Hypaque, fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pocillos (40 millones de células por pocillo) en 2ml de medio terapéutico libre de suero AIM-V (Invitrogen Life Technologies™) a una temperatura de 37°C y en una atmósfera CO₂ 5%. Transcurridas dos horas, se retiraron las células no adherentes, correspondientes principalmente a PBL (linfocitos de sangre periférica), mientras que aquéllas remanentes (monocitos) fueron incubados con las citoquinas rhIL-4 (500 UI/ml) (US Biological) y rhGM-CSF (800 UI/ml) (Schering-Plough). Transcurridas 22 horas se agregaron los estímulos de maduración rhTNF- α 10 ng/ml (US Biological) y TRIMEL 100 μ g/ml en el caso de las TAPCells. rhTNF- α 15 ng/ml, rhIFN- α 10ng/ml y TRIMEL 100 μ g/ml en el caso de las TAPCells + INF- α , mientras que a la condición monocitos activados, no se le agregó estímulo de maduración alguno ya que corresponde a la población control. Luego de 24 horas las células de las tres

condiciones fueron cosechadas mecánicamente y utilizadas en los experimentos que se detallan a continuación.

4.4 Fenotipificación de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM

Para la caracterización fenotípica de TAPCells, TAPCells + IFN- α) y monocitos activados (AM) se analizaron mediante citometría de flujo la expresión de las moléculas de presentación antigénica, HLA-DRQ, las moléculas coestimuladoras, CD80, CD86, el marcador de activación CD83 y el receptor de quimioquinas y responsable del *homing* a nodos linfáticos, CCR7 en la población de células CD11c+. Para esto se utilizaron los anticuerpos monoclonales anti-CD11c, anti-HLA-DRQ, anti-CD80, anti-CD86, anti-CD83 y anti-CCR7 (eBioscience). En el protocolo realizado las células generadas en 48 horas (AM, TAPCells y TAPCells + IFN- α) fueron cosechadas mecánicamente y colocadas en tubos cónicos de 15ml y separadas por condición. Luego de lo cual, fueron centrifugadas durante 5min a 1200rpm a 4°C. Los pellets obtenidos fueron resuspendidos en buffer tinción (PBS 1X 10% SFB) en cantidad necesaria para dejar las células en un volumen de 150ul por pocillo. Cada placa de citometría contiene 96 pocillos con fondo en "V". Una vez sembrada la placa, se centrifugó durante 1min a 2000rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante mediante inversión fuerte y se incubó con los anticuerpos anteriormente mencionados durante 30 minutos a 4°C. Transcurrido este tiempo, se lavó la placa dos veces con PBS 1X, centrifugándolas durante 1minuto a 2000rpm a 4°C. Las mediciones fueron realizadas en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y analizadas usando el software WinMDI 2.8. Todos los análisis se realizaron en la población de células CD11c positivas de cada condición y muestra.

4.5 Ensayo de trans migración *in vitro*

Para evaluar la capacidad migratoria de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados, se realizó un ensayo de quimiotaxis usando para ello una cámara *Transwell* de 48 pocillos (Neuroprobe, USA). La cámara inferior se cargó con 30 μ l del quimioattractante CCL19 por pocillo a una concentración de 50ng/ml o 30 μ l de AIM-V

en el caso del control negativo (ver figura 6). A continuación, se depositó sobre la cámara cargada, una membrana de policarbonato (cuyos poros son de un tamaño de 5 μm de diámetro) previamente incubada durante 24 horas con fibronectina (FN) 1 mg/ml (Invitrogen, USA) en 10ml de PBS 1X. A continuación se colocó la cámara superior y se cargó con los tres tipos de células dendríticas (50.000 células en 50 μl por pocillo; 16 pocillos por condición), dejándose incubar por un período de 2 horas.

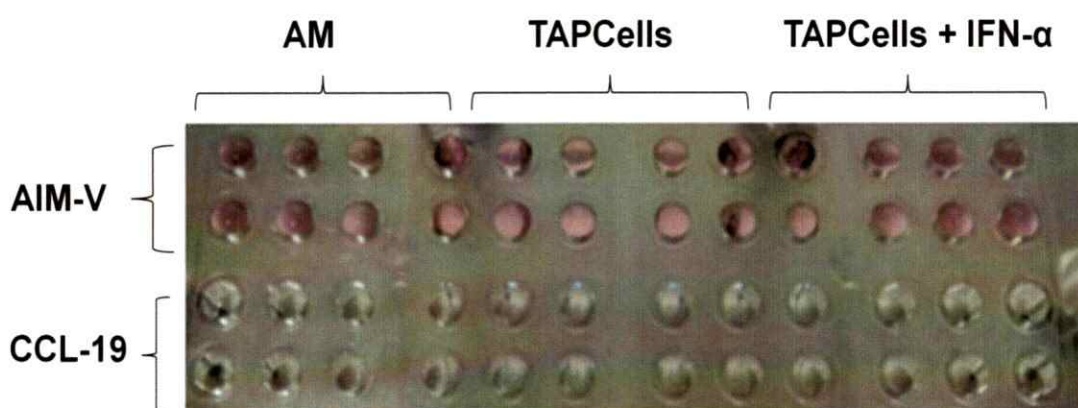


Figura 6. Ensayo de trans migración *in vitro* en cámara de Transwell. Se muestra la cámara inferior que consta de 4 filas y 12 columnas. Las dos filas superiores fueron cargadas con medio solo (control negativo), mientras que las dos inferiores con la quimioquina CCL19. La cámara superior fue cargada con TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados en el orden en que se indica (4 columnas por condición).

Posteriormente, se retiró la membrana, se fijó durante 5 minutos en metanol 100% de alta pureza, luego de lo cual se tiñó con hematoxilina durante 5 minutos y finalmente fue lavada con agua destilada y puesta entre dos placas de vidrio para su posterior análisis en microscopio invertido con aumento 40x (Leica DM IL, Alemania). Se contaron el número de células que migraron en tres pocillos de cada condición y en 5 campos por pocillo (un total de 15 campos por condición). Se hicieron tres experimentos (con células de 3 pacientes distintos) independientes. El índice de trans migración se calculó como el número de células que migraron en la condición experimental dividido por las el número de células que migraron en el control negativo que corresponde a medio de cultivo solo.

4.6 Cepas animales usadas en ensayos de migración *in vivo*

En los experimentos de migración *in vivo* de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados se utilizaron ratones de la cepa silvestre C57/BL6J obtenida desde el Bioterio de Alta seguridad (BAS) dependiente del Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) ubicado en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.7 Purificación de anticuerpo anti NK1.1 desde líquido ascítico

Con el objetivo de purificar el anticuerpo anti-NK1.1, gentilmente donado por María Inés Becker (Biosonda), necesario para la depleción de células NK en ratones C57BL/6J, desde líquido ascítico, se montó una columna de proteína A, para lo cual, se resuspendieron 200mg de proteína A sefarosa en 50ml de agua, se dejó decantar y se lavó dos veces con PBS 1X. A continuación se cargó la resina en la columna y se equilibró con 40ml de PBS 1X. Luego se hizo pasar el líquido ascítico por la columna y se lavó con PBS 1X pasando 10 volúmenes de columna (10ml aproximadamente). El anticuerpo unido a la columna fue eluido haciendo pasar 10ml de buffer glicina (pH 2,7) en fracciones de 0,5ml las cuales fueron recogidas en tubos con 50 μ l de buffer Tris 1M de modo neutralizar la elución de solución ácida. La concentración de las fracciones eluidas fue determinada mediante Bradford y la presencia del anticuerpo en las distintas eluciones fue chequeado en un gel SDS-PAGE a una concentración del 12%.

4.8 Ensayo de migración *in vivo*

Las células dendríticas utilizadas en ensayos de migración *in vivo*, fueron previamente teñidas con el reactivo PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit (SIGMA-ALDRICH) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta tecnología de marcaje permite incorporar de manera estable un colorante fluorescente verde con largas colas alifáticas (PKH67) en las regiones lipídicas de la membrana celular y se usa en estudios de tráfico celular *in*

vitro e *in vivo*. En el ensayo de migración de las diferentes DCs en modelo murino, se usaron ratones C57/BL6J los cuales fueron previamente depletados de células NK usando para ello el anticuerpo anti-NK1.1 purificado desde líquido ascítico. Se le administraron intraperitonealmente dos dosis de anticuerpo (200µg) espaciadas por 24 horas, 48 horas antes de la inyección de DCs. Finalmente, se les administraron mediante inyección sublingual submucosa con jeringa de tuberculina de 31G ($2-4 \times 10^6$ células en 50µl de medio) de los distintos tipos de DCs (AM, TAPCells, TAPCells + IFN- α) o medio AIM-V (50µl, control negativo) bajo condiciones de anestesia. La anestesia consistió en una combinación de ketamina y xilacina. El efecto demora aproximadamente 5 minutos y proporciona aproximadamente 20 minutos de trabajo invasivo. La recuperación completa se logra aproximadamente después de 1 a 1,5 horas de inyectado. La dosis de ketamina es de 100 mg/Kg = 1 mg/10g; y la de xilacina, 10 mg/Kg = 0,1 mg/10g; de esta solución, se deben inyectar 100µl por cada 10g de peso del animal. Luego de 24 horas, los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂ y sus nodos linfáticos cervicales fueron extraídos y macerados en "cells strainers". La suspensión celular obtenida fue analizada mediante citometría de flujo en citómetro ATTUNE (Applied Biosystems^{TR}) de modo de detectar la presencia de células positivas para PKH67+ las cuales fluorescen en FL-1. Todos los ensayos en animales de experimentación fueron aprobados por el Comité de Bioética para experimentación en animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

4.9 Inmunohistoquímica

Como modo alternativo para medir la migración de DCs hacia nodos linfáticos se realizó inmunohistoquímica a cortes de dichos tejidos para las tres condiciones estudiadas. Para ello, los nodos linfáticos de ratones inyectados con los diferentes tipos de células dendríticas, esto es, TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados (4×10^6 células) usando el mismo protocolo anterior (un ratón por condición), fueron extraídos 24 horas después de la inyección y se fijaron en formalina. Posteriormente fueron embebidos en parafina y los tacos obtenidos fueron cortados en secciones de 3-µm mediante micrótopo. Dichos cortes fueron incubados con anticuerpo de conejo anti-

marcador mitocondrial humano (US Biological) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones inmunes se detectaron con un anticuerpo secundario conjugado biotinilado hecho en cabra. Para el control positivo del ensayo se utilizaron muestras de amígdalas humanas, mientras que el control negativo correspondió a cortes de tejido de nodos de un ratón sin inmunizar, esto es, inyectado con medio solo.

4.10 Análisis estadístico.

Para comparar la significancia entre las diferencias de los grupos estudiados se usó el análisis de varianza (ANOVA) y el test de Tukey para variables no paramétricas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$. El análisis de la relación entre las variables se realizó con el software Graph Pad Prism 5.

5. RESULTADOS

5.1 Evaluación fenotípica de TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM

El lisado tumoral TRIMEL induce la maduración de AM hacia células dendríticas con fenotipo inmunocompetente y con capacidad migratoria

Como primer objetivo de este estudio, se evaluó fenotípica y morfológicamente los distintos tipos de APCs. Para ello se observaron microscópicamente monocitos activados, TAPCells, TAPCells + IFN- α a las 48 horas desde que fue sembrado el PBMC y a la vez se determinó mediante citometría de flujo, la expresión de marcadores de maduración de células dendríticas, entre ellos, MHC-II, CD80, CD83, CD86 así como también el receptor de quimioquina de interés en este estudio, responsable de la migración de células dendríticas hacia nodos linfáticos, CCR7 y que se sabe es regulado positivamente durante el proceso de maduración. Al observar morfológicamente mediante microscopía invertida los distintos tipos de APCs fue posible notar que TAPCells y TAPCells + IFN- α presentaban una estructura ramificada y con prolongaciones similares a dendritas como su nombre lo indica, en cambio, los monocitos activados que corresponden a células dendríticas inmaduras presentaban morfología más bien redonda y uniforme (ver figura 7).

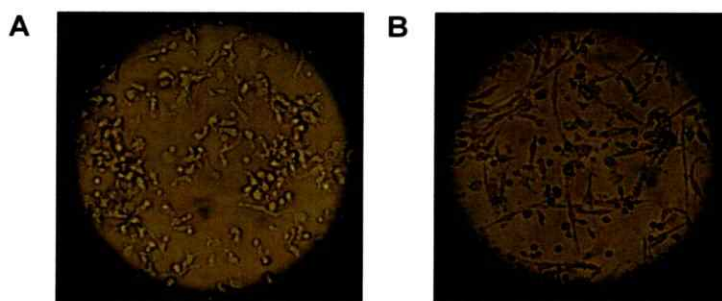


Figura 7. Fotografías representativas de la morfología de DCs vistas al microscopio luego de 48 horas de cultivo. A Monocitos activados. La mayoría presentan una estructura redonda, algunos de ellos presentan prolongaciones. **B** TAPCells presentan una estructura irregular y altamente ramificada. Aumento 20x.

Se determinó el porcentaje de células dobles positivas, esto es, para CD11c como para el marcador de interés, MHC-II, CD80, CD86, CD83 o CCR7 y su intensidad media de fluorescencia (MFI). En la figura 8 se muestran los *density plots* de un análisis representativo de al menos 6 experimentos independientes.

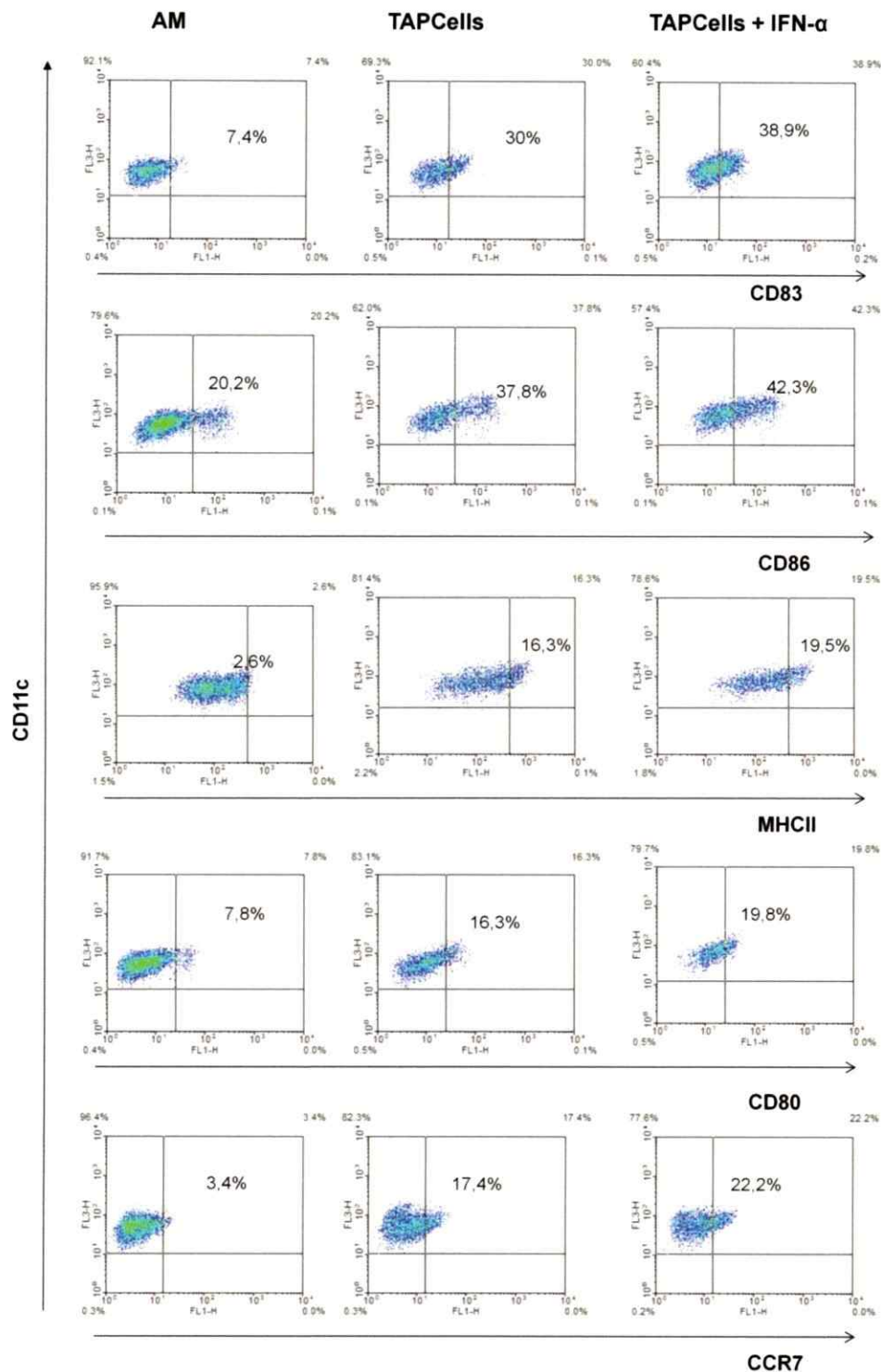


Figura 8. Density plots representativos de al menos 6 análisis de fenotipificación independientes. Se puede observar el desplazamiento de la nube en FL-1 cuando se compara la condición AM con TAPCells y TAPCells + IFN- α .

Como se observa en la figura 9, con el estímulo TRIMEL (TAPCells y TAPCells + IFN- α), la expresión de todos los marcadores de superficie anteriormente mencionados aumenta significativamente, en algunos casos hasta 3 veces, con respecto a monocitos activados.

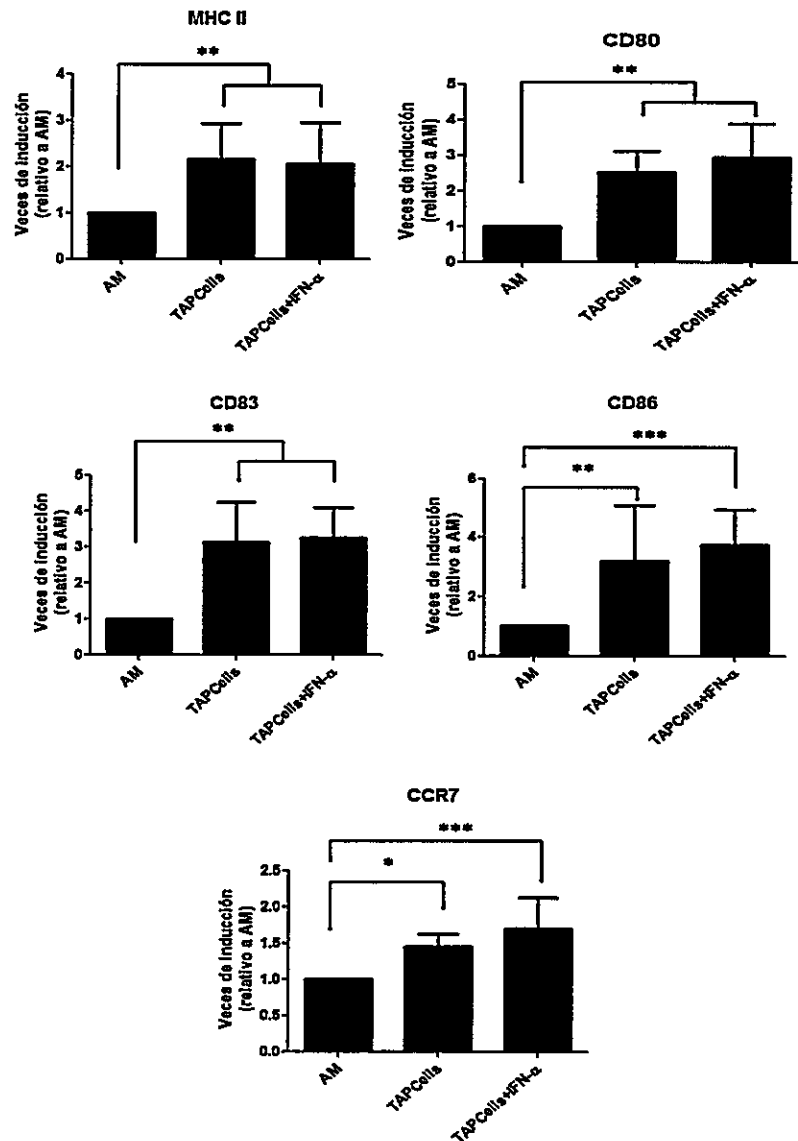


Figura 9. El TRIMEL induce un fenotipo de DC madura en TAPCells y TAPCells + IFN- α . Se analizó mediante citometría de flujo, la expresión de los marcadores de superficies en las APCs tratadas bajo diferentes condiciones. En todos los experimentos se analizaron sólo las células CD11c⁺. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la expresión de todos ellos al comparar AM con TAPCells y TAPCells + IFN- α . Pero no en el caso de TAPCells versus TAPCells + IFN- α . Los gráficos fueron realizados con los análisis de células hechas a partir de PBMC de 6 pacientes distintos usando la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la población de interés y se muestran normalizados respecto a AM. n=6; * p<0,05; **p<0,001; ***p<0,0001.

5.2 Evaluación de la capacidad migratoria de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados en respuesta a CCL19 en ensayos de quimiotaxis *in vitro*

Células presentadoras de antígenos maduras con TRIMEL (TAPCells, TAPCells + IFN- α) son capaces de migrar in vitro en respuesta a CCL19

Una vez fenotipificados los distintos tipos de células dendríticas, lo siguiente, fue determinar su capacidad de trans migración en respuesta a la quimioquina de *homing* a linfonodos que se une al receptor CCR7 expresado por las células dendríticas maduras, CCL19. Para esto se uso una cámara de *Transwell* de 48 pocillos (ver materiales y métodos). En este experimento se obtuvo que los tres tipos de APCs previamente fenotipificados (TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados) son capaces de migrar hacia CCL19 *in vitro*. Sin embargo en aquellas maduras con TRIMEL, es decir, TAPCells y + TAPCells + IFN- α versus monocitos activados, el índice de trans migración obtenido fue significativamente más alto (2,1 para TAPCells y + TAPCells + IFN- α y 1,2 para monocitos activados; $p < 0,05$). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el objetivo 1 en el sentido de que monocitos activados, al ser células dendríticas inmaduras, expresan significativamente menos CCR7 que TAPCells y TAPCells + IFN- α por lo cual es de esperarse que migren en menor medida que su contraparte madura. De este resultado podemos concluir que la inducción del receptor de quimioquina CCR7 inducida por TRIMEL, es también funcional, dado que les permite sentir el ligando de este receptor, en este caso CCL19 y migrar en respuesta a él mediante quimiotaxis. En cuanto a la trans migración de TAPCells y TAPCells + IFN- α en respuesta a CCL19, no se encontraron diferencias significativas, lo cual se correlaciona con la expresión de CCR7 determinada mediante citometría de flujo en la cual tampoco se vieron diferencias de expresión (Figura 10C).

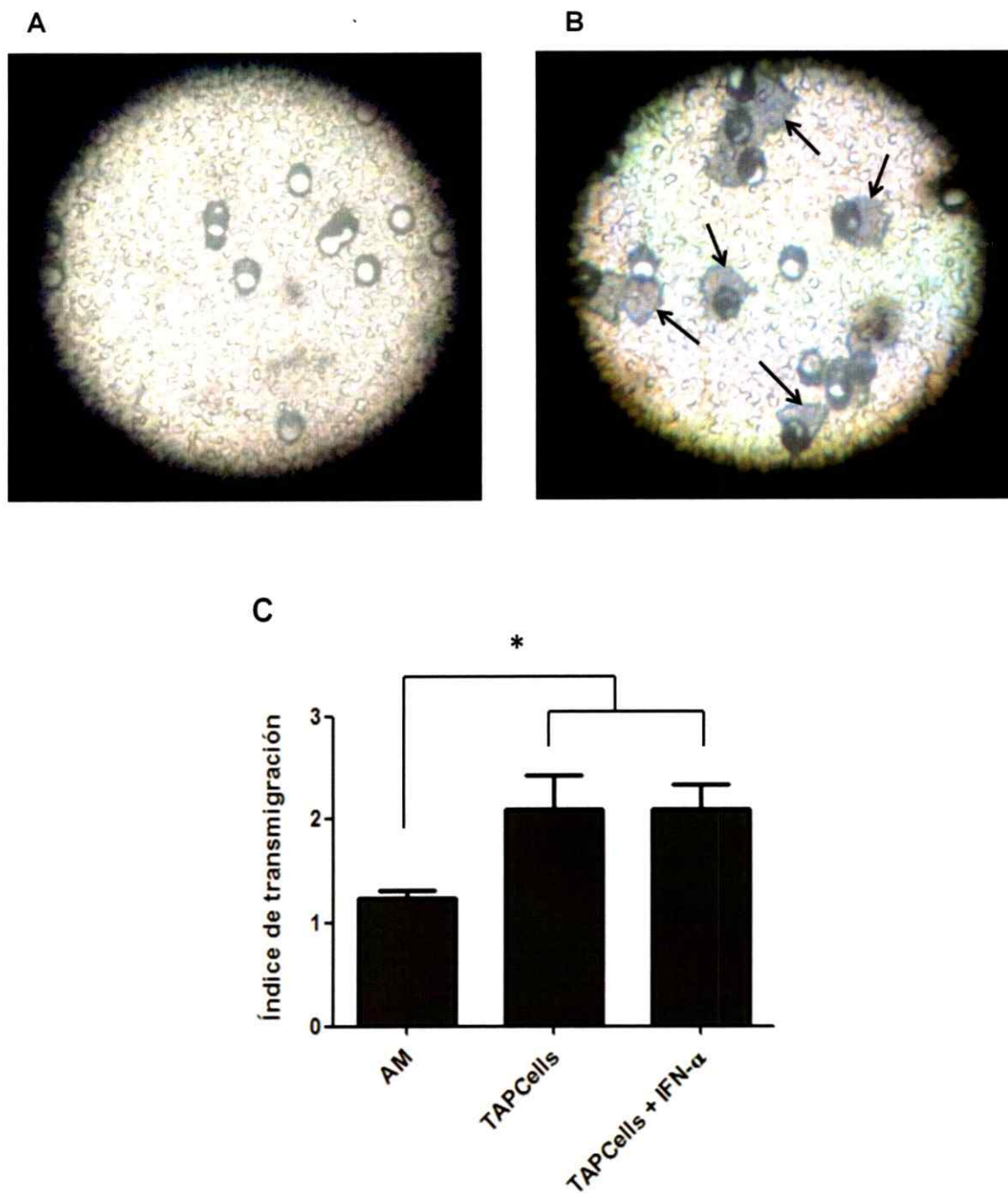


Figura 10. Ensayo de trans migración *in vitro* en cámara de Transwell. A Campo representativo de una condición control sin trans migración. **B** Campo representativo de una condición experimental donde hubo trans migración. **C** Índice de trans migración obtenido con el promedio de 15 campos contados por condición. La concentración usada de quimioquina fue de 50ng/ml. Tanto TAPCells, TAPCells + IFN- α como monocitos activados son capaces de migrar en respuesta a CCL19, siendo las dos primeras las más potentes. n=3; *p <0,05.

5.3 Evaluación de la capacidad migratoria *in vivo* de TAPCells, TAPCells + IFN- α y monocitos activados hacia nodos linfáticos en el modelo C57/BL6J

TAPCells y TAPCells + IFN- α son capaces de migrar desde el sitio de la inyección hacia nodos linfáticos proximales en un modelo de xenotransplante ectópico en ratones silvestres C57/BL6J

5.3.1 Estandarización del colorante PKH67

Para realizar el ensayo de migración *in vivo*, se utilizó un protocolo de tinción con el reactivo PKH67 de las distintas APCs de modo de poder evaluar su tráfico *in vivo*. Razón por la cual, fue necesario determinar la concentración de colorante apropiada para teñir las células a inyectar. Para esta estandarización, se tiñeron dos tipos de APCs (monocitos activados y TAPCells) con de PKH67 a concentraciones crecientes. Paralelamente, se determinó la viabilidad de las células una vez aplicado el colorante. El resultado se muestra en la tabla I. Como se puede apreciar, la viabilidad celular no se ve mayormente afectada con el colorante en las concentraciones utilizadas por lo cual es adecuado para el uso en ensayos de migración *in vivo*.

Tabla 1. Estandarización y toxicidad de PKH67. Intensidad media de fluorescencia (MFI) y porcentaje de células vivas en el protocolo de tinción a diferentes concentraciones del reactivo PKH67.

TAPCells			Monocitos Activados		
PKH67 (μ M)	MFI	%células vivas	PKH67 (μ M)	MFI	%células vivas
0	2,97	71,18	0	1,92	88,5
5	440,14	84	5	2423,22	84
7,5	1095,39	80,5	7,5	2574,68	80,5
10	2443	81,6	10	4320,26	81,6

Como se aprecia en la figura 11, con una concentración de $5\mu\text{M}$ se observa un desplazamiento de la curva de fluorescencia con respecto a la condición sin teñir, y este se hace aún más marcado a una concentración de $7,5\mu\text{M}$, por esta razón se decidió utilizar esta última para teñir las células de interés. En las dos condiciones estudiadas (TAPCells y monocitos activados) el comportamiento fue similar.

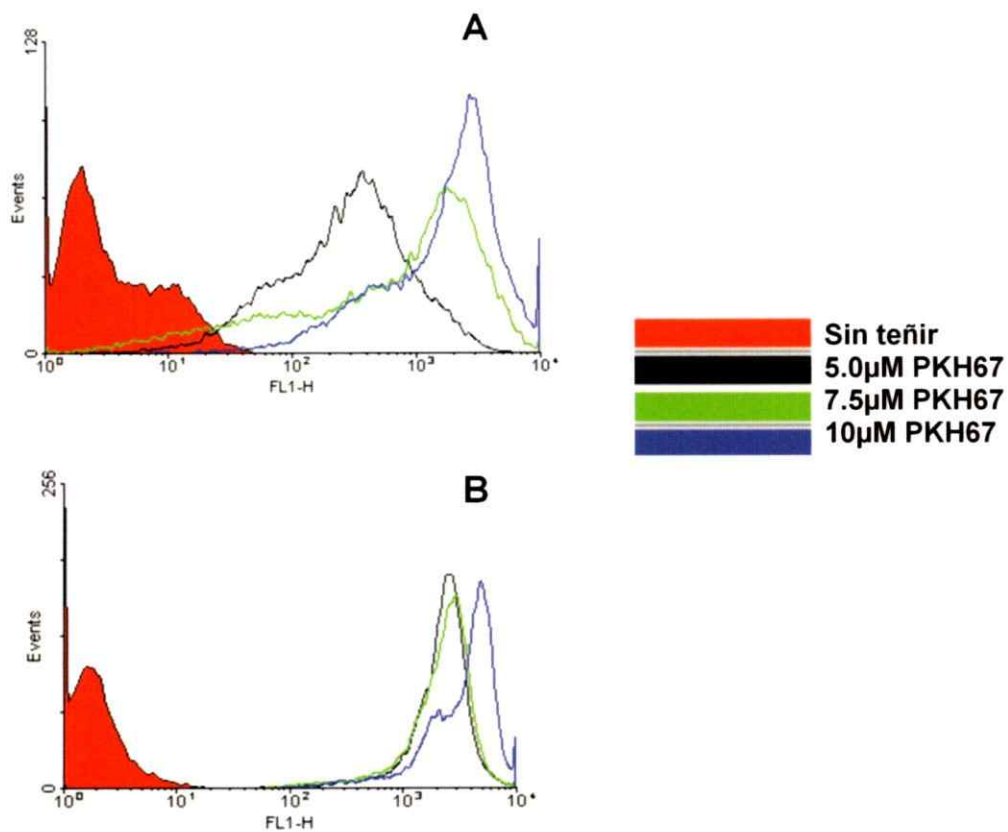


Figura 11. Estandarización de la concentración de PKH67. Histogramas superpuestos muestran la fluorescencia de las células en FL-1 determinada mediante citometría de flujo luego de ser teñidas con distintas concentraciones del colorante PKH67; 5, 7,5 y $10\mu\text{M}$. **A.** Monocitos activados. **B.** TAPCells. La concentración elegida para realizar los ensayos de migración *in vivo* fue de $7,5\mu\text{M}$.

5.3.2 Purificación de anticuerpo anti NK1.1 desde líquido ascítico

Para la purificación del anticuerpo necesario para la depleción de la población de células NK desde líquido ascítico, se utilizó la técnica de separación por afinidad, para lo cual se emplearon columnas de Proteína Sefarosa A, esta proteína de origen bacteriano que forma parte estructural de la pared de *Streptococcus* y se une con gran afinidad a la región constante (Fc) de las inmunoglobulinas, especialmente aquellas de clase IgG. Las diferentes eluciones obtenidas de la purificación, fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 12% de modo de poder detectar las bandas correspondientes a las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo de interés y paralelamente se determinó la concentración proteica de estas eluciones con el método de Bradford. En la figura 12 se muestra el gel y las bandas de 55 y 25kDa, correspondientes a las cadenas pesadas y livianas respectivamente. Paralelamente, se determinaron las concentraciones de las eluciones obtenidas, mediante el método de Bradford.

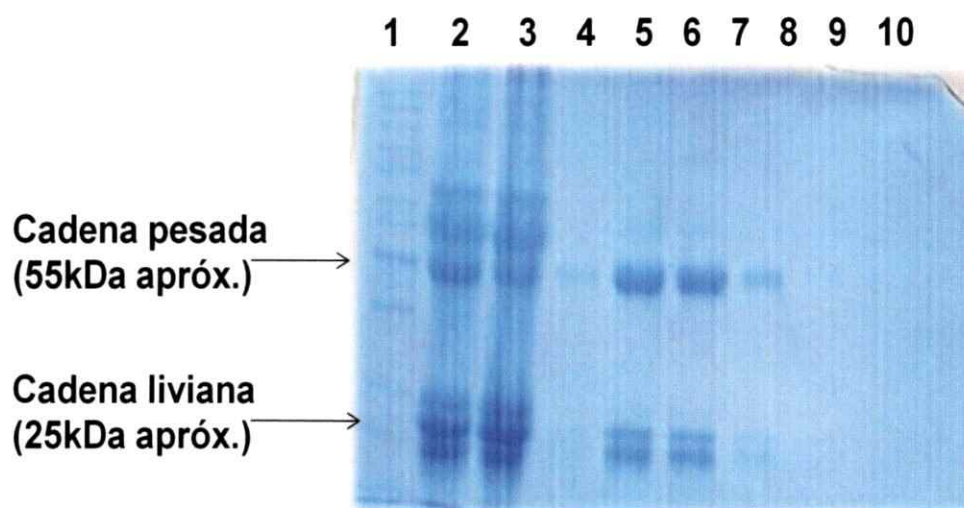


Figura 12. Gel de electroforesis de las fracciones eluidas. 1 ladder (8 μ l); 2 líquido ascítico; 3 líquido ascítico pasado por columna; 4 elución 1; 5 elución 2; 6 elución 3; 7 elución 4; 8 elución 5; 9 elución 6; 10 elución 7 (se cargaron 2 μ l de muestra y 1 μ l de buffer de carga 3X para todas las condiciones, el gel al 12% se corrió a 100volts durante 2 horas aproximadamente)

5.3.3 Depleción de células NK a ratones C57/BL6J

Dado que la inyección ectópica de APCs humanos en ratones C57/BL6J constituye un xenotransplante, fue necesario eliminar aquellas células de la inmunidad innata murina que eventualmente iban a generar rechazo contra las células inyectadas. Dentro de estas, aquellas que actúan en primera instancia al no reconocer las moléculas de histocompatibilidad del huésped, son las *natural killer*. Por esta razón, se utilizó un protocolo de depleción de células NK murinas usando para ello el anticuerpo monoclonal anti NK1.1 (4,7mg/mL), ampliamente utilizado en otros trabajos similares. En la figura 13 se muestra que con una dosis de este anticuerpo (200µg/200µl de PBS) se logra disminuir la población NK desde un 7,8% a un 5,3%. Mientras que con dos dosis la disminución es aún más drástica llegando incluso a un 1,2%. De lo cual se desprende que el anticuerpo usado es altamente eficiente en sacar de la circulación gran parte de la población NK. En el protocolo de migración *in vivo* se inyectaron intraperitonealmente dos dosis de anticuerpo, 48 y 24 horas antes de la inmunización con APCs.

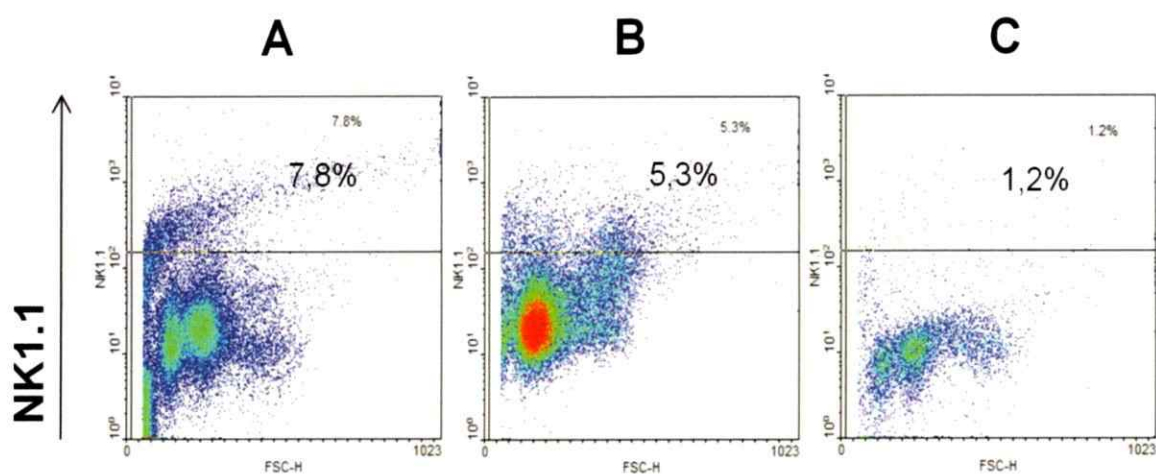


Figura 13. Depleción de células NK mediante anticuerpo anti-NK1.1. Gráficos representativos de cada condición donde se muestra el porcentaje de células NK en sangre periférica de ratón. **A** Condición control (ratón inyectado con PBS 1X) donde el porcentaje de células NK es de 7,8%. **B** Inyección de una dosis de anticuerpo (200µg) donde el porcentaje de células NK es 5,3%. **C** Inyección de dos dosis de anticuerpo (400µg) donde el porcentaje de células NK corresponde a 1,2%.

5.3.4 Ensayo de migración *in vivo* en ratones C57/BL6J

Una vez comprobada la habilidad migratoria de TAPCells y TAPCells + IFN- α *in vitro*, se realizó un ensayo de migración *in vivo* usando para ello el modelo de ratón C57/BL6J. El objetivo de este experimento, era evidenciar en modelo murino un hecho que se presume ocurre en la inmunoterapia con pacientes, esto es, la migración de TAPCells desde el sitio de inoculación hacia los nodos linfáticos proximales. Para ello, se evaluó la presencia de células PKH67+ en nodos linfáticos de ratones inyectados con aproximadamente 3 millones de TAPCells, TAPCells + IFN- α o monocitos activados en la mucosa sublingual (figura 14A). Un *dot plot* control de una población de APCs teñidas con PKH67 previo a la inyección se muestra en la figura 14B. Para evitar el rechazo de las células dendríticas humanas, se eliminaron las células NK murinas mediante depleción con Ab anti-NK1.1 48 y 24 horas antes (primera y segunda dosis respectivamente) de la inmunización con dendríticas.

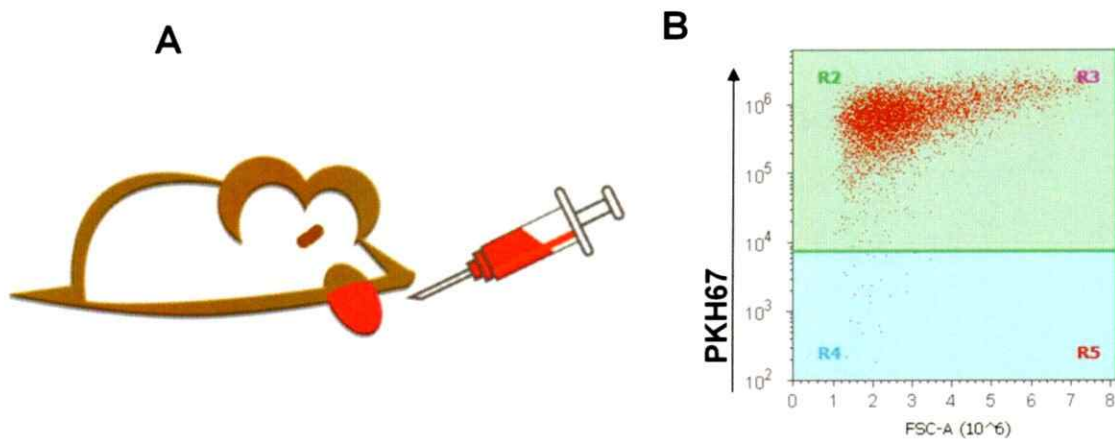


Figura 14. Ensayo de migración *in vivo* en ratones depletados de células NK. A Indica el procedimiento de inyección ectópica de las distintas APCs (4×10^6 células/ $50 \mu\text{l}$) en la mucosa sublingual para el posterior análisis de los nodos cervicales mediante citometría de flujo e IHQ. B Se muestra un *dot plot* de las APCs teñidas con PKH67 previo a su inyección como referencia.

En la figura 15 se muestran *dot plots* representativos de cada condición experimental: monocitos activados, TAPCells y TAPCells + IFN- α , así como también el control negativo que corresponde a nodos linfáticos de ratones que fueron inyectados con medio solo. Como era de esperarse en el control negativo no se detectó la presencia de células positivas para PKH67+, las que si aparecieron en los dot plots correspondientes a monocitos activados, TAPCells y TAPCells + IFN- α 24 horas después de la inoculación. En la figura 16 se muestra la cuantificación de las células PKH67+ obtenidas al inyectar los 3 condiciones tipos de APC (3 ratones por tipo de APC). Para monocitos activados el número promedio de células humanas encontradas fue 29, mientras que para TAPCells y TAPCells + IFN- α fue de 71 y 93, o puesto en porcentaje, 0,62; 1,3 y 1,69 para AM, TAPCells y TAPCells + IFN- α respectivamente. De este resultado se desprende que si bien los tres tipos de APCs son capaces de migrar hacia nodos linfáticos, el número de células encontradas en ratones tratados con TAPCells + IFN- α es mayor que el hallado en ratones tratados con TAPCells y a su vez este número es superior que el encontrado en ratones inyectados con AM. Es decir, se observa una tendencia migratoria mayor en las células maduras con TRIMEL que en los monocitos activados. Sin embargo, estas diferencias no son significativas desde el punto de vista estadístico. Paralelamente se evaluó la presencia de células PKH67+ en las lenguas de los ratones tratados. Con respecto a esto, se obtuvo que la cantidad de células PKH67+ encontradas en lenguas de ratones tratados con TAPCells era significativamente menor que en aquellas de los ratones tratados con monocitos activados. Lo cual se relaciona directamente con lo obtenido a partir de los nodos linfáticos (datos no mostrados). El resultado de este experimento, sugiere que las células dendríticas inmaduras cargadas y maduras con TRIMEL (TAPCells) y utilizadas en inmunoterapia contra melanoma maligno son capaces de migrar *in vivo* en un período de 24 horas desde el sitio de inflamación hacia los nodos linfáticos más cercanos y el incluir IFN- α como estímulo de maduración adicional, no tiene un impacto en la capacidad migratoria de las mismas, lo cual se correlaciona con lo obtenido en los dos objetivos anteriormente descritos, donde se muestra por una parte que tanto

TAPCells como TAPCells + IFN- α expresan altos niveles de CCR7 y que *in vitro* responden de forma similar a CCL19 por otra.

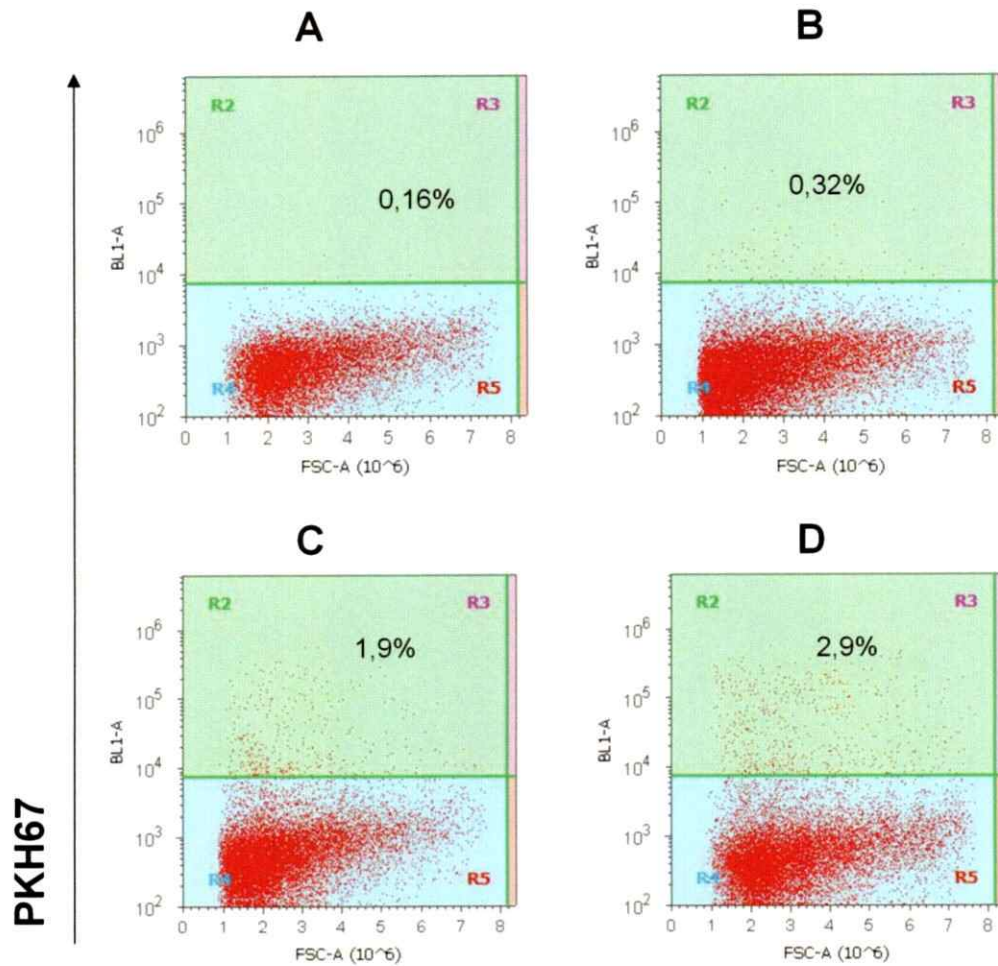


Figura 15. Dots plots representativos de nodos linfáticos extraídos de ratones C57/BL6J 24 horas después de la inyección ectópica de las distintas APCs. A Condición control ratón inyectado con medio solo (AIM-V). **B** Condición monocitos activados. **C** Condición TAPCells. **D** Condición TAPCells + IFN- α .

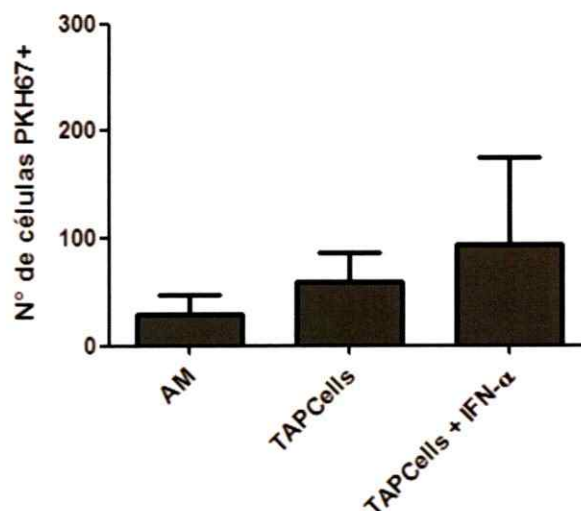


Figura 16. Migración de APCs *in vivo* en ratones C57/BL6J depletados de NK. Se muestra el número de células positivas para el colorante PKH67 en nodos linfáticos 24 horas después de la inmunización con células dendríticas. n=3.

Adicionalmente, para confirmar que TAPCells y TAPCells + IFN- α tiene capacidad de *homing* a nodos linfáticos, usando el mismo protocolo anteriormente descrito, se inyectaron los tres tipos de APCs en 3 ratones distintos (uno por condición) Luego de 24 horas se les extrajeron los nodos linfáticos cervicales y se hizo una tinción inmunohistoquímica de los mismos para detectar la presencia de células humanas con un anticuerpo monoclonal marcador de mitocondria humano. El resultado obtenido de dicha IHQ se muestra en la figura 17 donde si bien se observa la presencia de células marcadas en los nodos de aquellos ratones tratados con TAPCells y TAPCells + IFN- α y monocitos activados, en las dos primeras el marcaje es mucho más evidente que en el caso de monocitos activados, mientras que en el control negativo (nodo de ratón inyectado con medio solo) no se detectaron células humanas, como control positivo se usaron amígdalas humanas en las cuales se ven claramente el marcaje de células humanas. A partir de este resultado se deduce que los tres tipos de APCs tienen capacidad migratoria hacia nodos linfáticos.

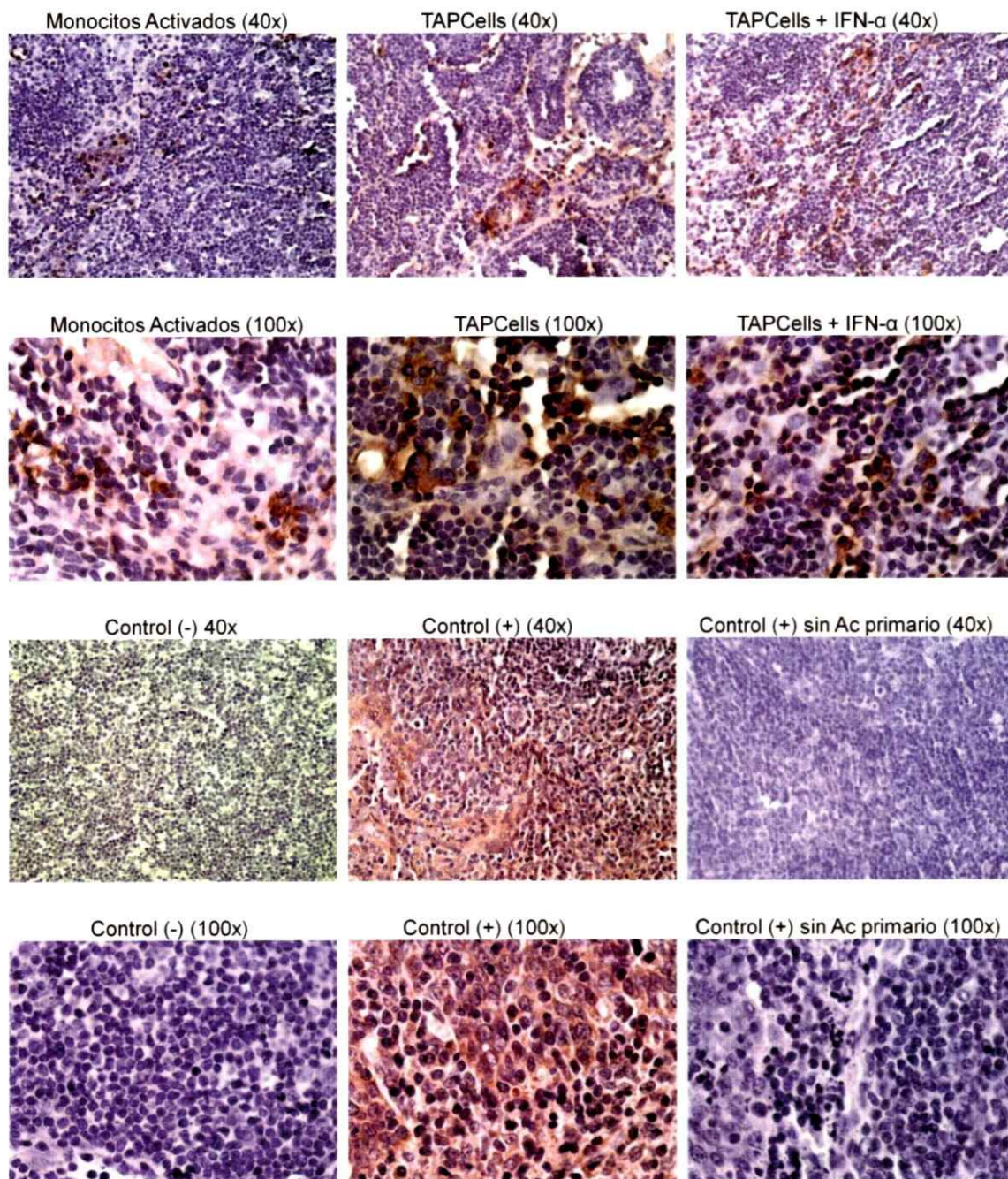


Figura 17. Presencia de células dendríticas humanas en nódulos linfáticos de ratones C57 inyectados con AM, TAPCells o TAPCells + IFN- α . Nodos linfáticos cervicales de ratones C57 tratados con las distintas APCs ($4 \cdot 10^6$ células) fueron procesados para IHQ usando un anticuerpo anti-mitocondria humana. Se detectaron células humanas en cortes de linfonodos de animales inyectados con células AM, TAPCells y TAPCells + IFN- α . Como control negativo se usó el nodo linfático de un ratón inyectado solo con medio. Mientras que el control positivo corresponde a cortes de amígdalas humanas.

6. DISCUSIÓN

Hoy en día la inmunoterapia tiene un rol importante en el tratamiento de diversos tipos de cáncer, especialmente aquellos que se encuentran en una etapa avanzada. Dentro del repertorio de posibilidades inmunoterapéuticas, se ha demostrado que las basadas en células dendríticas tiene efectos significativos en la sobrevida y calidad de vida de los pacientes (López y col, 2009). Como es sabido, durante el desarrollo de la respuesta inmune, ya sea contra infección o tejido neoplásico, una de las etapas fundamentales es la migración de las células dendríticas cargadas con antígenos, hacia los nodos linfáticos donde ocurre la presentación antigénica a células T que en último término son las encargadas de eliminar a las células infectadas o dañadas.

El proceso de migración es dependiente de la comunicación entre los diferentes tipos celulares mediada por proteínas específicas llamadas quimioquinas. En su proceso de maduración, las DCs regulan positivamente la expresión del receptor de quimioquina CCR7. Cuando esto ocurre, la célula dendrítica, es capaz responder a los ligandos de este receptor, CCL21 y CCL19, producidos por células estromales de los nodos linfáticos. En estudios de nuestro laboratorio se ha demostrado que las vacunas llamadas TAPCells, son capaces de aumentar y mejorar la sobrevida de pacientes con melanoma en etapa IV (López y col, 2009). Más aún, análisis de biopsias DTH + han revelado la presencia de células T de memoria CD8+/CD45RO+ confirmando así la habilidad de TAPCells de estimular células T *in vivo* mediante presentación cruzada (Aguilera y col, 2011), por lo cual se asume que la etapa de la respuesta anti-tumoral que involucra el *homing* de TAPCells hacia linfonodos, ocurre de manera eficiente. Sin embargo, dicha hipótesis nunca ha sido probada experimentalmente. Es por esta razón que se llevaron a cabo una serie de experimentos con el fin estudiar este proceso tanto *in vitro* como *in vivo*, y así confirmar que efectivamente estas células son capaces de migrar en respuesta a los ligandos del receptor CCR7.

Lo primero que se hizo fue determinar el efecto del lisado alogénico de células de melanoma condicionado por calor, TRIMEL, en la diferenciación de células dendríticas inmaduras (denominadas en nuestro laboratorio monocitos activados). Como

está descrito, TRIMEL fue capaz de inducir la diferenciación de monocitos activados hacia células dendríticas maduras y comprometidas en un lapso de 24 horas. Esto se demostró midiendo mediante citometría de flujo la expresión de los marcadores de superficie MHCII, CD80, CD83, CD86 y CCR7 luego de la estimulación de los monocitos activados con TRIMEL y comparándola con la obtenida sin estimulación. Se encontró que las moléculas co-estimuladoras, CD80 y CD86 y el marcador de maduración, CD83, todos marcadores clásicos de superficie de DCs maduras, estaban sobreexpresados en las TAPCells y las TAPCells + IFN- α , con respecto a monocitos activados. Al expresar CD80 y CD86, las DCs maduras, pueden activar células T vírgenes y gatillar su diferenciación a linfocitos T-citotóxicos (CTL) capaces de matar de manera antígeno-específica. Las moléculas de presentación antigénica de clase II, y el receptor de quimioquina CCR7, también fueron inducidos con la estimulación por TRIMEL. Cabe destacar que no encontramos una diferencia significativa al momento de comparar la expresión de los marcadores mencionados en TAPCells estimuladas con IFN- α con respecto a las TAPCells, ni siquiera en cuanto a la expresión de CCR7 aunque hay antecedentes en la literatura de que en protocolos de maduración donde se utiliza IFN- α , además del clásico TNF, hay una mayor expresión de CCR7 a nivel de RNA mensajero (Korthals y col, 2007).

Diversos estudios con monocitos, han demostrado que esta citoquina junto con GM-CSF es capaz de diferenciar monocitos derivados de sangre periférica en potentes APCs (Paquette y col, 1998). El uso de IFN- α como agente de diferenciación de células dendríticas está ampliamente estudiado en literatura y algunos trabajos apuntan al posible rol sobre la inducción de CCR7. Específicamente, Korthals y col (2007) estudiaron las diferencias entre DCs cultivadas con IFN- α y aquellas DCs convencionales hechas con IL-4 y TNF- α . De manera interesante, ellos encontraron que había diferencias marcadas entre las DCs IFN- α y IL-4/TNF- α en la expresión de genes relacionados con la migración y adhesión. Las DCs IL-4/TNF- α mostraron una mayor expresión de genes involucrados en la adhesión al epitelio y tejido inflamado e interacciones con células T. En contraste, DCs con IFN- α mostraron niveles de RNA más altos para el receptor de quimioquina CCR7 y la cadena integrina $\alpha 4$. A pesar de

existir estos antecedentes en la literatura, nosotros no encontramos una diferencia significativa en los niveles de expresión ni de CCR7 ni de los otros marcadores estudiados (CD80, CD86, CD83) entre TAPCells tratadas con TRIMEL y TNF- α (TAPCells) y aquellas tratadas además con IFN- α (TAPCells + IFN- α). Posiblemente porque no es comparable el estímulo de maduración TRIMEL con otras citoquinas como TNF- α , en el sentido de que TRIMEL es mucho más potente, no solo actúa como fuente de antígenos sino que por sí solo es capaz de inducir la maduración de monocitos activados. Al parecer, el efecto de TRIMEL sobrepasa aquel ejercido por IFN- α y por ello no se observan diferencias fenotípicas significativas entre TAPCells + IFN- α y TAPCells.

La capacidad de TRIMEL de inducir la maduración de las TAPCells, está relacionado con el hecho previamente demostrado en nuestro laboratorio de que el tratamiento de las células tumorales con *heat shock*, es capaz de inducir señales de peligro (DAMPs), tales como la translocación de calreticulina a la membrana y la secreción de la proteína HMGB1, las cuales son reconocidas por receptores del tipo PRR (PAMPs recognition receptors) presentes en las células dendríticas y proveen señales de activación que gatillan la rápida diferenciación de monocitos a DCs maduras, por lo cual TRIMEL actúa al mismo tiempo fuente de antígenos tumorales y como estímulo de maduración (Aguilera y col, 2011). Sin embargo, son las células tumorales y no otras las responsables de la inducción de estos marcadores de expresión, ya que el tratamiento de células dendríticas inmaduras con PBL condicionado con *heat-shock* no gatilla tal inducción. Más aún, TRIMEL es capaz de activar señales de transducción asociadas a cambios fenotípicos en las APCs. Específicamente induce una mayor fosforilación del factor de transcripción NF κ B que el factor de maduración más ampliamente usado, LPS. Adicionalmente, TRIMEL y TNF- α , inducen la degradación de I κ B α (Aguilera y cols, 2011). Más aún, TRIMEL tiene la capacidad de activar los receptores necesarios (PRRs) y en la combinación específica, por lo que el estímulo de IFN- α no hace una diferencia significativa.

En la literatura está bien documentado que los PRRs pueden iniciar eventos de señalización específicos que modulan la producción de citoquinas inflamatorias,

fagocitosis, la asignación de la ruta antigénica intracelular, la liberación de especies oxidativas, la maduración de células dendríticas y el desarrollo subsecuente de inmunidad adaptativa. Entre los PRRs los mejor caracterizados son los Toll-like receptors (TLRs), que principalmente reconocen estructuras bacterianas, pero que además pueden unirse a una variedad de proteínas propias como lo son las de *heat shock*, presentes en el TRIMEL. La señalización por TLRs regula la activación de diferentes factores de transcripción como el ya mencionado NFκB, lo que resulta en un aumento en las respuestas de citoquinas inflamatorias, inducción de la maduración de DCs y del receptor de quimioquina CCR7. Esto indica que de manera particular, la activación de TLRs en DCs es capaz de cambiar su fenotipo de DC inmadura a uno activador capaz de inducir respuestas inmunes adaptativas, estimulando tanto células T CD8+ como CD4+ de manera antígeno específica (Van Vliet y col, 2007).

Una vez caracterizadas TAPCells y TAPCells + IFN-α, lo siguiente fue determinar la capacidad migratoria de las mismas. Dado que las TAPCells y TAPCells + IFN-α expresan mayor cantidad del receptor de quimioquinas CCR7 que monocitos activados, era esperable que su capacidad de migrar en respuesta a los ligandos de CCR7, esto es, CCL19 y CCL21, fuera mayor. Esto fue confirmado en ensayos de trans migración *in vitro* donde se vio que TAPCells y TAPCells + IFN-α migran significativamente más que monocitos activados en respuesta a la quimioquina CCL19 humana. Sin embargo, nuevamente no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la migración entre las TAPCells y las TAPCells + IFN-α. Este hecho puede explicarse por lo anteriormente discutido de que la expresión de CCR7 en estos dos tipos de APC no es lo significativamente distinta como para traducirse en diferencias migratorias en respuesta a CCL-19 en ensayos *in vitro*.

Por otra parte, es bien sabido que la migración eficaz de las DCs a los órganos linfoides secundarios es esencial para que ellas estimulen respuestas inmunes. Por lo cual, la habilidad de las vacunas basadas en DCs de inducir la migración eficiente es crítica para su éxito. Más aún, el discreto éxito de las vacunas de DCs puede ser en parte atribuido a una migración menos que óptima de las mismas. Un estudio reciente usando DCs derivadas de monocitos marcadas con ¹¹¹Indio y cargadas con péptidos de

melanoma, administrados intra-dermalmente, demuestra que un gran número de DCs inyectadas tienden a permanecer en el sitio de la infección, pierden viabilidad y son eliminadas dentro de 48 horas. Más aún, menos del 5% de las DCs usadas como vacunas alcanzaron los nodos linfáticos drenantes (Verdijk y col, 2009). Es por estas razones que era de importancia evaluar la capacidad de migración *in vivo* de las DCs usadas en inmunoterapia en modelo murino y así, extrapolar a lo que eventualmente ocurre en los pacientes a los cuales se les aplica la inmunoterapia. De este experimento, se obtuvo que si bien los tres tipos de APCs, TAPCells, TAPCells + IFN- α y AM son capaces de migrar desde la mucosa sublingual hacia los nodo linfáticos secundarios, lo que se deduce de la presencia de células fluorescentes en FL1 en los tres casos (y que no se observan en el control sin inyectar), el número de células PKH67+ encontradas en los nodos linfáticos de ratones que fueron vacunados con TAPCells y TAPCells + IFN- α no fue significativamente mayor que aquel que se obtuvo de ratones inyectados con monocitos activados. Dado que los monocitos activados son células dendríticas inmaduras, y CCR7 es un marcador que se regula positivamente durante la maduración, se esperaba que la migración fuese significativamente menor que la obtenida con TAPCells y TAPCells + IFN- α (similar a lo que ocurre *in vitro*).

Una posible explicación para el resultado obtenido tiene que ver con el hecho de que la inyección misma de las APCs en la mucosa sublingual, constituye una injuria que potencialmente puede generar un ambiente de tipo inflamatorio el cual puede inducir la maduración de monocitos activados una vez inyectados en la lengua murina y en el lapso de 24 horas que transcurren desde la inoculación hasta el término del experimento, lo cual a su vez llevaría a un aumento en la expresión de CCR7 y les permitiría migrar a los nodos linfáticos cervicales al igual que su contraparte madura TAPCells y TAPCells + IFN- α , como se demuestra en tinción inmunohistoquímica y en la citometría de flujo realizada para detectar células dendríticas en los nodos linfáticos de ratones tratados con distintas APCs y eso explicaría el por qué sí observamos diferencias en la capacidad migratoria entre APCs maduras con TRIMEL y monocitos activados en ensayos de transmigración *in vitro*. Este resultado además, pone en evidencia la capacidad de CCR7 humano de responder a las quimioquinas CCL19 y CCL21 murinas, lo cual se explica

por el alto grado de homología de secuencias humana y murina tanto del receptor como de sus ligandos. En base a lo anteriormente descrito, queda confirmada la hipótesis originalmente planteada y queda demostrada la capacidad de migración de TAPCells utilizadas actualmente en inmunoterapia contra melanoma maligno, dando apoyo a aquellos antecedentes que validan su uso como células presentadoras de antígenos en pacientes con melanoma maligno.

7. CONCLUSIONES

- 1) El lisado tumoral TRIMEL induce un fenotipo maduro en células dendríticas, presentando un aumento significativo de la expresión de los marcadores de maduración y moléculas coestimuladoras.
- 2) El lisado tumoral TRIMEL induce un aumento significativo de la expresión del receptor de *homing* a linfonodos CCR7 en DCs maduras respecto a monocitos activados.
- 3) Células dendríticas maduras con TRIMEL (TAPCells y TAPCells + IFN- α) son capaces de migrar en respuesta al ligando de CCR7, CCL19 en ensayos de trans migración *in vitro*.
- 4) Células dendríticas humanas maduras con TRIMEL (TAPCells y TAPCells + IFN- α) son capaces de migrar a nodos linfáticos *in vivo* en un modelo murino C57 desde el sitio de inyección (mucosa sublingual) hacia nodos linfáticos cervicales.
- 5) Ensayos de migración *in vivo* sugieren que células dendríticas humanas y específicamente CCR7, son capaces de responder *in vivo* a sus ligandos CCL19 y CCL21 murinos

8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Aguilera R, Saffie C, et al (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clin Cancer Res* 17(8):2474-83.
- 2) Alfaro C, Suárez N, et al (2011). Carcinoma-Derived Interleukin-8 Disorients Dendritic Cell Migration Without Impairing T-Cell Stimulation. *Plos One* 6: 1-6.
- 3) Alldawi L, Takahashi M, Narita M, et al (2005). Effect of prostaglandin E2, lipopolysaccharide, IFN- γ and cytokines on the generation and function of fast-DC. *Cytotherapy* 7 (2):195–202.
- 4) Alvarez D, Vollmann E, Von Andrina U (2008). Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity. Rev* 29: 325-342.
- 5) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811.
- 6) Balch CM, Soong SJ, Gershenwald JE, et al (2001). Prognostic factors analysis of 17,600 melanoma patients: Validation of the American Joint Committee on Cancer melanoma staging system. *J Clin Oncol* 19:3622-3634.
- 7) Bianchi ME (2007). PAMPs and alarmins. All we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81:1-5.
- 8) Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, et al (2006). Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175-208.
- 9) Chen Z, Moyana T, Saxena A, et al (2001). Efficient antitumor immunity derived from maturation of dendritic cells that had phagocytosed apoptotic/necrotic tumor cells. *Int J Cancer* 94:539-548.
- 10) Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN (2007). Balancing between immunity and tolerance: an interplay between dendritic cells, regulatory T cells, and effector T cells. *J Leukoc Biol* 82 (6):1365–1374.

- 11) Czerniecki, B.J., et al. (2007). Targeting HER-2/neu in early breast cancer development using dendritic cells with staged interleukin-12 burst secretion. *Cancer Res* 67:1842–1852.
- 12) Dauer M, Obermaier B, Herten J, et al (2003). Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors. *J Immunol* 170(8):4069–4076.
- 13) De Vries IJ, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, et al (2003). Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients. *Clin Cancer Res* 9(14):5091–5100.
- 14) De Vries IJ, Krooshoop DJ, Scharenborg NM, et al (2003). Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63(1):12–17.
- 15) Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N (2001). Antigen-specific inhibition of effector T-cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193 (2):233–238.
- 16) Dhodapkar MV, Steinman RM (2002). Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8+ regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 100 (1):174–177.
- 17) Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, et al (2003). Palliative treatment of disseminated malignant melanoma: A systemic review of 41 randomised clinical trials. *Lancet Oncol* 4:748-759.
- 18) Eggermont MM (2006). Randomized trials in melanoma: An update. *Surg Oncol Clin N Am* 15:439-451.
- 19) Elgueta R, Benson MJ, De Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev* 229 (1):152–172.
- 20) Escobar A, López M, Serrano A, et al (2005). Dendritic cell immunizations alone or combined with low doses of interleukin-2 induce specific immune responses in melanoma patients. *Clin Exp Immunol* 142:555-568.

- 21) Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, et al (1998). Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: An Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 16:1743-1751.
- 22) Finn OJ, Forni G (2002). Prophylactic cancer vaccines. *Curr Opin Immunol* 14(2):172-177.
- 23) Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99: 23-33.
- 24) Gandhi RT, O'neill D, Bosch RJ, et al (2009). A randomized therapeutic vaccine trial of canarypox-HIVpulsed dendritic cells vs. Canarypox-HIV alone in HIV-1-infected patients on antiretroviral therapy. *Vaccine* 27 (43):6088-6094.
- 25) Gilboa, E DC-based cancer vaccines (2007). *J Clin Invest* 117(5):1195-1203.
- 26) Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T., and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* 189: 451-460.
- 27) Herlyn, M (1990). "Human melanoma: development and progression". *Cancer Metastasis Rev* 9:101-112.
- 28) Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, et al (2004). Phase I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 53:125-134.
- 29) Higano CS, Schellhammer PF, Small EJ, et al (2009). Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase III trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. *Cancer* 115 (16):3670-3679.

- 30) Jarnjak-Jankovic S, Hammerstad H, Saeboe-Larssen S, Kvalheim G, Gaudernack G (2007). A full scale comparative study of methods for generation of functional dendritic cells for use as cancer vaccines. *BMC Cancer* 7:119.
- 31) Jocham D, Richter A, Hoffmann L, et al (2004). Adjuvant autologous renal tumour cell vaccine and risk of tumour progression in patients with renal-cell carcinoma after radical nephrectomy: Phase III, randomised controlled trial. *Lancet* 363 (9409):594–599.
- 32) Keilholz U, Punt CJ, Gore M, et al (2005). Dacarbazine, cisplatin, and interferon-alfa-2b with or without interleukin-2 in metastatic melanoma: A randomized phase III trial (18951) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Melanoma Group. *J Clin Oncol* 23:6747-6755.
- 33) Khan MA, Andrews S, Ismail-Khan R, et al (2006). Overall and progression-free survival in metastatic melanoma: Analysis of a single-institution database. *Cancer Control* 13:211-217.
- 34) Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape (2007). *Immunology* 121(1):1–14.
- 35) Korthals M, Safaian N, Kronenwett R, et al (2007). Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J Transl Med* 5:46.
- 36) Krautwald, S., Ziegler, E., Forster, R., Ohl, L., Amann, K., and Kunzendorf, U. (2004). Ectopic expression of CCL19 impairs alloimmune response in mice. *Immunology* 112, 301-309.
- 37) Kyte JA, Kvalheim G, Lislrud K, et al (2007). T cell responses in melanoma patients after vaccination with tumor-mRNA transfected dendritic cells. *Cancer Immunol Immunother* 56:659-675.
- 38) Lee AW, Truong T, Bickham K, et al (2002). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 (Suppl. 4): A8–A22.
- 39) López M, Pereda C, Segal G (2009). Prolonged Survival of Dendritic Cell–Vaccinated Melanoma Patients Correlates With Tumor-Specific Delayed Type

- IV Hypersensitivity Response and Reduction of Tumor Growth Factor β Expressing T Cells. *Journal of Clinical Oncology* 27: 945-952.
- 40) Lubong, R and Bhardwaj, N (2010). Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment. *Immunotherapy* 1: 37–56.
- 41) Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G., and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 12694-12699.
- 42) Matzinger P (2007). Friendly and dangerous signals: Is the tissue in control? *Nat Immunol* 8:11-13.
- 43) Medina, E.; Kaempffer, A.M (2001). “Cancer mortality in Chile: epidemiological considerations”. *Rev Med Chil.* 129(10):1195-202.
- 44) Melief CJ, Van Der Burg SH (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* (5):351–360.
- 45) Mendoza-Naranjo A, Sáez PJ, Johansson CC, et al (2007). Functional gap junctions facilitate melanoma antigen transfer and cross-presentation between human dendritic cells. *J Immunol* 178:6949-6957.
- 46) Morton DL, Foshag LJ, Hoon DS, et al (1992). Prolongation of survival in metastatic melanoma after active specific immunotherapy with a new polyvalent melanoma vaccine. *Ann Surg* 216:463-482.
- 47) Nagayama H, Sato K, Morishita M, et al (2003). Results of a phase I clinical study using autologous tumor lysate-pulsed monocyte-derived mature dendritic cell vaccinations for stage IV malignant melanoma patients combined with low dose interleukin-2. *Melanoma Res* 13:521-530.
- 48) Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, et al (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-332.
- 49) O'Neill DW, Bhardwaj N (2005). Differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*. Chapter 22, Unit 22F 4.

- 50) O'Neill D, Bhardwaj N (2005). Generation of autologous peptide- and protein-pulsed dendritic cells for patient-specific immunotherapy. *Methods Mol Med* 10:9, 97–112.
- 51) O'Rourke MG, Johnson MK, Lanagan CM, et al (2007). Dendritic cell immunotherapy for stage IV melanoma. *Melanoma Res* 17:316-322.
- 52) O'Rourke MG, Johnson M, Lanagan C, et al (2003). Durable complete clinical responses in a phase I/II trial using an autologous melanoma cell/dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* 52:387-395.
- 53) Obermaier B, Dauer M, Herten J, Schad K, Endres S, Eigler A (2003). Development of a new protocol for 2-day generation of mature dendritic cells from human monocytes. *Biol Proced Online* 5:197–203.
- 54) Ohl, L., Mohaupt, M., Czeloth, N., Hintzen, G., Kiafard, Z., Zwirner, J., Blankenstein, T., Henning, G., and Forster, R. (2004). CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions. *Immunity* 21: 279-288.
- 55) Palucka AK, Ueno H, Connolly J, et al (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J Immunother* 29(5):545–557.
- 56) Paquette RL, Hsu NC, Kiertscher SM, Park AN, Tran L, Roth MD, Glaspy J. (1998). Interferon- and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J Leukoc Biol* 64: 358-367.
- 57) Quirt I, Verma S, Petrella T, et al (2007). Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: A systematic review. *Oncologist* 12:1114-1123.
- 58) Redman BG, Chang AE, Whitfield J, et al (2008). Phase Ib trial assessing autologous, tumor-pulsed dendritic cells as a vaccine administered with or without IL-2 in patients with metastatic melanoma. *J Immunother* 31(6):591–598.
- 59) Ridgway D (2003). The first 1000 dendritic cell vaccines. *Cancer Invest* 21:873-886.

- 60) Ridolfi R, Petrini M, Fiammenghi L, et al (2006). Improved overall survival in dendritic cell vaccination induced immunoreactive subgroup of advanced melanoma patients. *J Transl Med* 4:36.
- 61) Ritter, U., Wiede, F., Mielenz, D., Kiafard, Z., Zwirner, J., and Korner, H. (2004). Analysis of the CCR7 expression on murine bone marrow-derived and spleen dendritic cells. *J Leukoc Biol* 76: 472-476.
- 62) Rodriguez-Frade, J. M., Vila-Coro, A. J., Martin, A., Nieto, M., Sanchez-Madrid, F., Proudfoot, A. E., Wells, T. N., Martinez, A. C., and Mellado, M. (1999). Similarities and differences in RANTES- and (AOP)-RANTES-triggered signals: implications for chemotaxis. *J Cell Biol* 144: 755-765.
- 63) Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, et al (1998). Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321-327.
- 64) Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 28: 2760-2769.
- 65) Sanchez-Sanchez, N., Riol-Blanco, L., Rodriguez-Fernandez, J.L., 2006. The multiple personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J. Immunol.* 176: 5153–5159.
- 66) Satzger I, Schenck F, Kapp A, Gutzmer R (2006). Spontaneous regression of melanoma with distant metastases – report of a patient with brain metastases. *Eur J Dermatol* 16(4):454–455.
- 67) Sauter B, Albert ML, Francisco L, et al (2000). Consequences of cell death: Exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med* 191:423-434.
- 68) Scandella, E., Men, Y., Legler, D. F., Gillessen, S., Prikler, L., Ludewig, B., and Groettrup, M. (2004). CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 103: 1595-1601.

- 69) Schadendorf D, Ugurel S, Schuler-Thurner B, et al (2006). Dacarbazine (Dtic) versus vaccination with autologous peptide-pulsed dendritic cells (DC) in first-line treatment of patients with metastatic melanoma: a randomized Phase III trial of the DC study group of the decog. *Ann Oncol* 17 (4):563–570.
- 70) Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001). Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2(10):947–950.
- 71) Seetharamu, N.; Ott, P.A.; Pavlick, A.C (2009). “Novel therapeutics for melanoma”. *Expert Rev Anticancer Ther.* 9(6):839-49.
- 72) Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90:1–50.
- 73) Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161: 1083-1086.
- 74) Speetjens FM, Kuppen PJ, Welters MJ, et al. Induction of p53-specific immunity by a p53 synthetic long peptide vaccine in patients treated for metastatic colorectal cancer (2009). *Clin Cancer Res* 15 (3):1086–1095.
- 75) Stein, J. V., Soriano, S. F., M'Rini, C., Nombela-Arrieta, C., de Buitrago, G. G., Rodriguez-Frade, J. M., Mellado, M., Girard, J. P., and Martinez, A. C. (2003). CCR7-mediated physiological lymphocyte homing involves activation of a tyrosine kinase pathway. *Blood* 101: 38-44.
- 76) Steinman, R.M., and Banchereau, J. (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449: 419–426
- 77) Svane IM, Nikolajseny K, Walterz MR, et al (2006). Characterization of Monocyte-Derived Dendritic Cells Matured With IFN- α . *Scandinavian Journal of Immunology* 63: 217–222.

- 78) Trefzer U, Herberth G, Wohlan K, et al (2005). Tumour-dendritic hybrid cell vaccination for the treatment of patients with malignant melanoma: Immunological effects and clinical results. *Vaccine* 23:2367-2373.
- 79) Trepiaakas R, Pedersen A, Met O, et al (2009). Addition of interferon-alpha to a standard maturation cocktail induces CD38 up-regulation and increases dendritic cell function. *Vaccine* 27: 2213-2219.
- 80) Van Vliet S, Dunnen J, Gringhuis S, et al (2007). Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Current Opinion in Immunology* 19:435–440.
- 81) Verdijk P, Aarntzen EH, Lesterhuis WJ, et al (2009). Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res* 15(7):2531–2540.
- 82) Wang RF, Rosenberg SA (1999). Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170:85–100.
- 83) Willimann, K., Legler, D. F., Loetscher, M., Roos, R. S., Delgado, M. B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Moser, B. (1998). The chemokine SLC is expressed in T cell areas of lymph nodes and mucosal lymphoid tissues and attracts activated T cells via CCR7. *Eur J Immunol* 28: 2025-2034.
- 84) Yanagihara, S., Komura, E., Nagafune, J., Watarai, H., and Yamaguchi, Y. (1998). EB1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J Immunol* 161: 3096-3102.
- 85) Young SE, Martinez SR, Essner R (2006) The role of surgery in treatment of stage IV melanoma. *J Surg Oncol* 94:344-351.

Sitios web:

- 1) List of DC-based vaccine clinical trials. www.mmri.mater.org.au